



ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

BERBERİN KULLANIMININ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Muhammed Yusuf KURT

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bilal EGE
Prof. Dr. Mahmut KOPARAL

Adıyaman/2023

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

**BERBERİN KULLANIMININ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

MUHAMMED YUSUF KURT

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bilal EGE
Prof. Dr. Mahmut KOPARAL

ADİYAMAN, 2023

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

**BERBERİN KULLANIMININ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

MUHAMMED YUSUF KURT

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bilal EGE
Prof. Dr. Mahmut KOPARAL

ADİYAMAN, 2023

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 2020/002 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

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

**BERBERİN KULLANIMININ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ**

Adıyaman Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalında Doç. Dr. Bilal EGE ve Doç. Dr. Mahmut KOPARAL danışmanlığında Dt. Muhammed Yusuf KURT tarafından hazırlanan “**Berberin Kullanımının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin Deneysel Olarak İncelenmesi**” adlı tez çalışması 17/10/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası tarafımızca yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalında Uzmanlık Tezi olarak başarılı bulunmuş ve kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Mahmut KOPARAL

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Bilal EGE

Üye : Doç. Dr. Mehmet Emrah POLAT

Prof. Dr. Yasin ÇİÇEK
Diş Hekimliği Fakültesi
Dekan V.

Adıyaman 2023

ÖZET

BERBERİN KULLANIMININ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

Muhammed Yusuf KURT

Ağız, Diş, Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, 10/2023

Danışman: Doç. Dr. Bilal EGE/ Prof. Dr. Mahmut KOPARAL

Amaç: Berberinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi, kemik defekti oluşturularak farkı parametreler yardımıyla tespit etmek amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: Çalışmamız 4-6 aylık, ağırlıkları 300-350 gr arasında değişen, 35 adet erkek erişkin, Wistar albino rat üzerinde yürütüldü. Deney ve kontrol grubundaki hayvanların sağ tibialarına defekt oluşturulduktan sonra deney grubundaki hayvanlara günlük gavaj yoluyla 100 mg /kg/gün berberin uygulandı. Hem deney hem de kontrol grubundaki hayvanların bir kısmı 14. günde bir kısmı 28. günde kurban edildi. İntrakardiyak kanları alınan hayvanların serumlarında ELISA yöntemiyle TNF-a, NFKB, IL1, IL2, IL6 ve IL10 seviyeleri ölçüldü. Çevre yumuşak dokulardan diseke edilen tibialar histopatolojik olarak ülserasyon, seröz dejenerasyon, epitelizasyon, ödem, polimorfonükleer lökosit, mononükleer hücreler, osteoblastik aktivite, osteoklastik aktivite, yeni kemik oluşumu ve fibröz doku kalınlığı incelendi. RANK, RANKL ve OPG seviyeleri immünohistokimyasal yöntemle boyanarak incelendi.

Bulgular: Serum TNF-a, NFKB, IL1, IL2, IL6 ve IL10 seviyelerinde gruplar arasında anlam oluşturacak bir farklılık bulunamadı. Histopatolojik olarak incelenen ülserasyon, seröz dejenerasyon, epitelizasyon ve ödem seviyelerinde hem 14. gün hem de 28. günde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Histopatolojik olarak incelenen PMN ve MNL seviyeleri, osteoklastik aktivite, fibröz doku kalınlığı, RANK ve RANKL seviyeleri hem 14. gün hem de 28. günde kontrol grubunda deney grubundan anlamlı seviyede yüksek bulundu. Osteoblastik aktivite, yeni kemik oluşumu ve OPG seviyeleri hem 14. gün hem de 28. günde deney grubunda kontrol grubundan anlamlı seviyede yüksek bulundu.

Sonuç: Deneysel olarak berberinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini inceleyen bu çalışma, histopatolojik olarak da sonuçların kıyaslamaktadır. Sonuçlarımız berberinin kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerini göstermektedir. Diş hekimliğinde klinik kullanıma kazandırılması için daha fazla deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Berberin, kemik iyileşmesi, rat, histopatoloji, kemik defekti

ABSTRACT

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BERBERINE USE ON BONE HEALING

Muhammed Yusuf KURT

Oral and Maxillofacial Surgery Department

Adiyaman University, Dentistry Faculty, 10/2023

Supervisor: Doç. Dr. Bilal EGE/ Prof. Dr. Mahmut KOPARAL

Aim: This study aims to determine the effect of berberine on bone healing with the help of different parameters by creating a bone defect.

Material and Method: Our study was conducted on 35 male adult Wistar albino rats, aged 4-6 months, weighing between 300-350 g. After creating a defect in the right tibia of the animals in the experimental and control groups, 100 mg/kg/day berberine was administered to the animals in the experimental group via daily gavage. Some of the animals in both the experimental and control groups were sacrificed on the 14th day and some on the 28th day. TNF- α , NFKB, IL1, IL2, IL6 and IL10 levels were measured by ELISA method in the serum of animals from which intracardiac blood was taken. Tibiae dissected from the surrounding soft tissues were examined histopathologically for ulceration, serous degeneration, epithelialization, edema, polymorphonuclear leukocytes, mononuclear cells, osteoblastic activity, osteoclastic activity, new bone formation and fibrous tissue thickness. RANK, RANKL and OPG levels were examined by immunohistochemical staining.

Result: No significant difference was found between groups in serum TNF- α , NFKB, IL1, IL2, IL6 and IL10 levels. No significant difference was found between the groups in the levels of ulceration, serous degeneration, epithelialization and edema examined histopathologically, both on the 14th day and on the 28th day. Histopathologically examined PMN and MNL levels, osteoclastic activity, fibrous tissue thickness, RANK and RANKL levels were found to be significantly higher in the control group than the experimental group on both the 14th day and the 28th day. Osteoblastic activity, new bone formation and OPG levels were found significantly higher in the experimental group than in the control group.

Conclusion: This study experimentally examines the effect of berberine on bone healing and compares the results histopathologically. Our results demonstrate the positive effects of berberine on bone healing. More experimental and clinical studies are needed to bring it into clinical use in dentistry.

Keywords: Berberine, bone healing, rat, histopathology, bone defect

TEŞEKKÜR

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi uzmanlık eğitimimde, bütün akademik faaliyetlerimde ve tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgilerini, zamanını ve desteğini esirgemeyen, tez çalışmamın her aşamasını titizlikle yöneten saygıdeğer hocalarım ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Bilal EGE'ye ve Sayın Prof. Dr. Mahmut KOPARAL'a,

Eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, Sayın Doç. Dr. günay YAPICI YAVUZ ve Sayın Doç. Dr. Aydın KESKİNRÜZGAR hocalarıma, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi kliniğinde birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma, tez çalışmamın histopatolojik incelenmesinde ve değerlendirilmesinde yardımını esirgemeyen, bu konuda yol gösterip kendimi geliştirmemi sağlayan Sayın Doç. Dr. Onur CEYLAN'a,

Doğduğum günden bugüne her zaman yanımda olup, bugüne gelebilmem için her türlü fedakarlığı yapmaktan kaçınmayan canım aileme, her konuda beni destekleyen, yardımını esirgemeyen, hayatımın yoğun ve zorlu günlerinde en büyük destekçim sevgili eşim

Uzm. Dt. Şerife ÖZBUNAR KURT'a ve onun ailesine,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Muhammed Yusuf KURT

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
GÖRSEL DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kemik.....	2
2.2. Kemik Fonksiyonu	2
2.3. Kemik İnorganik Yapısı.....	2
2.4. Kemik Organik Yapısı.....	3
2.4.1. Kollajen	3
2.4.2. Kollajen Olmayan Proteinler	4
2.4.3. Kemik Hücreleri.....	4
2.4.3.1. Osteoklast	4
2.4.3.2. Osteoblast	5
2.4.3.3. Osteosit	5
2.4.3.4. Osteoprogenitör Hücreler	6
2.4.4. Periosteum ve Endosteum	6
2.5. Kemik Mikroyapı Organizasyonu.....	7
2.5.1. Woven Kemik	8
2.5.2. Lameller Kemik.....	9
2.6. Kemik Makroskobik Yapısı.....	10
2.6.1. Kompakt(Kortikal) Kemik.....	10

2.6.2. Spongios (Kansellöz) Kemik	10
2.7. Kemik Oluşumu	10
2.7.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu	11
2.7.2. Enkondral Kemik Oluşumu	11
2.8. Kemik Şekillenmesi.....	13
2.9. Kemğin Yeniden Şekillenmesi	13
2.9.1. Aktivasyon	14
2.9.2. Rezorpsiyon	14
2.9.3. Geri dönüşüm (Reversal).....	15
2.9.4. Formasyon	15
2.9.5. Terminasyon	16
2.10. Kemik İyileşmesi(Kemik Kırıklarının İyileşmesi)	16
2.11. Kırık Onarım Aşamaları.....	17
2.11.1. İnflamasyon Fazı	17
2.11.2. Granülasyon Dokusu Fazı	18
2.11.3. Kallus Fazı	18
2.11.4. Yeniden Yapılanma Fazı	19
2.12. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler	19
2.12.1. Lokal faktörler	19
2.12.2. Genel faktörler	20
2.12.2.1. Hormonal faktörler	21
2.12.2.2. Beslenme.....	21
2.12.2.3. Sistemik hastalıklar	22
2.12.2.4. İlaçlar	22
2.12.2.5. Alışkanlıklar.....	23
2.12.2.6. Yaş.....	23
2.12.2.7. Biyokimyasal faktörler.....	23
2.13. Kemik İyileşmesinin Arttırılması	23
2.13.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kullanılması.....	24
2.13.2. İlaçlar	24
2.13.2.1. Antirezorptif ajanlar	24
2.13.2.2. Kemik oluşturuıcı ajanlar.....	25
2.13.3. Bitkisel Tedavi	25
2.14. Berberin	26

2.14.1. Farmakokinetik ve Farmakodinamik	26
2.14.2. Berberinin Güvenliği ve Toksisitesi.....	28
2.14.3. Berberinin Farmakolojik ve Terapötik Potansiyeli	28
2.14.3.1. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	28
2.14.3.2. Kardiyovasküler Etkiler	29
2.14.3.3. Antihiperglisemik ve Antidiyabetik Etkileri.....	30
2.14.3.4. Berberinin Kemik Üzerindeki Etkisi	30
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Çalışma Gruplarının Tanımlanması.....	36
3.2. Cerrahi Aşamalar	37
3.3. Berberin Uygulaması.....	40
3.4. Örneklerin Elde Edilmesi.....	41
3.4.1. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması.....	41
3.5. Biyokimyasal Analizler.....	42
3.6. Histolojik Değerlendirme	42
3.7. Doku Hazırlama İşlemleri (Tissue Processing)	42
3.8. İmmünohistokimyasal Boyama ile RANK, RANKL ve OPG Belirteçlerinin Değerlendirilmesi	43
3.9. İstatistiksel Değerlendirme	44
3.10. Metot Hatasının Değerlendirilmesi	44
4. BULGULAR	45
4.1. Ratlarla İlgili Gözlemsel Bulgular.....	45
4.2. Ratların Ağırlıklarıyla İlgili Bulgular.....	45
4.3. Gözlemciler Arası Uyum Analizi.....	46
4.4. Biyokimyasal Analiz Sonucu Bulgular	47
4.5. Histolojik İncelemeye İlişkin Bulgular	48
4.6. İmmünohistokimyasal Boyanma Sonucu Bulgular	68
5. TARTIŞMA.....	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
7. KAYNAKÇA.....	84
8. EKLER	108
8.1. EK-1. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI.....	108
8.2. EK-2. ÖZGEÇMİŞ	109

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışma gruplarının gösterilmesi.....	36
Tablo 2. Çalışma alt gruplarının gösterilmesi.....	36
Tablo 3. Kilo başlangıç ve kilo bitiş ortalamalarının kıyaslanması.....	45
Tablo 4. Gözlemciler arası uyum analizi- Kappa katsayıları.....	46
Tablo 5. Gözlemciler arası uyum analizi- Kappa katsayıları.....	46
Tablo 6. Kontrol 14. gün ve Deney 14.gün gruplarının ELISA sonuçları arasındaki ilişki	47
Tablo 7. Kontrol 28. gün ve Deney 28.gün gruplarının ELISA sonuçları arasındaki ilişki	47
Tablo 8. Ülserasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün).....	48
Tablo 9. Seröz denejasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)	48
Tablo 10. Epitelizasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün).....	49
Tablo 11. Ödem derecesi ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün).....	49
Tablo 12. Polimorfonükleer lökosit ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün).....	50
Tablo 13. Mononükleer hücreler ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)	51
Tablo 14. Osteoblastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün).....	53
Tablo 15. Osteoklastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün).....	54
Tablo 16. Ülserasyon ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün).....	56
Tablo 17. Seröz dejenerasyon ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün).....	57
Tablo 18. Epitelizasyon ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)	58
Tablo 19. Ödem ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)	58
Tablo 20. Polimorfonükleer lökosit ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün).....	59
Tablo 21. Mononükleer hücreler ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)	61
Tablo 22. Osteoblastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün).....	62
Tablo 23. Osteoklastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün).....	64
Tablo 24. Yeni kemik oluşumu ortalamasının gruplara göre kıyaslanması	65
Tablo 25. Fibröz doku kalınlığı ortalamasının gruplara göre kıyaslanması	66

Tablo 26. RANK ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)	68
Tablo 27. RANK ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)	69
Tablo 28. RANKL ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)	70
Tablo 29. RANKL ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)	71
Tablo 30. OPG ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)	72
Tablo 31. OPG ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)	73



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kemğin mikro yapısı.....	8
Şekil 2. Enkondral kemikleşme.....	12
Şekil 3. Kemğin yeniden şekillenmesi	14



GÖRSEL DİZİNİ

Görsel 1. Sıçanların bacağıının işlem öncesi tıraşlanması.....	37
Görsel 2. Kemiğin açığa çıkartılması.....	38
Görsel 3. Oluşturulan defektin görünümü	39
Görsel 4. Cildin primer olarak sütüre edilmesi ve batikon uygulanması.....	40
Görsel 5. Gruplara oral gavaj uygulanması	41
Görsel 6. Alınan kanların santrifüj edilmesi.....	42
Görsel 7. 14. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük yoğunluk dereceli PMN hücreler, x100.....	50
Görsel 8. 14. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek yoğunluk dereceli PMN hücreler, x100.....	51
Görsel 9. 14. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük yoğunluk dereceli MNL hücreler, x100.....	52
Görsel 10. 14. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek yoğunluk dereceli MNL hücreler, x100.....	52
Görsel 11. 14. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli osteoblastik aktivite , x100.....	53
Görsel 12. 14. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek dereceli osteoblastik aktivite , x100.....	54
Görsel 13. 14. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli osteoklastik aktivite , x100.....	55
Görsel 14. 14. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek dereceli osteoklastik aktivite , x100.....	55
Görsel 15. Hematoksilen eozin boyamada ülserasyon, x100.	56
Görsel 16. Hematoksilen eozin boyamada seröz dejenerasyon, x100	57
Görsel 17. Hematoksilen eozin boyamada ödem, x100.....	59
Görsel 18. 28. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli PMN, x100	60

Görsel 19. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek dereceli PMN , x100	60
Görsel 20. 28. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli MNL, x100.	61
Görsel 21. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek dereceli MNL hücreler , x100.	62
Görsel 22. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli osteoblastik aktivite, x100.	63
Görsel 23. 28. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek dereceli osteoblastik aktivite, x100.	63
Görsel 24. 28. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli osteoklastik aktivite, x100.	64
Görsel 25. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek dereceli osteoklastik aktivite, x100.	65
Görsel 26. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada az miktarda yeni kemik oluşum alanı, x100.	66
Görsel 27. 28. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek miktarda yeni kemik yapım alanı, x100.	66
Görsel 28. 28. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük miktarda fibröz doku kalınlığı, x100.	67
Görsel 29. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek miktarda fibröz doku kalınlığı, x100.	68
Görsel 30. 28. gün deney grubuna ait RANK antikoru ile düşük boyanma yoğunluğu, x400.	69
Görsel 31. 28. gün kontrol grubuna ait RANK antikoru ile yüksek boyanma yoğunluğu, x400.	70
Görsel 32. 28. gün deney grubuna ait RANKL antikoru ile düşük boyanma yoğunluğu, x400.	71

Görsel 33. 28. gün kontrol grubuna ait RANKL antikoru ile yüksek boyanma yoğunluğu, x400.	72
Görsel 34. 28. gün kontrol grubuna ait OPG antikoru ile düşük boyanma yoğunluğu, x400.	73
Görsel 35. 28. gün deney grubuna ait OPG antikoru ile yüksek boyanma yoğunluğu, x400.	74



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AD	: Alzheimer hastalığı
ALP	: Alkalın fosfataz
BMP	: Kemik morfojenik protein
BMKH	: Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin
ChAT	: Kolinasetil transferaz
dhBBR	: Dihidroberberine
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
Gly	: Glisin
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
MAO-B	: Monoamin oksidaz-B
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinazın
MDA	: Malondialdehit
MKH	: Mezenkimal kök hücrelerden
OPG	: Osteoprotegerin
PD	: Parkinson hastalığı
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PES	: Programlanmış elektrik stimülasyonuna
PTH	: paratiroid hormon

RANK	: Nükleer faktör-kappa B reseptör aktivatörü
RANKL	: Nükleer faktör-kappa B ligandı
ROS	: Reaktif oksijen türlerinin
Runx2	: Runt ile ilgili transkripsiyon faktörü2
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNF-a	: Tümör nekroz faktörü alfa
TGF β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
Wnt	: Wingless ilişkili entegrasyon

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağız, diş ve çene cerrahisinde travma, geçirilmiş operasyonlar, konjenital defektler sonucunda oluşan kemik defektlerinin tedavisinde, kemik dokunun rekonstrükte edilmesi gerekmektedir. Kemik defektlerinde küçük boyutlu kemikler kendiliğinden iyileşebilirken büyük boyutlu kemik defektlerinde çeşitli biyomateryallerden yararlanmak gerekmektedir [1]. Kemik doku iyileşmesini hızlandırabilmek için meydana gelen defektlerden sonra, çeşitli ilaçlar, hiperbarik oksijen tedavisi, elektromanyetik tedavi, düşük seviyeli lazer, ultrason uygulaması gibi tedaviler lokal/sistemik ilaçlar uygulanabilmektedir [2]. Sistemik etkisi olanların kullanımında yan etkileri de göz önünde bulundurulması gereken bu ajanlar yerine yararları benzer ve yan etkileri daha az alternatif bitkisel ilaçlar çalışmalarda kullanılmaya başlamıştır.

Bitkisel ilaçların araştırılmasıyla, ilaç ekstraktları içerisinde doğal olanlar, giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Bu ilaçların etkili ve güvenli olduğu gösterilmektedir [3, 4]. Osteoblast aktivitesini berberinin destekleyebildiği ve osteoklastların etkisini azaltabileceği gösterilmektedir [5]. Berberin, esas olarak Rutaceae, Berberidaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae gibi bitkilerde bulunmaktadır. Berberin, kuaterner amonyum izokinolin alkaloididir. *Phellodendron chinense*, *Coptis chinensis* Franch, gibi bitkilerden elde edilmektedir. Berberin uzun yıllardan beri pratikte kullanılmaktadır ve anti-inflamatuar [6], anti-tümör [7], anti-osteoporoz [8], düşük kan lipidi [9] ve düşük kan şekeri [10], etkileri bildirilmektedir. Yaptığımız araştırmalarda, berberinin kemik iyileşmesi üzerinde etkisi kemik iyileşmesinin asıl göstergeleri kullanılarak, deneysel kemik defekti oluşturulmadığı tespit edildi. Bu çalışma, berberinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini, histopatolojik olarak incelerken, immünohistokimyasal boyama yöntemiyle nükleer faktör-kappa B reseptör aktivatörü(RANK), nükleer faktör-kappa B ligandı (RANKL) ve osteoprotegerin (OPG) ekspresyon seviyelerine de bakmaktadır. Berberinin antiinflamatuar etkisi hem Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi(ELISA) hem de histopatolojik olarak incelenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik

Kemik, bağ dokusunun dinamik ve oldukça özelleşmiş bir şeklidir. Yüksek oranda farklılaşmış bir bağ dokusu olan kemik yapısında fosfat kalsiyum gibi birçok iyonları barındıran ve gerektiğinde kana geçişini sağlayan, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin kan hücreleriyle ilişkisi ile de hematopoezde görev alan konnektif, dinamik ve canlı bir dokudur.

2.2. Kemik Fonksiyonu

Kemik çok işlevlidir; mekanik destek, mineral homeostazisi ve hematopoezde rol oynamaktadır. Son yıllarda kemiğin aynı zamanda önemli bir endokrin fonksiyona da hizmet ettiği tespit edilmektedir. Bu güne kadar kemik fonksiyonlarından en çok kemiğin mekanik fonksiyonunun incelendiği görülmektedir. Kemiğin mekanik fonksiyonunu kortikal kemik ve trabeküler kemik sağlamaktadır. Bu kemik türleri kendi özellikleri doğrultusunda fonksiyon görmektedir. Destek fonksiyonunu esas olarak yoğun kortikal kemik sağlamaktadır. Süngerimsi kemiğin esas fonksiyonu oluşan kuvveti daha güçlü yapıda olan kortikal kemiğe iletme. Kemiğin mekanik işlevi, güç ve sertlik gerektiren basit yük taşımanın ötesindedir. Organizasyonu nedeniyle, fizyolojik düzeyde tekrarlayan streslerin neden olduğu kırıkları, yani mekanik yorgunluğu önlemeye de oldukça uyumludur. Kemiğin hayati görevlerinden biri de , ölümcül yaralanmaların olabileceği kafa ve gövde gibi hayati bölgeleri korumasıdır. Bu bölgelerdeki kemiğin mikro yapısı diğer bölgelerdeki kemikten farklı değildir ancak minimum travma ile maksimum enerjiyi absorbe edebilecek şekilde düzenlenmektedir [11–13].

2.3. Kemik İnorganik Yapısı

Kemiğin mineral içeriği olan karbonatlı apatit mineralleri, kollajen fibrillerinin uçlarında ve fibrillerin arasında bulunan gözeneklere yerleşmektedir [11, 14]. Başlangıçta amorf kalsiyum fosfat, kalsiyum karbonat ile birlikte biriktirilmektedir [11, 14]. Kemik dokunun matür hale gelmesiyle mineral kristalleri büyümektedir ve karbonat içerik azaltmaktadır [11, 14]. Kemikteki mineral kristallerinin ortalama boyutu yaşlandıkça büyüyebilmektedir [11, 14]. Kemikte mineralizasyon birbirini takip eden iki aşamada

gerçekleşmektedir [11, 14]. Heterojen nükleasyon (birincil mineralizasyon) sırasında, mineral kollajen çevresinde hızla birikmektedir. Mineralizasyonda ikinci aşamada, daha yavaş bir oranda mineral birikimi devam etmektedir [11, 14]. İkincil mineralizasyonun tamamlanması için birkaç aydan birkaç yıla kadar süre gerekebilmektedir [11, 14].

2.4. Kemik Organik Yapısı

2.4.1. Kollajen

Kemik, temel düzeyde mineralize kollajen liflerinden oluşmaktadır. Kollajenler üç polipeptit zincirden oluşmaktadır [15]. Kollajen zincirlerinin her biri yaklaşık 1000 amino asit uzunluğundadır. Kollajen moleküllerinin merkez kısmı Glisin(Gly)-X-Y üçlüsünün tekrarından oluşmaktadır [15]. En küçük amino asit olan glisinin varlığı, bu sarmal yapının oluşması için esastır [15]. X ve Y pozisyonlarında, glisin haricinde herhangi bir amino asit bulunabilse de X pozisyonunda genellikle prolin ve Y pozisyonunda genellikle 4-hidroksiprolin bulunmaktadır [15]. Kollajende, hidroksil grubu su molekülleri ile hidrojen bağı için hidroksiprolin, gerekli olduğundan, hidroksiprolin özellikle kritik bir öneme sahiptir [15]. Hidroksiprolin tarafından çekilen su molekülü kılıf, üçlü sarmal yapının kararlılığını sağlamaktadır [15].

Yapılarına ve/veya işlevlerine bağlı olarak 28 farklı kollajen türü tanımlanmaktadır. Tip I, II, III, V, XI ve yeni tanımlanan tip XXIV, XXVII fibriler kollajenler grubunu oluşturmaktadır [16, 17]. Fibriler kollajenler kendi kendine birleşen uzun, sürekli bir üçlü sarmal yapıda iyi organize olmuş yapıdadır [16, 17]. Fibriller çok yüksek bir gerilme mukavemetine sahiptir ve iskelet, deri, kan damarları, bağırsaklar ve organ kapsüllerinde bulunmaktadır [16, 17]. Omurgalılarda en bol bulunan protein olan tip I kollajen birçok organda bulunsa da, kemik, tendon ve derinin ana bileşenidir [15]. Tip I kollajen içeren dokularda Tip V kollajen, bulunmaktadır. Tip II kollajen, kıkırdığın önemli bir bileşenidir. Tip II kollajene benzer olarak tip XI ve tip XXVII kollajenler de kıkırdakta bulunmaktadır [16–18]. Tip XXIV kollajen, omurgasız fibriller kollajenlerine benzer yapısal özellikler göstermektedir ve ağırlıklı olarak kemik dokusunda eksprese edilmektedir [18].

2.4.2. Kollajen Olmayan Proteinler

Kemiğin organik matriksi esas olarak kollajenlerden oluşsa da, salgılanan kollajen olmayan bileşenlerin varlığı ilk olarak 1960'larda Herring ve çalışma arkadaşları tarafından önerilmektedir [19]. Kollajen olmayan proteinlerin, kollajen gibi yapısal bileşenler kadar bol olmasalar da kemik fizyolojisindeki önemi göz ardı edilememektedir.

Kollajen olmayan proteinlerden ilki proteoglikanlardır. Çekirdek protein molekülüne glikozaminoglikanlar gibi polisakkaritlerin kovalent olarak bağlanmasıyla oluşmaktadır. Glikozaminoglikanlar, kondroitin sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat ve heparan sülfat (HS) içeren değişen derecelerde sülfatlanmış birimlerden oluşmaktadır [20]. Proteoglikanların iskelet sistemi gelişiminde ve kollajen fibril organizasyonunda etkileri bulunmaktadır [21]. Kemikteki diğer kollajen olmayan proteinler; hyaluronan, glikoproteinler ve serum proteinleridir [22–25].

2.4.3. Kemik Hücreleri

Kemik yüzeyinde bulunan hücreler, kemikte büyümeyi düzenleyen immun hücreler kemik iliği hücreleri, osteositler, osteoklastlar, osteoblastlar ve periost ve endostta bulunan osteoprogenitör hücreler kemiğin hücresel elemanlarını oluşturmaktadır.

2.4.3.1. Osteoklast

Osteoklastlar, tek çekirdekli preosteoklastların füzyonu ile oluşan çok çekirdekli hücrelerdir [26]. Osteoklastların üretilmesinde, orijinal olarak tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesinin bir üyesi olan RANK ve RANK-RANKL yolunu esas göreve sahiptir [27–29]. Osteoklastlar, hücrede protein sentezinin ve aktif enerji metabolizmasının varlığının göstergesi olan çok sayıda mitokondriye ve endoplazmik retikulumu sahiplerdir [26]. Osteoklastlarda bol miktarda bulunan lizozom bu hücrelerin fonksiyonunun protein yıkımı olduğunu göstermektedir [26]. Kemik rezorpsiyonunda görev alan osteoklastların hücre zarları şeffaf bölge, kıvrımlı kenar, bazolateral alan ve fonksiyonel salgı alanı olmak üzere dört kısma ayrılmaktadır [26]. Osteoklastların rezorpsiyon faaliyetleriyle oluşan boşluklara Howship lakünaları adı verilmektedir [30]. Rezorpsiyon boşlukları asidik bir ortam oluşması için yaklaşık pH 4'de tutulmaktadır ve asidik ortam kemik minerallerinin ve kollajenin çözünmesini kolaylaştırmaktadır [31, 32].

2.4.3.2. Osteoblast

Osteoblastlar, hücrenin bazal zarına yakın konumlanmış büyük çekirdekli kübik şekilli, genişlemiş golgi aygıtının varlığı ve geniş endoplazmik retikulumu sahip olmalarıyla yüksek düzeyde protein salgılayan hücrelere özgü morfolojik özellikleri ile tanınmaktadırlar. Osteoblastlar, osteokalsin ve alkalın fosfataz (ALP) eksprese etmektedir. Bu proteinlerin dolaşımdaki konsantrasyonları, kemik oluşum hızını ve osteoblastların sayısını göstermektedir. Kemik matriksinin organik kısmının (tip I kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler) sentezinden de osteoblastlar sorumludur. Kemğin osteoblast tarafından üretilen bu organik fazı, hidroksiapatit formundaki mineral birikimi için şablon görevi görmektedir. Osteoblastlar, adherent junction, tight junction ve gap junction adı verilen bağlantı tipleriyle kendi aralarında ve kemik ilik hücreleriyle bağlantı sağlamaktadır. Esas olarak kaderinlerin aracılık ettiği adherent junction, tight junction ile hücreleri birleştirme ve hücre iskeleti yoluyla ekstra selüler matrise bağlanmalarını kolaylaştırmaktadır.

Osteoblastlar ve komşu hücreler arası iletişim gap junction'larla, sağlanmaktadır. İntegrinleri aracılığıyla osteoblastlar ve kemik matrisi arasındaki etkileşimin sağlanmasının yanında ayrıca osteoblastların farklılaşması, fonksiyonu ve hayatta kalması düzenlenmektedir.

2.4.3.3. Osteosit

Osteositler, kemik yapım sürecinin sonunda gömülü halde kalan ve mineralize kemik matrisi boyunca düzenli olarak dağılan eski osteoblastlardır. Kemikte en çok bulunan hücrelerdir. Hormonal ve mekanik uyarılara yanıt olarak osteoblastların ve osteoklastların işlevini koordine ettiği kabul edilmektedir. Osteositlerin gövdeleri, lakunanın içerisinde ve mineralize matriks içinde kanaliküller boyunca uzanan sitoplazmik dendritik uzantılara sahiptir. Osteositlerin komşu osteositlerin uzantılarıyla birbirine temas eden, hücre gövdesinden çıkan ortalama 50 sitoplazmik çıkıntısı bulunmaktadır. Kanaliküller ayrıca kortikal kemikte periosteal ve endosteal kemik yüzeylerine ulaşırken spongios kemikte kemik iliğine bitişik yüzeylere ulaşmaktadır. Laküner kanaliküler sistem osteositler tarafından üretilen mezenkimal progenitör hücrelere etki ederek osteoblastogenezi etkileyen proteinlerin taşınmasını da sağlamaktadır.

2.4.3.4. Osteoprogenitör Hücreler

Kök hücreler genellikle son yılların yeni keşfi olarak düşünülmektedir ancak , Goujon tarafından 1860'larda kemik rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda periost veya ilikten kaynaklanan bir tür kök/progenitör hücrenin varlığı önerilmektedir [33]. Friedenstein ve Owen, kemik iliği stromal kök hücresi olarak adlandırdıkları, osteoblastik fenotipe farklılaşabilen kök/progenitör hücrenin varlığını önermektedir [34]. Bu çalışmadan sonra, iskelet dokusunda bulunan tüm hücreleri uygun şekilde yeniden yaratma yeteneğine sahip olan “iskelet kök hücresi” terimi benimsenmektedir [35].

Osteoprogenitör hücreler, kemiğin büyümesinde ve onarımında önemli rol oynayan osteojenik hücreler olarak da bilinen kemikteki kök hücrelerdir [36]. Bu hücreler kemik iliğinde bulunmaktadır ve kemik hücrelerinin (osteositler ve osteoblastlar) öncüleridir. Osteoprogenitör hücreler, olgunlaşmış kemiklerin yüzeyinde işçi hücrelere dönüşen mezenkimal hücrelerden kaynaklanan hücrelerdir [37]. Gelişmekte olan kemiklerde daha sık ortaya çıkmaktadır ve kemikleri yeniden şekillenme aşamasında aktifleşmektedir. Preosteoblastlar da denen osteoprogenitör hücreler, genellikle periosteumun hücresel tabakasında, endosteumda bulunabilmektedir [37]. Osteoprogenitör hücreler, kemik oluşumu veya kemik yeniden şekillenmesinin aktif olmadığı olgunlaşmış kemiklerde, düzleşmiş işçi şeklinde bulunmaktadır. Osteoprogenitör hücreler, kendini yenileyebilmektedir. anjiyogenezi düzenlemede rol oynamaktadırlar [38]. Osteoprogenitör hücreler, osteoblastlara, proliferasyon işlemi ile veya mitotik bölünme yoluyla diferansiye olabilmektedir [37].

2.4.4. Periosteum ve Endosteum

Kemik damarlı yapıdadır ve aynı zamanda sinirsel desteği bulunmaktadır. Periosteum olarak bilinen, kemiğin dış örtüsü; ligament bağlanma alanları, periosteum, , eklem kıkırdağı ve tendon bağlanma alanları haricinde kemiğin tüm yüzeyini kaplamaktadır. Sesamoid kemiklerde periosteum bulunmamaktadır [39, 40]. Kemik iliği boşluğunun duvarlarını kaplayan zara , endosteum ismi verilmektedir [41].

Periosteum ve endosteum kemiğin büyümesi, kırık iyileşmesi ve yeniden şekillenme için gereklidir [42]. Endosteum ve periosteum, kemiğin yeniden şekillenmesi ve kemik gelişimi için gerekli olan hücreleri (osteoprogenitör hücreler, osteoklastlar ve osteoblastlar)

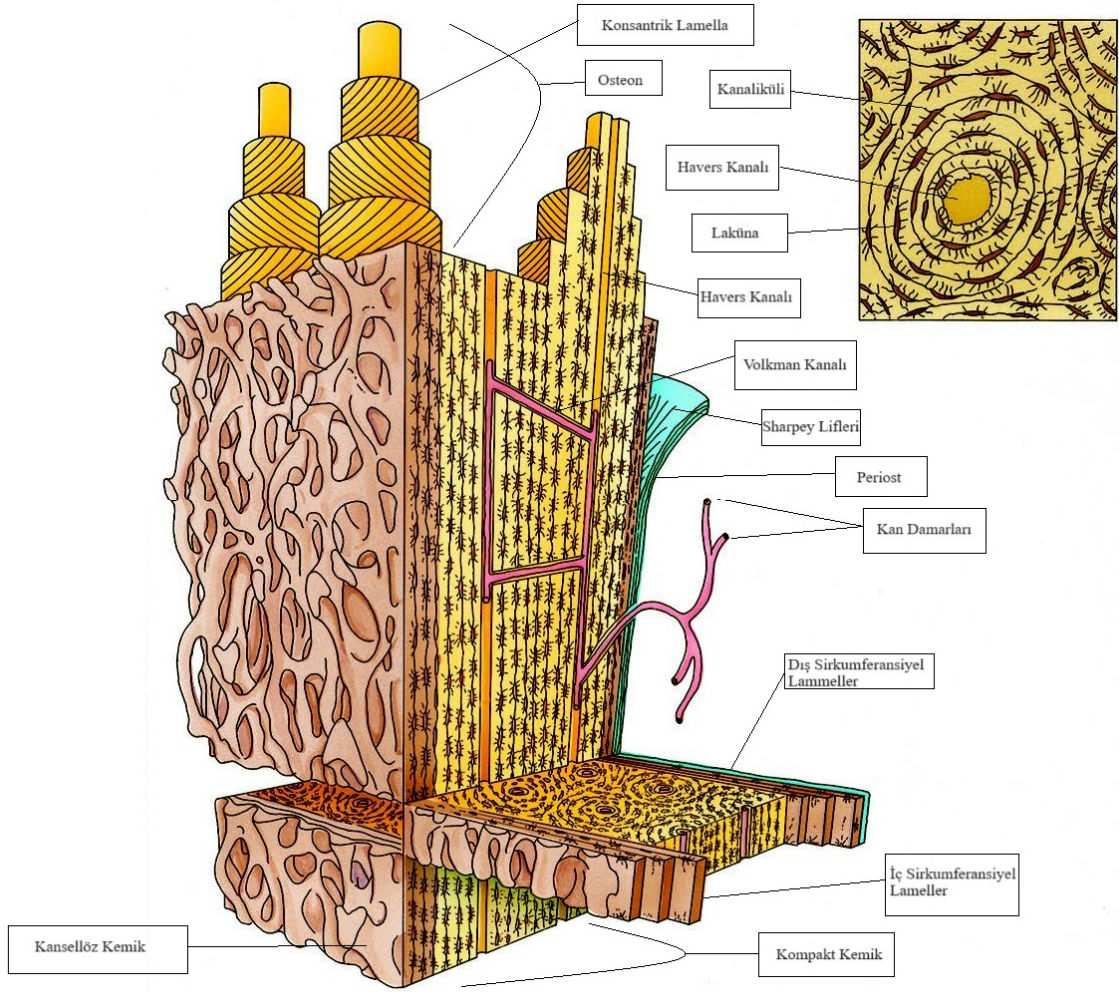
içermektedir. Periosteum iç hücresel tabaka ve dış fibröz tabaka olmak üzere iki katmandan oluşmaktadır. Dış fibröz tabaka, fazla kollajen matriks ve daha az sayıda hücre içeren, düzensiz, yoğun bir bağ dokusu türüdür [43–45]. Dış tabaka ayrıca yüzeysel ve derin olmak üzere ikiye ayrılmaktadır; yüzeysel tabaka daha vaskülerdir ve periosteal damarlar bulunmaktadır, iç tabaka ise fibroelastik bir tabakadır [43–46].

Periosteumun iç hücresel tabakası , bazı yazarlar tarafından iç kambiyum tabakası olarak da tanımlanmaktadır. Osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır; aynı zamanda osteogenetik tabaka olarak da bilinmektedir[44]. İç tabaka, gelişmekte olan genç kemiklerde osteoblastları içermektedir [44, 47]. Erişkin kemiklerinde osteoblastlar olmayabilir, ancak gerektiğinde (örn. kırık iyileşmesi) ortaya çıkmaktadırlar [42]. İç tabaka aynı zamanda birçok mikrodamar içeren zengin bir damar yapısındadır. Mikrodamarların endotelinden türetilen uyarılmış perisitler, osteoprogenitör hücrelerden osteoblast oluşumunu artırabilmektedir [48].

Kemik duvarının iç yüzeyini kaplayan bir zar olan endosteum, kemik iliği boşluğunu kaplayan zar olarak da tanımlanmaktadır. Kemiğin tüm iç boşluklarını ve havers kanallarını endosteum kaplamaktadır. Endosteum, retiküler liflerden ve osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır [49, 50]. Endosteum, periosteuma göre belirgin olarak daha incedir [51].

2.5. Kemiğin Mikroyapı Organizasyonu

Weiner ve Wagner lamellar kemiğin farklı mimarisine ilişkin o zamanki mevcut bilgiyi paylaşmaktadır [52]. Son yıllarda, kemiğin organizasyonunu 10 nm çözünürlükte üç boyutlu olarak açıklamamıza olanak tanıyan yeni bir yapısal analiz yöntemi kullanılmaktadır. Yeni 3 boyutlu yapısal özellik belirleme yöntemi bir bloktan ince (yaklaşık 10 nm) dilimleri sırayla kesme ve inceleme yöntemiyle incelemeye dayanmaktadır (Şekil 1). Reznikov ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kemiğin yapısal özelliklerine göre ayırmaktadır [53]. Kemiği oluşturan en yaygın malzeme lamel kemiktir. Fibrolamellar kemik (aynı zamanda pleksiform kemik olarak da bilinir), hızla gelişen birçok hayvanda bulunmaktadır. Fibrolameller kemiğin ana materyal bileşenleri paralel lifli kemik ve lameller kemiktir. Woven kemik başlı başına bir malzeme oluşturmaktadır.



Şekil 1. Kemiğin mikro yapısı [54]

2.5.1. Woven Kemik

Woven kemik oldukça düzensiz yapıdadır ve hızla oluşmaktadır. Mineralizasyonun hızla gerçekleştiği rastgele düzenlenmiş tip I kollajen liflerden meydana gelmektedir. Woven kemik, kırık iyileşmesi sırasında kemik fragmanları arasında boşluğu doldurarak stabilize sağlamayan bir onarım dokusudur. Enfeksiyona yanıt olarak osteomyelit olarak da ortaya çıkmaktadır. Woven kemik mekanik yüklerin normalden çok daha yüksek olduğu kemiğin tam olarak adapte olamadığı yerlerde ve iskelet gelişimi sırasında endokondral ossifikasyon aşamasında büyüme plakası bölgesinde de oluşmaktadır. Lamellar kemikten daha fazla mineralize yapısı vardır [55].

Woven kemiğe primer kemik de denmektedir [56]. Primer kemik, mikroskopik organizasyonlarına göre üç tip olarak ayırt edilmektedir. Bunlar, primer osteonlar, pleksiform (laminer) kemik ve primer lamelli kemiktir [55]. Görevlerindeki farklılıkları

yerine getirmek için farklı mekanik, fizyolojik özelliklere sahipler ve morfolojik olarak farklılardır. Primer lameller kemik periosteal yüzeyde oluşan başlıca kemik türüdür. Hızla rezorbe olup yerine konabilir ve bu nedenle kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde kullanılmaktadır [55]. Pleksiform kemik, genellikle insanlarda bulunmamaktadır ve fibrolamellar kemik olarak da adlandırılabilir. Primer osteonlar, lamellar kemikte bulunan genişlemiş vasküler kanalların doldurulmasıyla oluşmaktadır.

2.5.2. Lameller Kemik

Lameller kemik sekonder kemik olarak da adlandırılmaktadır [56]. Kemik, daha önce var olan kemiğin rezorbe edilip tekrar yapılması sürecinden sonra oluştuğu zaman sekonder kemik olarak isimlendirilmektedir. Sekonder osteon veya diğer adıyla haversian sistemi rezorpsiyon ve replasman aşamalarının sonucunda oluşmaktadır [55]. Primer ve sekonder osteonlar, merkezi nörovasküler kanalların etrafında halkalar oluşturan kortikal kemik içindeki yapısal birimlerdir [57, 58]. Sekonder kemikte benzer görümlerine rağmen, primer ve sekonder osteonların oluşum süreçleri farklılık göstermektedir. Primer osteonlar, kemik büyümesi sırasında periosteumun altındaki dış kemik yüzeyinde oluşmaktadır [59]. Sekonder osteonlar ise kortikal kemik içinde kemiğin çıkarılması ve yeniden oluşturulmasını içeren tünel oluşum sürecinde görülmektedir [60–62]. Kemik dokusunu çevreleyen ve onaran ikincil osteon oluşumu, mikro yapıyı da düzenlemektedir. Bu durum remodeling olarak adlandırılmaktadır [63].

Lamellar kemik içindeki yüksek düzeyde düzenli kollajen organizasyonu, polarize ışık mikroskobu ile bakıldığında çift kırılmaya neden olmaktadır; değişen parlak ve koyu katmanlar, lamellerdeki kollajen liflerinin değişen yöneliminden kaynaklanmaktadır [56]. Osteon (havers sistemi), endosteum, küçük kan damarları ve sinirleri içeren merkezi bir kanalı çevreleyen lameller kompleksini ifade etmektedir [56]. Osteonlar, genellikle diyafizin uzun eksenine paralel uzun, bazen çatallanmış bir silindirdir [56]. Havers kanalları ayrıca enine delici kanallar (Volkmann kanalları) yoluyla da birbirleriyle iletişim kurmaktadır.

2.6. Kemiğin Makroskobik Yapısı

2.6.1. Kompakt (Kortikal) Kemik

Lameller kemik genel olarak(%80) kortikal kemikte bulunmaktadır. Homojen, sıkı ve kompakt bir yapıdadır. Kompakt kemikte dört lamelli sistem vardır: dış çevresel lameller, iç çevresel lameller, osteonlar ve interstisyel lameller. Kompakt kemik, lameller sistemler şeklinde düzenlenmiş ve özellikle uzun kemiklerin diyafizlerinde belirgin olan, ince kemik katmanlardan oluşmaktadır. Dış çevresel lameller, periostun hemen altındadır. Diyafizin en dış bölgesini oluşturmaktadır. Dış çevresel lameller periosteumu kemiğe sabitleyen sharpey lifleri içermektedir. İç çevresel lameller ilik boşluğunu tamamen çevrelemektedir. Süngerimsi kemiğin trabekülleri, iç çevresel lamellerden kemik iliği boşluğuna uzanmaktadır. Kompakt kemiğin büyük kısmı, çok sayıda havers kanal sisteminden (osteonlar) oluşmaktadır. Havers kanalı, vasküler boşluk etrafında eş merkezli olarak düzenlenmiş lamel silindirlerinden oluşmaktadır. Kemik yeniden şekillenirken, osteoklastlar osteonları rezorbe edip osteoblastlar onların yerini almaktadır. Osteon kalıntıları, interstisyel lameller olarak bilinen, düzensiz lameller parçaları olarak kalmaktadır [54].

2.6.2. Spongioz (Kansellöz) Kemik

Kansellöz kemik, süngerimsi kıvamda ve kemik trabeküllerinin anastomozlaştığı bir yapıya sahiptir. Spongioz kemik, bal peteği görünümlü, boşluklarında hematopoetik elemanlar içeren, kortikal kemik yüzeyler arasında bulunmaktadır. Spongioz kemiğin trabekülleri arasında birbirleriyle bağlantılı irili ufaklı boşlukların içi kemik iliği ile doludur. Spongioz kemik kolaylıkla kırılmaktadır mekanik etkilere karşı zayıftır. Spongioz kemik dokusu uzun ve kısa kemiklerin epifiz ve metafizlerinin iç kısımları ile yassı kemiklerin iç yüzeylerinde bulunmaktadır [54].

2.7. Kemik Oluşumu

Kemik, ya doğrudan mezenkimin hücre yoğunlaşmasından (intramembranöz kemikleşme) ya da önceden var olan ve şablon görevi gören kıkırdığın kademeli olarak değiştirilmesiyle (endokondral kemikleşme) oluşabilmektedir. İki yöntemle de oluşan kemik histolojik olarak aynıdır. Oluşan ilk kemik, daha sonra rezorbe edilen ve sekonder kemikle

değiştirilen primer kemiktir. Sekonder kemik, daha yavaş olsa da, yaşam boyunca rezorbe olmaya devam etmektedir [54].

2.7.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu

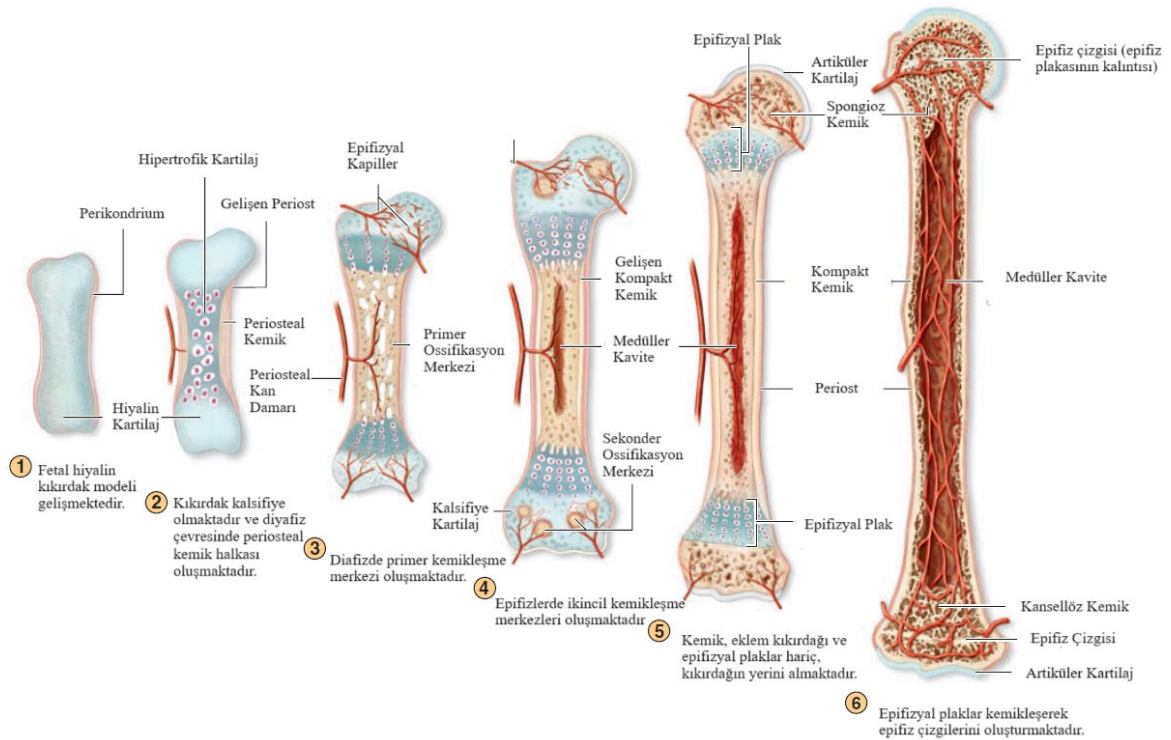
İntramembranöz kemik oluşumu mezenkimal dokudan direkt olarak meydana gelmektedir [54]. Yassı kemiklerin çoğu ve klavikula intramembranöz kemik oluşumu yoluyla oluşmaktadır. İntramembranöz kemikleşmede, embriyonik bağ dokusu (mezenkim) vaskülarize hale gelirken mezenkimal kök hücreler, hücre dışı bir matrisin içerisinde kümelenmektedir. Kümelenmiş mezenkimal kök hücreler doğrudan osteoid veya kemik matrisi salgılamaya başlayan osteoblastlara farklılaşmaktadırlar. Osteogenezin bu ilk bölgesi primer ossifikasyon merkezi olarak bilinmektedir. Çok sayıda ossifikasyon merkezi gelişerek sonunda birleşip primer spongioz olarak adlandırılan trabeküllerden oluşan bir ağ oluşturmaktadır. Primer kemikte olduğu gibi bu gelişmekte olan kemikte de trabeküllerin tip I kollajen lifleri rastgele bir şekilde yönlendirilmektedir. Erken intramembranöz kemik woven kemik olarak tanımlanmaktadır. Oluşan kemiğin mineralize olma sürecinde, kalsiyum fosfat, kemik matriksine veya osteoide biriktirilmektedir. Matrislerinde hapsolan osteoblastlar osteositler haline gelmektedir. Osteositler birbiriyle temas etmektedir. Birbiriyle temas eden osteositlerin etrafı kanaliküli sistemi olan kemikle çevrelenmektedir.

Mezenkimal hücrelerin sürekli mitotik aktivite varlığı, osteoblastlara kaynak oluşturan farklılaşmamış osteoprogenitör hücrelerin oluşumu sağlamaktadır. Gelişmekte olan kemikte, kalsifiye olmayan mezenkimal doku bölgeleri, periosteuma ve endosteuma farklılaşmaktadır.

2.7.2. Endokondral Kemik Oluşumu

Endokondral ossifikasyon, kıkırdak şablonların kemiğe dönüşmesi sürecidir (Şekil 2). Ekstremiteler kemikleri ve vertebra hyalin kıkırdak taslaktan oluşmaktadır. Endokondral ossifikasyonda ilk kemikleşme merkezi uzun kemiklerde diafiz kısmında oluşmaktadır ve bu bölgeye primer kemikleşme merkezi denmektedir. Kemikleşme primer kemikleşme merkezinde mezenkimal hücrelerin yoğunlaşmasıyla başlamaktadır. Yoğunlaşan mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşmak yerine, kondroblastlara farklılaşmaktadır. Kemikleşme merkezinde kondroblastlar, etrafını kaplayarak kondrosit haline gelmelerini sağlayan tip II kollajen içeren bir hücre dışı matris üretmektedir. Oluşan kıkırdak modelin

etrafı perikondrium ile çevrilidir. Kıkırdak modelin merkezindeki kondrositler hipertrofiye uğrayıp, sitoplazmalarında glikojen biriktirmekte ve vakuolleşmektedir. Eşzamanlı olarak, kıkırdak diyafizinin ortasındaki perikondrium vaskülarize olmaya başlamaktadır. Vaskülarizasyon olduğunda, kondrojenik hücreler, osteoprogenitör hücrelere dönüşmektedir ve perikondriumun bu kısmı periost haline gelmektedir. Yeni oluşan osteoblastlar, kıkırdak şablonunun yüzeyinde, intramembranöz kemikleşmeyle subperiosteal kemik oluşturmaktadır. Kıkırdak modelin etrafında oluşan kemik tabakası merkezdeki hipertrofik kondrositlere besinlerin difüzyonunu engelleyerek onların ölmesine neden olmaktadır. Merkezdeki hipertrofik kıkırdakların ölmesi süreci kıkırdak modelinin merkezinde gelecekteki kemik iliği boşluğunu oluşturmaktadır. Kıkırdak modelin etrafını saran kemik tabakada osteoklastlar tarafından oluşturulan rezorpsiyon alanlarından kemik iliği boşluğuna, osteoprogenitör hücreler, hemopoietik hücreler ve kan damarlarından oluşan periosteal tomurcuklar girmektedir. İlerleyen dönemlerde epifiz bölgesinde oluşan kemikleşme merkezi sekonder kemikleşme merkezidir. Primer kemikleşme merkezi ve sekonder kemikleşme merkezi arasında epifiz kıkırdağı adı verilen primordial kıkırdak tabakası bulunmaktadır. Epifiz kıkırdağında hücre çoğalması büyüme bitinceye kadar devam etmektedir ve kemik uzunluğu endokondral kemikleşmeyle artmaktadır [54].



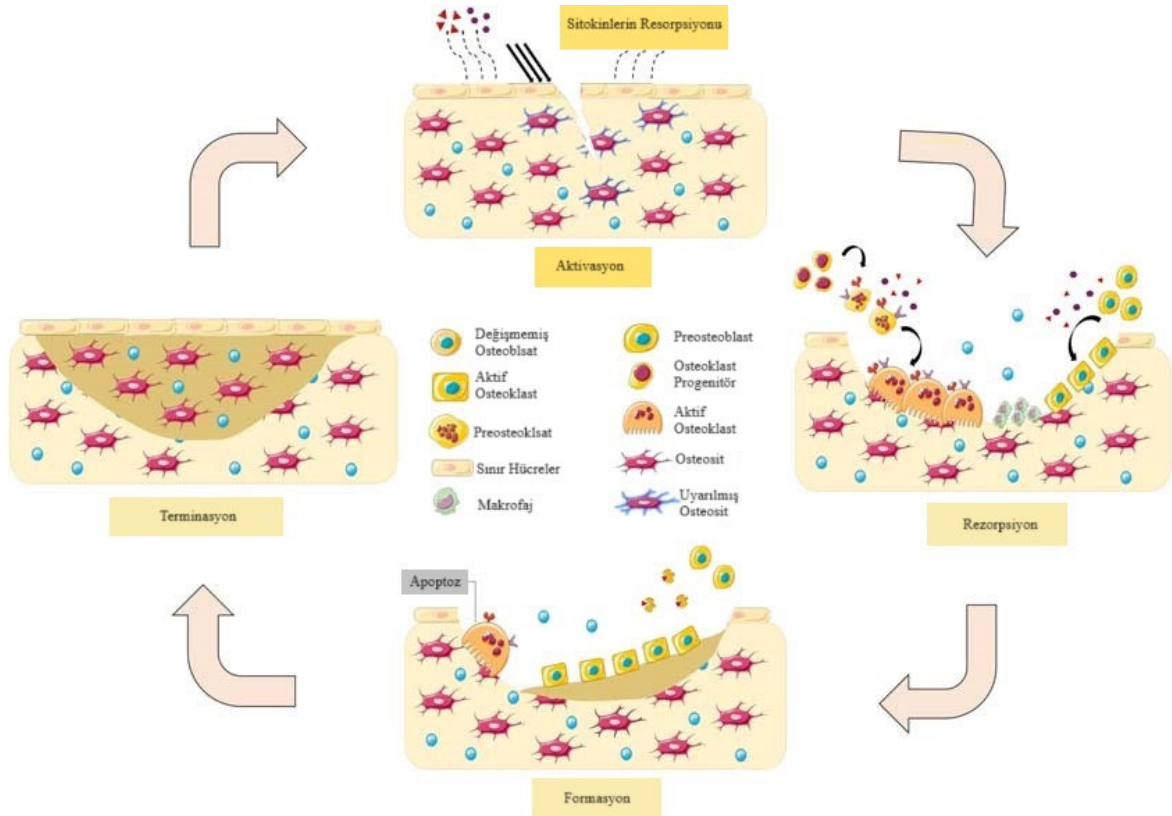
Şekil 2. Enkondral kemikleşme [56]

2.8. Kemik Şekillenmesi

Kemik şekillenmesi(modeling), osteoblastlar tarafından kemik yapılması veya osteoklastlar tarafından rezorpsiyonu olarak tanımlanmaktadır. Kemik şekillenmesi büyüme ve gelişim esnasında daha çok belirgindir. Kemik şekillenmesi, öncelikli olarak, kemik şeklini korumak veya değiştirmek, kemik kütlesini artırmak işlevini sağlamaktadır. Kemik şekillenmesi her zaman önceden var olan bir kemik yüzeyinde gerçekleşmektedir. Kemik şekillenme aktivitesi kemiğin periosteal, endokortikal yüzeyinde ve trabeküler kemik yüzeyinde gerçekleşmektedir. Kemik şekillenme süreci, iki aşamada gerçekleşmektedir; aktivasyon, ardından rezorpsiyon veya oluşum. Aktivasyon, öncü hücrelerin olgun osteoklastlara veya osteoblastlara farklılaşmak için toplanmasını içermektedir. Uzun kemiklerin uygun şeklini korumak için, oluşum ve rezorpsiyon aşamalarını içeren iki şekillenme türü de metafiz bölgesinde koordine edilmektedir [55].

2.9. Kemiğin Yeniden Şekillenmesi

Kemik yeniden şekillenmesi, osteoblastların yaptığı kemik oluşumunu ve osteoklastların yaptığı kemik rezorpsiyonunu içermektedir (Şekil 3). Endosteal, periosteal, ve trabeküler kemik yüzeylerinde yeniden şekillenme gerçekleşmektedir. Endokortikal ve intrakortikal yeniden şekillenme, yetişkinlikte olduğu kadar büyüme ve gelişim sırasında da yaygındır. Yaşamın tüm evrelerinde, çok daha az olarak periosteal yüzeydeki yeniden şekillenme görülmektedir. Kemik yeniden şekillenmesi, hedeflenmiş veya stokastik olarak sınıflandırılabilir. Hedeflenen yeniden şekillenmeyi, osteoklastları belirli bir konuma yönlendiren yerel sinyaller başlatmaktadır. Mikro hasar ve osteosit apoptozu, hedeflenen yeniden şekillenme için en çok kabul edilen iki sinyal olayıdır. Osteoklastların, bölgeye özgü bir sinyal olayı olmadan kemiği rezorbe ettiği duruma stokastik yeniden şekillenme denilmektedir. Stokastik yeniden şekillenmenin kalsiyum homeostazında daha fazla rol oynadığı, hedefe yönelik yeniden şekillenmenin ise mekanik olarak tehlikeye giren kemik matrisini onarmaya hizmet ettiği düşünülmektedir. Yeniden şekillenme, stokastik veya hedefli olsun, süreçte meydana gelen hücresel olaylar benzerdir. Yeniden şekillenme beş aşamaya ayrılmaktadır: aktivasyon, rezorpsiyon, geri dönüşüm, oluşum ve durgunluk.



Şekil 3. Kemiğin yeniden şekillenmesi [64]

2.9.1. Aktivasyon

Aktivasyon aşaması, yeniden şekillenmenin ilk aşamasıdır. Yeniden şekillenme sürecini başlatan kemiğin maruz kaldığı mekanik kuvvetler, yapısal hasar veya kemik hücrelerinin etkilendiği bir sinyalin algılanması anlamına gelmektedir [65]. Aktivasyon aşaması, kemik yüzeyine öncül osteoklastların alınmasını, çalışabilir osteoklastlar haline gelmek için değişikliğe uğramalarını ve füzyonlarını içermektedir. Temel seviyede, aktivasyon aşaması paratiroid hormon (PTH) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF β) olmak üzere iki önemli faktör tarafından kontrol edilmektedir.

2.9.2. Rezorpsiyon

Endokrin aktivasyonla veya osteosit tarafından üretilen sinyallere yanıt olarak, osteoblastlar preosteoklastları toplamaktadır. PTH, osteoblastlar tarafından OPG ekspresyonunu azaltmaktadır ve RANKL ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu da osteoklast oluşumunu ve aktivitesini uyarmaktadır [66]. Osteoklastlar kemik yüzeyine bağlandıktan sonra, aktif olarak mineral çözmemektedir ve kollajen parçalarını serbest bırakmaktadır.

Rezorpsiyon sürecinde, var olan osteoklastları desteklenmesi veya ölenlerin yerini alması için remodeling bölgesinde yeni osteoklastlar oluşturulmaktadır.

2.9.3. Geri dönüşüm (Reversal)

Geri dönüş fazı, kemik rezorpsiyonunun durdurulması ve kemik oluşumunun başlaması ile karakterize edilmektedir. Rezorpsiyon süreci bittiği zaman, kemik üzerindeki açıkta kalan kollajen parçaları çıkarılmalıdır. Osteoklastlar tarafından oluşturulan boşluklara alınan ve muhtemelen bu boşlukları kemik oluşumu için hazırlayan reversal hücreler olarak adlandırılan bu hücreler, aşınmış yüzeylerin %80'ini kaplamaktadır [67]. Rezorpsiyon yapan osteoklastlar ile kemik oluşturan osteoblastları birbirine bağlayan hücresel bir köprü oluşturmaktadırlar. Yakın tarihli bir çalışma [68], reversal hücrelerin %97'sinin osteoblastik belirteç olan Runt ile ilgili transkripsiyon faktörü 2 (Runx2) pozitif olduğunu, osteoklastik belirteçlerin negatif olduğunu göstermektedir. Osteoklastların hemen yanındaki reversal hücrelerin %84'ü de Runx2 pozitiftir. Bu durum da osteoklastların ayrılmasından hemen sonra aşınmış yüzeyi kolonize eden hücrelerin osteoblast kaynaklı olduğunu göstermektedir. Reversal hücrelerin son katkısı, rezorpsiyon fazından formasyon fazına geçişe izin veren eşleşme sinyallerinin üretilmesidir [69].

2.9.4. Formasyon

Osteoblastlar, kemik formasyon aşamasında öncelikle inorganik hidroksiapatit kristalleri için bir şablon görevi gören tip I kollajen liflerinden oluşan, mineralize olmayan organik matris (osteoid) sağlamaktadır. Osteoid mineralizasyonu iki farklı fazda gerçekleşmektedir. Primer mineralizasyon aşamasında kalsiyum ve fosfat iyonlarının kollajen matrisle birleştirilmesi, 2-3 hafta içinde hızla gerçekleşmektedir ve nihai mineral yoğunluğun kabaca %70'ini oluşturmaktadır. Sekonder mineralizasyon, çok daha uzun bir zaman diliminde (bir yıl veya daha fazlasına kadar) gerçekleşmektedir. Yeni kemik oluşumuna katılan osteoblastların akıbeti üç şekilde olmaktadır. Apoptoz yoluyla çoğunluğu (%90) ölmektedir. Osteoid matrise dahil edilen bir kısmı sonunda osteositler haline gelmektedir. İnaktif kemik hücreleri olarak geri kalan osteoblastlar, kemik yüzeyinde kalmaktadır. Bu hücreler aktive olma ve yeniden kemik matrisi üretmeye başlama kapasitesini korumaktadır.

2.9.5. Terminasyon

Terminasyon aşaması, yeniden modelleme döngüsünü sonlandırır. Yeterli miktarda yeni kemik oluştuğunda terminasyon başlatılmaktadır. Terminasyon, remodelingi yapan hücrelere çalışmayı bırakmaları için bilgi veren büyük ölçüde bilinmeyen sonlandırma sinyallerinin salınmasını içermektedir. Terminasyon aşaması, kemik matris mineralizasyonundan sonra, olgun osteoblastlar apoptoz geçirdiğinde, mineralize matrise gömülüp osteositlere farklılaştıklarında ve astar hücrelerini oluşturduklarında gerçekleşmektedir [65].

2.10. Kemik İyileşmesi(Kemik Kırıklarının İyileşmesi)

Kırık sonrası uzun kemiklerin onarımı, normal kemik anatomisinin ve fonksiyonunun restorasyonu ile sonuçlanan benzersiz bir süreçtir. Kemik iyileşmesi, primer ve sekonder iyileşme olarak ayrılmaktadır. Primer iyileşme, kırık parçalar arasında korteksin sürekliliğini yeniden tesis etmeye yönelik girişimi içermektedir. Yalnızca rijit fiksasyon ile kırık parçalar arasında harekette azalma sağlandığında ortaya çıkıyor gibi görünmektedir. Mezenkimal kök hücrelerden (MKH'ler) üretilen osteoblastlar, açıkta kalan kemik yüzeylerine osteoid sağlamaktadır. İntrakortikal yeniden yapılanma yoluyla orijinal kırık hattı boyunca yeni havers sistemi kurulmaktadır.

Sekonder (spontan) iyileşme, kırık bölgesini çevreleyen yumuşak dokuların tepkisini içermektedir. Periosteum yanıtı, kemik yaralanmasına karşı oluşan temel bir tepkidir. Osteoprogenitör hücreler ve mezenkimal hücreler, endokondral ve intramembranöz kemik oluşumu süreçleri ile onarım sürecine katkıda bulunmaktadır. Kırık bölgesinin periferinde intramembranöz kemikleşme ile oluşan yeni kemik bulunmaktadır. Periosteumun iç tabakasındaki progenitör hücreler, kemik yaralanması esnasında oluşan moleküler sinyallere yanıt olarak osteoblastlara farklılaşmaktadır. Kıkırdak oluşturmada, kemik yüzeyine yeni kemik matrisini sentezlemektedirler. Yapılan işlevler, kırık iyileşmesine direkt katkıda bulunmamaktadır. Kırık bölgesinde kallus, endokondral ossifikasyon aracılığı ile oluşmaktadır. Kanlanma eksikliğinin neden olduğu hipoksiye yanıt olarak kıkırdak gelişimini içermektedir. Kondrositler, periosteum ve endosteumdaki MKH'lerden türetilmektedir. Üretilen kıkırdak matrisi mineralize olmaktadır ve ardından kondrositler apoptoza uğramaktadır. Osteoklast ve kan damarı istilası ardından, osteoblast kaynaklı kemik oluşmaktadır. Kırık onarımı, yaralanma bölgesindeki dış etkenlere açıktır.

2.11. Kırık Onarım Aşamaları

Uzun kemiklerin sekonder kırık iyileşmesi, sırayla meydana gelen dört ayrı aşamada gerçekleşmektedir.

2.11.1. İnflamasyon Fazı

Kemikte travma meydana geldiğinde, kemiğin devamlılığı ve vasküler beslenmesi bozulmaktadır. Travma neticesinde kemikte yaralanma bölgesinde bir hematoma oluşmaktadır. Kemiğin iyileşmesinde etkili iki faktör hematomdan kaynaklanmaktadır. İlk olarak, yumuşak doku ve kemik doku arasını dolduran hematoma, mekanik stabiliteyi sağlamaktadır. İkinci olarak, olgunlaşmamış kondroblast ve osteoblast hücrelerinin diferansiyasyonunu sağlayarak olgun hücrelere dönüştürmektedir [56].

Komşu Havers kanal sisteminde, komşu olan kanalların arasında az sayıda anastomoz oluşumuna bağlı olarak kırık uzantıları arasında belli alanda dolaşım ve beslenme sağlanamamaktadır. Dolaşımdaki bozulmaya bağlı olarak bu alandaki osteositler lizise uğramaktadır ve boş lakunalar oluşmaktadır. Sonuçta fraktür bölgesinde, kemikte daha fazla olacak şekilde nekroz alanı oluşmaktadır. Fraktür fragmanları arasında 1-5 mm civarında nekroz görülmektedir.

Esas olarak monositler/makrofajlar tarafından salgılanan İnterlökin (IL)-1, aynı zamanda fibroblastlar, sinoviyositler, osteoblastlar ve kondrositler tarafından da salgılanmakta olup, α ve β olmak üzere iki formda bulunmaktadır [70]. İn vitro kemik rezorpsiyonunda güçlü bir uyarıcı olan IL-1, bu etkiyi osteoklastları etkileyerek doğrudan, RANKL üretimini uyarma yeteneği aracılığı ile de dolaylı olarak göstermektedir [71–73]. IL-1 üretiminin, RANKL ve 1,25-dihidroksivitamin D3 ile uyarılan osteoklast oluşumuna aracılık ettiği bildirilmektedir [74–76]. IL-1 ayrıca kemikte prostaglandin sentezini de arttırmaktadır [73, 77]. IL-6'nın kemik rezorpsiyonunu, hücre kültüründe osteoklast oluşumunu ve osteoklastojenik faktör olan RANKL'in ekspresyonunu uyarak arttırmaktadır [78, 79]. Proinflamatuvar sitokin olan TNF- α 'nın serum kalsiyumunu arttırdığı, osteoklast oluşumunu ve kemik rezorpsiyonunu uyarmaktadır [80, 81].

Kemik remodelinginde osteoklast ve osteoblast arasındaki etkileşimde önemli rol oynayan ve hücre yüzey proteinleri olarak adlandırılan faktörlerden en önemlileri; RANK,

RANKL ve OPG'dir [82, 83]. TNF; RANKL sekresyonu ile RANKL/OPG oranını değiştirerek, kemik iliği kültüründe osteoklast benzeri hücrelerin oluşumunu arttırmaktadır [71, 84]. TNF ile ilişkili RANKL ve bu ligandın iki reseptörü olan RANK ve OPG'nin remodeling sürecine dahil olduğu bildirilmektedir [84]. OPG, RANKL bağlanması için RANK ile rekabet eden ve osteoblastik hücreler tarafından üretilen bir tuzak reseptördür [84]. OPG'nin RANKL'a bağlanması RANK'ın aktivasyonunu önlemenin yanı sıra; osteoklast oluşumunu, kemik ve kök yüzeylerine osteoklastların yapışmasını, osteoklastların aktivasyonunu ve hayatta kalmasını baskılar, ayrıca osteoklast sayısını hızla düşürür ve bu hücrelerin apoptozunu arttırmaktadır [85, 86].

2.11.2. Granülasyon Dokusu Fazı

Kırık hattında oluşan hematoma lokal faktörlerin uyarısıyla inflamatuvar hücreler tarafından, organize edilmektedir. Organizasyon ve diferansiyasyon sonucu oluşan yumuşak granülasyon dokusu kırık bölgesinde stabilite sağlamaktadır. Periostun kırık hattına yakın derin tabakasında, kallusu yapacak olan hücre proliferasyonu kırığın ikinci gününden itibaren başlamaktadır. Periostla kemik arasında biriken osteoprogenitör hücreler, diferansiye olarak çoğalıp periostu kemikten bir miktar uzaklaştırmaktadır. Kapiller tomurcuklanma da osteojenik hücrelerin çoğalma sürecine paralel olarak başlamaktadır. Kapiller gelişim osteojenik hücre gelişimi kadar hızlı olmadığından dolayı beslenmenin daha iyi olduğu kemiğe yakın derin seviyedeki hücreler osteoblastlara dönüşmektedir. Granülasyon dokusunun üst kısmı dolaşım yönünden fakirdir. Kapiller gelişim hızının hücre çoğalmasına uyum gösteremediği bu bölgede, hücreler kondrositlere farklılaşmaktadır. Bu gelişim sürecine bağlı olarak dış yüzeyde kıkırdak dokusu oluşmaktadır. Kırık bölgesinde osteoblastların bulunduğu yerde osteoid doku oluşurken fibrin matriksten kaynaklanan kıkırdak dokusu da aynı anda gelişmektedir. Osteoblast ve kondrositler tarafından yapılan osteoid doku ve kıkırdak matriks, mineralizasyon için hazırlanmış olmaktadır [87–91].

2.11.3. Kallus Fazı

Kallus evresinde, kıkırdak matriksin ve osteoid dokunun mineralizasyonu gerçekleşmektedir. Osteoid dokunun mineralizasyonunu, osteoblastlar yapmaktadır. Osteoblastlar, kalsifiye doku içinde kalarak osteositlere dönüşmektedir. Osteoblastlar, tropokollajen salgılayarak kollajen liflerin dizilimini de düzenlemektedir. Kalsiyum iyonlarının çökelmeye başlamasından sonra sert kallus oluşmaktadır.

Kallus oluşumu iki yolla olmaktadır. Periost eksternal kallusun oluşumunda önemli etkindir. Öncelikle çevresel bir köprü oluşturarak kırık iyileşmesini hızlandırmaktadır. Kıkırdığın kalsifiye olmasıyla kondroblastlar kondrositlere dönmektedir. Osteoblastların sayısı artmaktadır ve bu aşamada osteoklastlar görülmektedir. Eksternal kallusla aynı zamanda, internal kallus oluşumu, endosteum kaynaklı osteoblastlar tarafından kırık uçları arasında oluşmaktadır. Bu bölgede kanlanma daha iyi olduğu için nekroz azdır ve fibrokartilaj yoktur. Fibrokartilaj kallus, mezenkimal hücre farklılaşması sonucu oluşmaktadır. Kıkırdak için spesifik olan tip-2 kollajen ve hyolüranik asit, büyüme faktörü-2'nin salgılanmasıyla üretilmeye başlamaktadır. Osteoblastların oluşmasını damarlanmanın kıkırdak kallus içerisinde artması sonucu bölgeye daha fazla besin ve oksijen taşınması sağlamaktadır. Oluşan osteoblastların salgıladığı osteoid maddenin periferden merkeze doğru kalsifikasyonu sonucunda kemik oluşmaktadır. Kallus fazında oluşan kemik primer kemiktir [92, 93].

2.11.4. Yeniden Yapılanma Fazı

Kemik iyileşmesinin en uzun süren fazıdır. Mikroskobik olarak düzensiz fakat mekanik olarak kuvvetli olan kallus, normal kemiğin lameller içeriği ile değişmektedir. Kallus dokusu, kemik iliğinin bulunduğu bölgedeki osteoklastlar tarafından rezorpsiyona uğramaktadır ve kemik dokusu görünümünü kazanmaktadır [92, 93].

2.12. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Fragmanların pozisyonu, travmanın şiddeti, yumuşak doku hasarının derecesi, kemik tipi, bölgenin vaskülarizasyonu, enfeksiyon, dokudaki nekroz, hareketsizlik gibi lokal faktörlere ek olarak, sistemik hastalıkların varlığı, yaş, kalsitonin, paratiroid, insülin, büyüme hormonu gibi hormonlar, A, C ve D vitaminleri ve egzersiz gibi genel faktörler kemik iyileşmesini etkileyen faktörlerdendir [94].

2.12.1. Lokal faktörler

Travmanın şiddeti iyileşmeyi etkileyen önemli bir etmendir. Kemikte ve yumuşak dokuda kayıp görülmesi kırık iyileşmesini negatif etkilemektedir [95].

Fragmanlar arasında oluşan kallustaki beslenme, granülasyon dokusu ve fraktür alanına gelen difüzyon yoluyla ve kan damarları aracılığıyla olmaktadır. Fragman uçları arasındaki uzaklığın artması dolaşımın bozulmasına neden olarak iyileşmenin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. Fraktür bölgesinde yumuşak dokuda da hasar varsa açık kırık oluşmaktadır. Açık kırıklarda kallusu ve osteoblastik aktiviteyi yapacak olan kırık hematomu ortadan kalkabilmektedir. Açık kırıklarda bakterilerin fraktür bölgesine penetrasyonuna bağlı olarak enfeksiyon gelişebilmektedir. Oluşacak bir enfeksiyon, fraktür iyileşmesini tamamen bozabilmektedir veya geciktirebilmektedir. Enfeksiyonun varlığı kemikleşme dönemindeki dokularda ve granülasyon dokusunda tahribat oluşturmaktadır. Bu bölgede fibröz doku gelişerek kemik iyileşmesini bozmaktadır [96]. Açık kırıklarda var olan oluşan yumuşak doku hasarına bağlı olarak bozulan vaskülarizasyon ve dokuların beslenme eksikliği gelişmektedir. Yumuşak dokularda oluşan hasar, kırığın tesbitini zorlaştırarak iyileşmeyi güçleştirmektedir [95].

Fraktür alanında gerekli stabilizasyon sağlanamadığı durumlarda, fragmanlar hareket ederek vaskülarizasyon bozulmaktadır. Oluşan hareketlilik bölgedeki yeni damarlarda parçalanmaya neden olarak kemik doku iyileşmesinin bozmaktadır [97]. Bunlara ilaveten radyoterapiye bağlı direnci azalan kemiklerde, kemik dokuda dejenerasyona sebep olan tümör varlığı, enfeksiyon oluşumu, metabolik hastalıkların varlığı kırılabilirliği arttırmaktadır. Fraktür bölgesindeki herhangi bir sinirsel yapının hasarı da iyileşmeyi olumsuz etkilemektedir [95].

Kemik iyileşme hızı kompakt kemikte spongioz kemiklere kıyasla daha yavaş gelişmektedir. Bunun nedeni kortikal kemikte ise temas yüzeyi, vaskülarizasyon ve hücre sayısı daha azdır. Kırığın yönüne göre bakıldığında deplase olmayan, damarların devamlılığının bozulmadığı spiral ve oblik iyileşme, enlemesine gelişen damarların aynı düzeyde kesintiye uğraması sonucu beslenmenin bozulduğu kırıklara göre daha iyidir [96].

2.12.2. Genel faktörler

Kemik iyileşmesini etkileyen genel faktörler arasında; hormonal faktörler, yaş ve alışkanlıklar, sistemik hastalıklar, beslenme, ilaçlar bulunmaktadır.

2.12.2.1. Hormonal faktörler

Antioksidan enzim regülasyonunu sağlayan ve serbest oksijen radikallerini baskılayan melatoninin, kırık iyileşme sürecine olumlu etkileyebileceği düşünülmektedir [98].

PTH polipeptid yapıdadır. Paratiroid bezinin esas hücrelerinden salınmaktadır. Kemik dokuda osteoklast hücre sayısını arttırmaktadır. Kalsitriolün de varlığında, kemik yıkımını indükleyip serum kalsiyum ve fosfat seviyelerini arttırmaktadır. Osteoblastları etkileyerek fonksiyonlarını ve sayılarını arttırıp kemik yapımını indüklemektedir. Kansellöz kemik oluşumunu olumlu etkilemektedir. Sonuç olarak PTH, fraktür iyileşmesinin yavaşlamasına ve kemik kaybına neden olmaktadır [99].

Kalsitonin, polipeptid yapılı olan tiroid glandının parafoliküler hücrelerden salınan PTH'nun antagonisti olarak işlev gören bir hormondur. Kalsiyum ve fosfat seviyelerini plazmada azaltarak, kemik yıkımını önlemektedir. Osteoblastik aktiviteyi arttırmaktadır. Kansellöz ve kortikal kemik yapımı artışı sağlanmaktadır. Kalsitoninin dozu ile yeni kemik dokusu oluşumu arasında korelasyon bulunmaktadır. Kemik iyileşmesindeki olumlu etkisinin mekanizması açıklanamamaktadır.

Östrojen hormonu, ovaryumdan salgılanmaktadır. Kemik yıkımını azaltarak kemik kaybını önlemektedir. Östrojen eksikliğinde, osteoporoz oluşma ihtimali artmaktadır [100].

Tiroid hormonu, kemiğin yeniden şekillenmesinde paratiroid hormona benzer görevler almaktadır. Fraktür iyileşmesinde önemli olduğu ileri sürülmektedir. Tiroid hormon tedavisi alan hipotiroidi durumlarında, uzun dönem kullanımlarda fraktür riski ve osteoporoz olma ihtimali artabilmektedir.

Growth hormon hipofiz bezinin ön lobundan salgılanmaktadır. Proteine bağlı kalsiyuma etki ederek kırık iyileşmesini olumlu şekilde etkilemektedir ve iyileşme hızını arttırmaktadır. Kallus hacmini ve kemik iyileşmesini arttırmaktadır. İnsülin hormonu da büyüme hormonuna benzer etkilere sahiptir ve iyileşmeyi arttırmaktadır.

2.12.2.2. Beslenme

Fraktür iyileşmesinde, proteoglikan, matriks, kollagen, ve makromoleküller sentezlenmektedir ve yüksek miktarda karbonhidrata ve proteine gereksinim duyulmaktadır.

Kemik, beslenme faktörlerine özellikle büyüme çağında oldukça hassastır. Proteinden fakir diyetle bağlı olarak osteoblastların kollajen sentezi azalmaktadır [101].

Kemik iyileşmesinde D vitamini ve kalsiyum iyonu en önemli role sahip faktörlerdir. Kalsiyum eksikliğinde matriks yetersiz mineralize olmaktadır. Kalsiyum ve fosfatın gastrointestinal sistemden emilimini D vitamini, arttırmaktadır. Osteoid dokunun kalsifikasyonunu ve maturasyonunu D vitamin uyararak kemik yapımını indüklemektedir [101].

Mezenkimal hücre farklılaşmasını indükleyen Vitamin A kemik iyileşmesinde rol oynamaktadır. Vitamin A yoksunluğunda, osteoklast ve osteoblast fonksiyonunda bozulmaya ek olarak kemik yapımında yavaşlama tespit edilmektedir. Vitamin A fazlalığında osteoklast diferansiyasyonunda artış ve kırık dokuda erozyon, oluşmaktadır. Sonuç olarak kırık iyileşmesinde yavaşlama oluşmaktadır [101].

Vitamin C kemik iyileşmesine indirekt katkı sağlamaktadır. Primer olarak osteoblast ve osteosit hücrelerinin ürettiği kollajen sentezinde görev almaktadır. C vitamini eksikliğinde kemik dokuda büyüme ve iyileşme olumsuz olarak etkilenmektedir [102].

2.12.2.3. Sistemik hastalıklar

Beslenme bozukluklarına neden olan gastrointestinal sistem hastalıkları, anemi, diyabet, raşitizm ve tüberküloz fraktür iyileşmesini geciktiren hastalıklardandır. Diyabette, kemik iyileşmesi, osteoblastları aktive eden faktörlerin sentezinde azalmasına bağlı olarak bozulmaktadır [103].

2.12.2.4. İlaçlar

Romatoid artrit, otoimmün deri hastalıkları, sistemik lupus eritematozus, cushing sendromu gibi uzun süreli steroid kullanımını gerektiren hastalıklar kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir [104].

Yüksek dozlarda indometazin kullanımının kırık iyileşmesini durdurduğu bilinmektedir. Kondroitin sülfat ve hyalüronidaz iyileşmeyi olumlu yönde etkilemektedir. Deneysel çalışmalarda klonidin ve L-Dopa büyüme hormonu miktarını arttırarak, fraktür iyileşmesini sağlamaktadır [103].

Non steroid antienflamatuar ilaçlar, osteoblast hücreleri üzerinde prostoglandinlerin aktivasyonunu inhibe ederek iyileşmeyi geciktirmektedir. Heparinin osteoklastları arttırıp, osteoblast yapımını azaltarak kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkiye neden olduğu düşünülmektedir [105]. Nitrik oksit kullanılarak yapılan çalışmada, fraktür iyileşmesinde histolojik kesitlerde ve radyolojik incelemelerde olumlu sonuçlar bulunmaktadır [106].

2.12.2.5. Alışkanlıklar

Yapılan klinik çalışmalarda sigara kullanımının iyileşmeyi olumsuz etkilediği bildirilmektedir. Tavşan tibialarında yapılan osteotomide, nikotin grubundaki deneklerde kontrol grubuna kıyasla iyileşme gecikmektedir. Nikotinin kanlanmayı bozarak otojen kemik greftinin iyileşmeyi inhibe ettiği gösterilmektedir [107].

2.12.2.6. Yaş

Sert doku oluşumu, iyileşmede görevli hücrelerin yenilenmesi ve hasarlı alanın remodellingi yaşlandıkça yavaşlamaktadır [107].

2.12.2.7. Biyokimyasal faktörler

Kemik iyileşme sürecinde makrofajlar ve fibroblastlar ile birlikte büyüme faktörleri ve bazı proteinler sentezlenmektedir. Hücre farklılaşması, göçü, çoğalması ve yıkım arasındaki denge salgılanan bu proteinler aracılığıyla yönetilmektedir. Kemik iyileşmesinde görev alan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), kemik morfojenik protein (BMP), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) kemik uyarıcı faktörlerden en çok bilinenleridir. Bu faktörler klinik çalışmalarda sınırlı olarak kullanılsa da rutin olarak kullanılmamaktadır [108].

2.13. Kemik İyileşmesinin Arttırılması

Kırık tedavisindeki ilerlemeler sonuçları iyileştirmeye devam ederken, en iyi koşullar altında kırık iyileşme süreleri genellikle aylar sürmektedir. Bunun hastalar ve aileleri için yüksek kişisel ve ekonomik sonuçları olabilmektedir. Bu durum sağlık sistemi üzerindeki

maliyeti artırmaktadır. Kırık iyileşmesini hızlandırmak ve gecikmiş kaynama veya kaynamamayı önlemek amacıyla birçok yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden bazıları lokal olarak uygulanan yöntemler bazıları sistemik etkili medikal ajanlardır.

2.13.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kullanılması

MKH'ler ilk olarak 1990'larda yetişkin multipotent progenitör hücreler olarak tanımlanmaktadır. Kök hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soylara farklılaştığı gösterilmektedir [109, 110]. İlk başta MKH'lerin yalnızca kemik iliğinde bulunduğu varsayılmaktadır. Bu varsayım daha sonra, çalışmalar yağ dokusundan [111], periosteumdan [112, 113] veya kastan [114] ve kemik iliğinden türetilen MKH'lerle aynı üç soylu farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını göstermektedir. MKH'lerin artık her yerde dağıtıldığı ve farklılaşma kapasiteleriyle çeşitli soylara ayrıldığı bilinmektedir. Kırık iyileşmesi ile ilgili olarak, son bilgiler daha çok büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanmasının düzenleyici bir fonksiyonu bulunmaktadır. Dolayısıyla lokal inflamatuvar ortam kontrol edilmelidir [115].

2.13.2. İlaçlar

2.13.2.1. Antirezorptif ajanlar

Antirezorptifler, osteoporotik sendromun tedavisinde birinci basamak tedavi ajanlarını temsil etmektedir. Bunlar arasında bisfosfonatlar, seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM'ler), östrojenler, kalsitonin ve RANK ligand inhibitörleri bulunmaktadır.

Bifosfonatlar

Osteoporoz tedavisinde en yaygın kullanılan ajanlar olan bifosfonatlardır. Kemik rezorpsiyonunu ve ardından kemik oluşumunu azaltarak kemiğin yeniden şekillenmesinin in vivo inhibisyonu yoluyla osteoporotik kırıkları önleyebilmektedir. Kemiğin yeniden şekillenmesi, kallus oluşumundan yeni kemik dokusunun organizasyonuna doğru olayların ilerlemesi kırık iyileşmesinde son derece önemli olduğundan, kırık onarımının desteklenmesinde bifosfonatların yararlılığı konusunda tartışmalar mevcuttur. Ayrıca,

bifosfonat tedavisine uzun süreli maruz kalma, atipik kalça kırığı riskinin artması ve ilaca bağlı osteonekrozla ilişkilidir [116].

2.13.2.2. Kemik oluşturuıcı ajanlar

Kemik rejenerasyonunun lokal olarak arttırılmasına alternatif olarak sistemik anabolik ajanların kullanımı kapsamlı bir araştırma altındadır. Anabolik ajanlar, pozitif bir kemik dengesi ile birlikte kemiğin yeniden şekillenmesinde genel bir artışın bir sonucu olarak kemik kütlesini artırarak kemik gücünü artıran bir madde olarak tanımlanmaktadır. PTH peptidleri, Stronsiyum ranelat ve Kalsiyum algılayan reseptör antagonistleri bu ajanlardan bazılarıdır.

Mevcut kanıtlar PTH peptidlerinin kırık iyileşmesinde olumlu bir rol oynadığını göstermektedir. Şu anda iki PTH molekülü, PTH 1-34 (teriparatid) ve PTH 1-84, osteoporotik hastalarda anabolik ajanlar olarak pazarlanmaktadır. Osteoporotik hastalara günde bir kez deri altından enjekte edildiğinde süngerimsi kemik oluşumunu, kemik mineral yoğunluğunu artırır ve kırıklı kırık riskini azaltmaktadır [117, 118].

2.13.3. Bitkisel Tedavi

Birçok ülkede kemik rezorpsiyonunu azaltmak ve kemik iyileşmesini artırmak için birçok şifalı bitki uzun süredir kullanılmaktadır. Bitkilerden elde edilen bu doğal ilaçlar, sentezlenmiş ilaçlara göre daha az yan etkiye sahiptir ve uzun süreli kullanıma daha uygundur. Çok sayıda kimyasal bileşen içeren bitkisel ilaçlar genellikle terapötik etkilerini çoklu yollardan göstermektedir ve çoklu hedeflere sahiptir [119]. Genel olarak, doğal bileşikler veya bitkisel ilaçlar etki mekanizmalarına göre 3 grup olarak tanımlanmıştır. Bu etki mekanizmaları, antiinflamatuvar, antioksidan özellikler ve östrojen benzeri aktivitedir [120].

Bitki kaynaklı fitoöstrojenler, memeli östrojenlerine benzer şekilde etki gösterebilmektedir [121]. Fitoöstrojenler olarak sınıflandırılan molekül aileleri bazı flavonoidleri, izoflavonları ve lignanları içermektedir. Daidzein ve genistein en yaygın olarak bulunan iki soya izoflavonudur.

Reaktif oksijen türleri (ROS), yeterli düzeyde antioksidanla dengelenemediği zaman fazla miktarda ortaya çıkmaktadır. Bu durumun kemik kaybı sürecinde etkili olduğu görülmektedir. ROS, osteogenezi inhibe etmektedir. Osteositlerin ve osteoblastların apoptozunu başlatmaktadır. Antioksidanlar, osteoklast aktivitesinin azaltılmasını, osteoblastların farklılaşmasını ve mineralizasyonu sağlamaktadır. Bu işlevlerini, doğrudan veya oksidanların etkisine karşı koyarak gerçekleştirmektedir [121]. İlerleyen yaşla birlikte kronik inflamasyonda, kemik erimesi sürecinde kemiğin yeniden şekillenmesini etkileyerek önemli bir rol oynamaktadır. IL-1, IL-6 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a), RANKL varlığında osteoblast işlevini azaltmaktadır. Osteoklast oluşumuna neden olmaktadır [122]. Kemik iyileşmesi üzerinde etkili doğal bileşikler genistein, daidzein, icariin, dioscin, akteozit, kurkumin, resveratrol, kinenosid, berberindir. Etkilerini birden fazla etki mekanizmasıyla gösteren tedaviler arasında bitkilerden izole edilen ana aktif bileşen kinsenaside ve birçok bitkide bulunan bir izokinolin alkaloidi olan berberin bulunmaktadır.

2.14. Berberin

Berberin (BBR) içeren bitkilerin kullanımı Ayurvedik ve Çin tıbbında 3000 yıl öncesine dayanmaktadır. BBR, *Berberis vulgaris* (kızamık), *Berberis aristata* (zerdeçal ağacı), rizomlarda ve gövde kabuklarında doğal olarak bulunan bir izokinolin alkaloididir((2,3-metilendioksi-9,10-di-metoksiprotuberberin). Molekül ağırlığı 336.361 olan C₂₀H₁₈NO₄⁺ kimyasal formülüne sahiptir [123].

2.14.1. Farmakokinetik ve Farmakodinamik

BBR'nin oral biyoyararlanımı, ilk geçiş eliminasyonu, zayıf suda çözünürlüğü ve P-glikoprotein ile etkileşimi nedeniyle düşüktür (<%1) [123–127]. Uygulama şekillerinde (intraperitoneal, intravenöz ve oral) biyoyararlanım açısından anlamlı bir fark bulunmaktadır. BBR, oral kullanılmasının ardından genellikle, bağırsakta beş kat daha emilebilir olan dihidroberberine (dhBBR) haline gelmektedir [128]. Tan ve ark. [129] tek bir oral BBR dozu (200 mg/kg) sıçanlarda uygulamasından sonra, BBR'nin azalan miktar sırasına göre karaciğer, böbrekler, kas, akciğerler, beyin, kalp, pankreas ve yağda hızlı bir şekilde dağıldığı gösterilmektedir. BBR seviyesinin çalışılan dokuların çoğunda uygulamadan 4 saat sonra plazmadakinden daha yüksektir. BBR'nin başlıca metabolitleri jatrorizin, talifendin, berberrubin, ve demetilen berberindir. Bu metabolitler, sıçan

plazmasında glukuronid konjugatları ve serbest olarak var olabilmektedir [130]. BBR ve metabolitleri, ağız yoluyla alındıktan sonra en yüksek yoğunlukta, farmakolojik etkilerinin de gözüktüğü karaciğerde bulunmaktadır. Bir deney modelinde, sıçanlarda aktif taşıma yoluyla bağlanmamış BBR, safraya taşınmaktadır. Karaciğerdeki sitokrom P450 enzim sistemi tarafından faz I demetilasyonu ve faz II glukuronidasyon yoluyla metabolize edilmektedir [131].

Sıçanlarda, BBR dört metabolite (berberrubin, talifendin, demetilenberberin ve jatrorizin) sahiptir. Ağız yoluyla BBR klorür (3 gün boyunca 0,9 g/gün) uygulamasının ardından, sağlıklı yetişkinlerde idrarda üç sülfat metaboliti (talifendin-10 sülfat, jatrorizin-3-sülfat ve demetilenberberin-2-sülfat) gösterilmektedir [132]. Sıçanlarda 200 mg/kg dozda BBR'nin oral uygulanmasının ardından, 48 saat içinde BBR ve metabolitlerinin safra, idrar ve dışkıda toplam %22,83 atılımıyla sonuçlanmaktadır [133]. BBR (%84) ve metabolitlerinin çoğu dışkıyla atılmaktadır. BBR'nin yaklaşık %83'ü safrayla atılırken idrarla atılan miktarın %78'i talifendin ve berberrubindir [134]. Oral veya intravenöz uygulamayı takiben köpeklerde BBR ile farmakokinetik çalışmalar bulunmaktadır [135, 136]. Feng ve ark. [136] 7 gün boyunca tek (50 mg/kg) veya çoklu dozlardan (50 mg/kg/gün) sonra beagle köpeklerinde BBR'nin ve aktif metabolitlerinin farmakokinetiğini incelemektedir. Bu araştırmacılar dhBBR, bütirat ve BBR'nin yanı sıra faz I ve faz II metabolitlerini de ölçmektedir. Sonuçta, dhBBR'nin köpek plazmasında tespit edilmediğini ancak 3. ve 7. günlerde dışkıda küçük miktarlarda atılmaktadır. BBR uygulamasından sonra plazmada ve dışkıda 11 metabolit tespit bulunmaktadır; bunların sekizi faz I metaboliti ve üçü faz II metabolitidir. Plazmadaki BBR konsantrasyonunun düşük olduğunu, C_{maks} 36.88 23.45 ng/mL olduğunu gösterilmektedir. Glukuronik asit konjugatlarının bağıl içeriği, plazmadaki diğer metabolitlerinkinden daha yüksektir. Köpek dışkısında BBR, 3. günde ($2625,04 \pm 1726,94$ µg/g) ve 7. günde ($2793,43 \pm 488,10$ µg/g) yüksek konsantrasyonlardadır. Bağırsak mikrobiyotasının hamster, sıçan ve köpeklerde BBR metabolitlerinin farmakokinetiğini düzenlediği bildirilmektedir [130, 136, 137]. Çok az miktarda değişmemiş BBR idrarla atılmaktadır. BBR metabolitlerinin enterohepatik dolaşımında bağırsak bakteriyel florası rol oynamaktadır. BBR ve metabolitlerine karşı önemli bir metabolik aktivite gösteremeyen bağırsak florasının metabolitlerin enterohepatik dolaşımında önemli bir rol oynayabileceğini vurgulanmaktadır [130]. Karaciğer ve bağırsak bakterileri, BBR'nin in vivo metabolizmasına ve atılmasını etkilemektedir. BBR ve metabolitleri antikanser özellikler sergilediği bildirilmektedir [138–140]. Wang ve ark. [138] polietilen glikol ile

modifiye edilmiş uzun dolaşımli BBR lipozomları hazırlarak bunların potansiyel antitümör ajanlar olarak etkinliklerini ve güvenliklerini değerlendirmekdir. Sonuçlar, BBR'nin antitümör etkilerini güçlendirmek için BBR lipozomlarının, güvenli bir intravenöz ilaç tedavisi sağlayabileceğini ortaya koymaktadır.

2.14.2. Berberinin Güvenliği ve Toksisitesi

Genel olarak, BBR çok düşük toksisite ve yan etki göstermektedir [141, 142]. BBR'nin güvenlik verileri, oral LD50'sinin fare ve sıçanlarda sırasıyla >29.586 ve >15.000 mg/kg olduğunu bildirmektedir. Farelerde intraperitoneal (IP) ve intravenöz (IV) enjeksiyonlarla uygulanan BBR'nin LD50'si sırasıyla 57.61 ve 9.03 mg/kg [143]. Oral intragastrik BBR dozlarını (83.2, 41.6, 20.8, 10.4 g/kg) takiben, en yüksek iki dozaj grubunda fareler arasında %30'luk bir ölüm oranı bulunmasına rağmen, letal doz 50 (LD50) belirlenmemektedir. Tip 2 diyabet hastalarında, günde 1500 mg'a kadar BBR insanlara herhangi bir ciddi yan etki olmaksızın kullanılabilmektedir. Yüksek dozlarda BBR, kabızlık, gastrointestinal rahatsızlık, kalp hasarı, grip benzeri semptomlar, nefes darlığı, arteriyel hipotansiyon ile ilişkilendirilmektedir [127]. BBR'nin klinik dozlarıyla mutajenik, sitotoksik veya genotoksik etkiler gösterdiği bildirilmemektedir [144]. Berberinin plasentayı geçtiği ve gelişmekte olan fetüse zarar verebileceği ayrıca rahim uyarıcı bir etki gösterdiği de gösterilmektedir; bu nedenle hamilelikte kullanımı için uyarılmaktadır [145]. BBR anne sütü ile geçebilir; bu nedenle emzirirken BBR kullanımı için dikkatli olunmalıdır.

2.14.3. Berberinin Farmakolojik ve Terapötik Potansiyeli

Berberin, antioksidan, antienflamatuar ve mikrozomal ilaç metabolize edici enzim inhibe edici özelliklere sahip olarak çoklu farmakolojik etkiler göstermektedir. Terapötik potansiyeli, bir dizi hastalık ve sendromda kabul edilmektedir.

2.14.3.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

BBR'nin kullanımının faydası Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), anksiyete, depresyon ve epilepside bulunmaktadır [133, 146, 147]. BBR'nin biyoyararlanımı zayıf olmasına rağmen, yeterli konsantrasyonlarda kan-beyin bariyerini geçerek hipokampusta birirmektedir ve burada potasyum kanal bloke edici, antiapoptotik ve

nöroprotektif etkiler göstermektedir [146, 148–150]. Ayrıca BBR, antioksidan, antienflamatuar, analjezik, anksiyolitik, immünomodülatör etkiler gibi farmakolojik ve biyolojik etkiler göstererek nörolojik durumlarda önleyici ve terapötik etkiler sağlamaktadır [133, 151]. BBR'nin, asetilkolinesteraz (AChE) inhibe ederek ve kolinasetil transferaz (ChAT), Süperoksit dismutaz (SOD) ve monoamin oksidaz-B (MAO-B) aktivitelerini, sitokinleri, malondialdehit(MDA) ve farklı beyin bölgelerindeki nörotransmitterleri normalleştirerek öğrenmeyi ve hafızayı iyileştirdiği ve nöronları ölümden koruduğu bildirilmektedir [133, 152–156]. AD'nin sıçan modelinde 14 gün boyunca BBR tedavisinin (50 mg/kg, intragastrik olarak günde bir kez) uzamsal hafıza bozukluğunu iyileştirmektedir. BBR sıçan beyin mitokondrisinde MAO A'yı 126 μ M maksimum inhibitör konsantrasyonunun yarısı (IC50) değeri ile rekabetçi bir şekilde inhibe etmektedir [157]. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde, BBR tedavisi (25–100 mg/kg, po, 30 gün boyunca günde iki kez), AChE seviyesini normalleştirmekte ve oksidatif stresi azaltarak bilişsel performansı iyileştirmektedir [153].

2.14.3.2. Kardiyovasküler Etkiler

BBR, kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmektedir [158–161]. BBR'nin (5 mg/kg, IV) ventriküler taşiaritmiler üzerindeki etkilerini, Xu ve ark. [162] programlanmış elektrik stimülasyonuna (PES) tabi tutulan açık göğüslü köpeklerde araştırmaktadır. Araştırma sonuçlarına göre, BBR ile tedavi edilen altı köpekten dördünde, PES kaynaklı ventriküler taşikardi veya ventriküler fibrilasyon önlenmektedir. BBR, etkili refrakter periyodu ve QT aralığını uzatmaktadır. Bu veriler, BBR'nin köpeklerde miyokardiyal iskemik hasardan sonra ani koroner ölümü ve reentran ventriküler taşiaritmi başlangıcını önlemede etkili olabileceğini düşündürmektedir. Başka bir çalışmada, Huang ve ark. [163], iskemik sol ventriküler yetmezliği olan köpeklerde, BBR tedavisinin (1 mg/kg IV bolus, ardından 30 dakika süreyle 0,2 mg/kg/dk sabit infüzyon) sol ventriküler fonksiyonu, pozitif inotropik etkisi ve hafif sistemik vazodilatasyon etkisiyle iyileştirdiğini bildirmektedir.

Sonuç olarak, BBR vazodilatör, antiaritmik, negatif kronotropik ve pozitif inotropik özellikler göstermektedir ve kalp yetmezliğinde, konjestif kalp yetmezliğinde, aritmilerde ve hipertansiyonda bir nutrasötik olarak kullanılabilir.

2.14.3.3. Antihiperglisemik ve Antidiyabetik Etkileri

Tip 2 diabetes mellitus, diyabetin en yaygın tipidir. Primer olarak proinflamatuvar sitokinler ve azalmış adiponektin sekresyonu nedeniyle, endotel homeostazındaki değişiklikler, insülin direnci ve hiperglisemide iki anahtar olay gibi görünmektedir. Tip 2 diyabette BBR'nin etkili olduğu bildirilmektedir. BBR'nin hipoglisemik bir etki sergilediğini Chen ve Xie [164] bildirmektedir. Bir meta-analizde benzer sonuçları doğrulamaktadır [165]. BBR, diyabette birçok mekanizma ile antihiperglisemik etki göstermektedir:

1. Karaciğerde glukoneogenezi direkt olarak inhibe etmektedir [166, 167]. Ayrıca Yin ve ark. [168], BBR'nin, mitokondride glukoz oksidasyonunun inhibisyonu ve sonuç olarak adenosin monofosfatla aktive edilen protein kinaz (AMPK) aktivasyonunun indüklenmesi ile ilgili olan glikolizin uyarılmasıyla glukoz metabolizmasını arttırdığını bildirmektedir.
2. Adenozin 50-monofosfatla aktive olan protein kinazı aktive etmektedir [166, 168, 169]
3. İskelet kası ve yağ dokusu gibi kandan hedef organlara glukoz alımını artırmaktadır [166]
4. Glukoz taşıyıcı protein 1 gen ekspresyonunu artırarak glukoz taşınmasını indüklemektedir [170]
5. İnsülin reseptör ekspresyonunu arttırmaktadır. İnsülin sekresyonunu ve duyarlılığını artırarak insülin direncini azaltmaktadır [160, 171–174].
6. α -glukosidaz inhibisyonu ile glukoz emilimini azaltır ve bağırsak epitelinden glukoz taşınmasını azaltmaktadır [175]

2.14.3.4. Berberinin Kemik Üzerindeki Etkisi

Berberinin Osteogenez Teşviğindeki Rolü

Kemik matris mineralizasyonunda ve sentezinde osteoblastlar işlev gören temel hücrelerdir. Çeşitli düzenleyici sinyal yolları ve moleküller, progenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını sağlamaktadır [176, 177].

Berberinin Sinyal Yolları Üzerindeki Etkisi

Osteoblastın farklılaşması, kanonik Wingless ilişkili entegrasyon(Wnt)/ β -katenin sinyal yolu tarafından düzenlenmektedir. Wnt sinyal yolu, karmaşık bir protein etkileşim ağıdır. Berberin, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin (BMKH'ler), kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolunu aktive ederek osteojenik farklılaşmasını teşvik edebilmektedir [178]. Berberinin yapısal bir homologunun, Wnt/ β -katenin sinyal yolu yoluyla fare kafatasından türetilen osteoblastların farklılaşmasını engelleyen peroksizom proliferatörüyle aktifleştirilen reseptörün (PPAR) γ ekspresyonunu inhibe edebildiği kanıtlanmıştır [179, 180].

Hücre dışı stimülasyon sinyallerini hücrelere ve çekirdeklerine ileten, mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK), hücrelerde apoptoz, farklılaşma ve proliferasyon gibi biyokimyasal etkilere neden olmaktadır. MAPK yolunun dört ana alt ailesi vardır: ERK5, p38MAPK, ERK ve JNK. Lee ve ark. berberinin, p38MAPKs yolu aracılığıyla anahtar osteojenik transkripsiyon faktörü Runx2 ekspresyonunu aktive edebileceğini, böylece kemik rejenerasyonunu desteklediğini iddia etmektedir [181]. Dental rejenerasyon mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan insan dental pulpa kök hücreleri (DPSC'ler) için, berberinin, kemik oluşumunu desteklemek için MAPK sinyal yolunu (EGFR-MAPK-Runx2) aktive ederek DPSC'ler kemik oluşumunu destekleyebilmektedir [182].

BMKH'ler, sert koşullar veya oksidatif stres nedeniyle, kırık bölgesinde apoptoz riski altındadır. Bu durumda, berberinin anti-apoptotik faktör Bcl-2'nin ekspresyonunu yukarı regüle ederek, proapoptotik faktör bax ekspresyonunun inhibe ederek ve apoptoz yolunda kaspaz-3'ün parçalanmasını sağlayarak BMKH'lerin apoptozunu azaltabilmektedir [183].

Ayrıca, hasarlı kemik dokularının onarımı için BMKH'lerin hedef organlara migrasyonu da büyük önem taşımaktadır. Berberin, bu süreci desteklemektedir [184].

Son olarak, sinyal yolları üzerindeki etkilerine ek olarak, sinyal yolları ile mikroRNA arasındaki etkileşim, işlevlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Berberin, insan alveolar osteoblastlarının (HAOB'ler) çoğalmasını teşvik etmenin ve faktörlerin ekspresyon seviyelerini artırmanın yanı sıra, microRNA-214'ün ekspresyonunu inhibe eder ve HAOB'lerin proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını destekleyebilmektedir [185].

Berberinin Osteojenik Genler ve Faktörler Üzerindeki Etkisi

Sinyal yollarına ek olarak, hücrelerin osteogenetik yeteneği, osteojenik genler ve faktörlerle yakından ilişkilidir. Berberin periodontitis çalışmasında, osteopontin (OPN), alkalın fosfataz (ALP), kollajen I (COL I), osteokalsin (OCN) ve osterix (OSX) gibi BMKH'lerin osteojenik genlerinin ekspresyonunu önemli ölçüde artırabilmektedir [185–187]. Berberinin hem osteojenik hem de antibakteriyel yeteneklere sahip olması nedeniyle berberinin, porphyromonas gingivalis enfeksiyonunun neden olduğu BMKH'lerde osteogenezle ilişkili gen ekspresyonunun aşağı regülasyonunu düzenlediği bildirilmektedir [187].

Kemik rejenerasyonunda Runx2, anahtar osteojenik transkripsiyon faktörüdür. Berberin, Runx2'nin osteopontinin promotör bölgesine bağlanmasını arttırmaktadır [181].

Berberinin Osteojenik Proteinler Üzerindeki Etkisi

Proteinler, sinyal iletiminin veya genlerin ifadesinin ürünleridir [188]. Hücrelerin biyolojik etkileri, proteinler arasındaki etkileşim yoluyla üretilmektedir. Yes-associated protein 1 (YAP1)'in osteoblastlardaki osteoklast inhibitör faktör osteoprotegerin (OPG) ekspresyonunu inflamatuvar stimülasyon altında önemli ölçüde artırabildiği bildirilmektedir. YAP1, Hippo sinyal kaskadının [189] çekirdek aşağı akış efektörü olarak bilinmektedir ve osteoblast, osteoklast farklılaşması ve kemik metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır [190]. Ancak OPG üzerindeki bu aktivasyon etkisi tümör nekroz faktörü (TNF- α) tarafından inhibe edilmektedir [191]. Bu süreç, nükleer faktör kappa B (NF-KB) yolunu inhibe ederek konsantrasyona bağlı bir şekilde berberin tarafından tersine çevrilebilmektedir [191].

Berberinin RANK ve RANKL ve Aşağı Akış Faktörleri Üzerindeki Etkisi

Osteoklast farklılaşması NF-KB reseptörü aktive edici faktör ligandının (RANKL) ana düzenleyicilerden biri olduğu temel faktörler tarafından düzenlenmektedir [192]. Berberin, RANKL ve RANK (osteoklast üzerindeki RANKL reseptörü) kombinasyonunu inhibe ederek RANKL kaynaklı osteoklast farklılaşmasını inhibe edebilmektedir [193]. RANKL ve RANK'ın bağlanması, NF-KB, Akt, JNK, ERK ve p38MAPK gibi osteoklast farklılaşması için gerekli olan birkaç erken sinyal yolunu aktive etmektedir [194, 195]. Bunlar arasında, osteoklast soyundaki hem Akt, hem de NF-KB berberin tedavisine karşı

oldukça duyarlıdır. Berberin, Akt ve NF-KB aktivasyonunu baskılayarak RANKL tarafından indüklenen osteoklast sağkalımını ve osteoklastogenezi inhibe etmektedir [196]. Osteoklastların farklılaşmasına katılan ve düzenleyen sinyal yollarında berberin, Akt, ERK ve p38 fosforilasyonunu, IKb'nin bozulmasını ve PI3K/Akt seviyesini inhibe eder, dolayısıyla Akt, NF-KB, MAPK(p38MAPK ve ERK) gibi osteoklast farklılaşması için gerekli olan çeşitli sinyal yollarının aktivasyonunu baskılamaktadır [196, 197]. Berberinin oral bir formu olan berberin sülfat, RANKL tarafından indüklenen NF-KB aktivasyonunu inhibe edebilmektedir [198].

OPG ve RANKL kombinasyonu osteoklast üretimini azaltacaktır. Berberine, serumdaki OPG içeriğini etkili bir şekilde artırabilmektedir. OPG ve RANKL kombinasyonunu teşvik edebilmektedir. Eşzamanlı olarak berberin, RANK-RANKL-OPG sinyal yolu yoluyla hücrelerin oksidatif stres tepkisini inhibe etmektedir, osteoporoz gelişimini bir dereceye kadar azaltmaktadır [199].

Berberinin, Osteoklast Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Kemik oldukça dinamik bir dokudur. Kemik rejenerasyonu sadece osteoblast rejenerasyonu ve farklılaşması değildir. Kemik rejenerasyonu sırasında, , osteoklastların yeniden şekillenme etkisiyle mekanik olarak düzensiz kollajen liflerinin düzenli kolajen liflerine dönüşümü gerçekleşmektedir [82, 187]. Osteoklastlar, kemik rezorpsiyonunun ana fonksiyonel hücreleridir. Mineralize kemiği absorbe edebilen tek hücre tipidir. Osteoklastlar, mononükleer makrofajlarla kaynaşmış, kemik iliğindeki miyeloid progenitör hücrelerden farklılaşan çok çekirdekli dev hücrelerdir. Osteoklastların hiperaktivitesi, kemik mineral yoğunluğunun azalması, kemik rejenerasyonunun güçlüğü ciddi sonuçlara yol açarak kemik erimesi gibi hastalıklara yol açabilmektedir [193, 200, 201]. Berberin kemik oluşumunu artırarak ve kemik erimesini önleyerek bu hastalıkları önlemedeki engelleyici etkisi ve mekanizması bulunmaktadır [8, 193, 197].

Osteoklastları inhibe etmede berberine ilişkin ilginç bir araştırma yönü, bağırsak bağırsak mikrobiyotasını etkileyerek kemik kaybını değiştirmesidir [202]. Bağırsak florasının östrojen eksikliğine bağlı periodontal kemik kaybı tedavisinde potansiyel bir hedeftir. Berberin, periodontal kemik kaybını iyileştirmek için bağırsak mikrobiyotasını düzenleyebilmektedir.

Bu alışmada, Osteojenik genler üzerinde aktivatör etkili, osteoklastik aktiviteyi azaltan, osteoblastik aktiviteyi artıran ve birçok bitkide bulunan bir izokinolin alkaloidi olan berberinin, kemik iyileşmesi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Yapılan deneysel çalışmada ELISA ve histopatolojik incelemeyle sistemik kullanılan berberinin kliniklerdeki uygulanma potansiyelinin araştırılması hedeflenmektedir.



3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edilen, 4-6 aylık, ağırlıkları 300-350 gr arasında değişen, 35 adet erkek erişkin, Wistar albino rat üzerinde yürütüldü. Çalışmanın içeriği, Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar no:9; Protokol no:2021/038).

Deneyin, hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek ameliyatlarını ve sakrifikasyonlarını içeren deneysel kısım Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezinde, histolojik ve histomorfometrik incelemeleri ise Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Hayvan çalışmalarında güç (power) analizi ve örneklem sayısı önemli bir faktördür. Çalışmada başlangıç aşamasında, örneklem sayısı, çalışmanın gücüne göre belirlenmelidir. Az sayıda üzerinde çalışma yapmak, çalışmadan elde edilecek sonuçların gücünü azaltırken; gereğinden fazla örneklem incelemek ise boş yere emek ve zaman kaybı ile kaynakların zayı olmasına sebep olmaktadır. Deney hayvanlarında yapılacak çalışmalarda power değerini çok az veya çok fazla planlamak çalışmada lüzumsuz yere hayvan kullanımına neden olmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı örneklem sayısını güç değerini optimum (%80) tutarak belirlemek, etik açıdan oluşabilecek tüm olumsuzlukları ortadan kaldırmaktadır. Uygulanacak istatistiksel yöntem ve daha önce yapılmış benzer çalışmalar çalışmamızda kullanılacak hayvan sayısına karar verilirken belirleyici oldu, gerekli minimum örneklem sayısı güç değeri optimum tutularak belirlendi.

Çalışma süreleri boyunca bağıl nem oranı %40-60 ve 21 ± 10 C sıcaklıkta tutulan ratlar, ışık periyodu 12 saat karanlık 12 saat aydınlık standartını sağlayacak şekilde muhafaza edildi. Kullanılan deney hayvanları, %21 protein içeren standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi.

Hayvanların yaşam kaliteleri ve post-operatif bakımları düşünülerek her bir ratta tek tibiada, tek kemik defekti açılarak işlemler gerçekleştirildi. Bu amaçla ratların sağ tibiaları çalışmaya dahil edildi.

3.1. Çalışma Gruplarının Tanımlanması

Çalışmaya dahil edilen 35 adet Wistar albino rat, her grupta 7 adet rat olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı ve gruplar oluşturuldu.

Gruplar

Tablo 1. Çalışma gruplarının gösterilmesi

	Defekt		n
Kontrol	(+)	Kemik defekti olan, ilaç tedavisi almayan	14
Deney	(+)	Kemik defekti olan ve ilaç tedavisi alan (Berberin)	14
Çalışmamızda ek olarak biyokimyasal ve histopatolojik analizlerde referans değer oluşturması için 7 hayvandan oluşan defekt oluşturulmayan berberin almayan grup oluşturuldu.			

Tablo 2. Çalışma alt gruplarının gösterilmesi

	Ana Gruplar	
Alt gruplar	Kontrol grubu	Deney grubu
14.gün	7	7
28.gün	7	7
Toplam	14	14

Çalışmamızda deneklerde herhangi bir defekt bölgesi ve ilaç uygulaması yapılmayan biyokimyasal ve histopatolojik analizlere referans tespit edilmesi için grup oluşturuldu. Ayrıca histolojik olarak herhangi bir analiz yapılmadığından dolayı herhangi bir alt grubu da bulunmamaktadır. Bu gruptaki deneklerden çalışmanın sonunda kan alınarak, serum örnekleri ve cerrahi işlem uygulanmamış tibiaları elde edilerek sağlıklı ve hiçbir işlem görmemiş deneklerden standart biyokimyasal veriler ve histopatolojik incelemede karşılaştırmalı sağlıklı doku örnekleri elde edildi. Bu grup; diğer gruplarda uygulanan cerrahi işlem ve berberin kullanımının biyokimyasal parametreleri nasıl etkilediğinin analiz

edilebilmesi amacıyla çalışmamıza dahil edildi. Çalışmanın standardizasyonu açısından bu grubun en son sakrifiye edilecek deney ve kontrol gruplarıyla birlikte sakrifiye edilmesi planlandı.

Kontrol grubu: Bu gruptaki ratların sağ tibialarında kemik defekti oluşturulması haricinde herhangi bir uygulama yapılmadı. Çalışmanın standardizasyonunun sağlanması açısından sakrifiye edilecekleri güne kadar günde 1 kez olacak şekilde gavaj yoluyla serum fizyolojik verildi. Her bir alt grubun sakrifiye edileceği gün gruptaki deneklerden kan alındı, serum örnekleri elde edildi ve histolojik analizler için örnekler alındı.

Deney Grubu: Bu gruptaki ratlara benzer şekilde tibia defekti oluşturuldu ve sakrifiye edilecekleri güne kadar günde 1 kez olacak şekilde gavaj yoluyla 100 mg/kg/gün dozunda berberin uygulandı. Deney bitiminde herbir alt grubun sakrifiye edildiği gün, gruptaki deneklerden kan alındı, serum örnekleri elde edildi ve histolojik analizler için örnekler alındı.

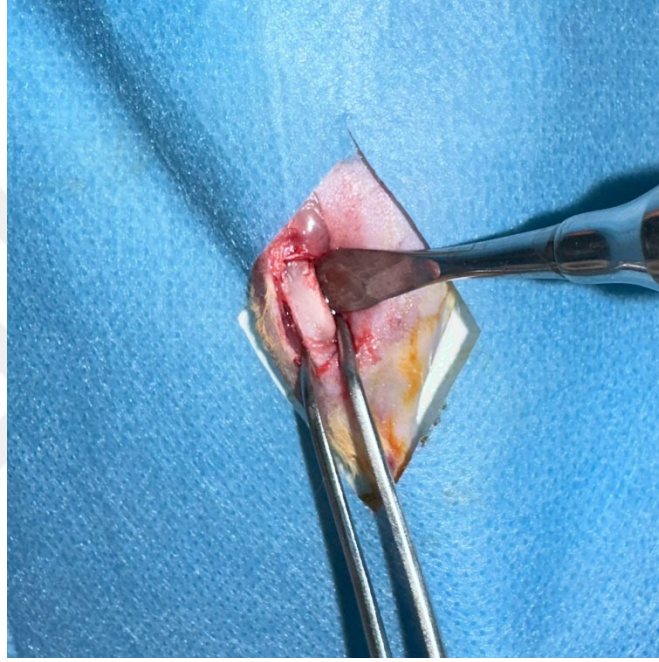
3.2. Cerrahi Aşamalar

Deneklerin genel anestezisi, veteriner hekim gözetiminde, 75-90 mg/kg ketamin hidroklorid ve %2'lik 5-8 mg/kg Ksilazin hidroklorid intramüsküler (IM) enjeksiyonu ile sağlandı. Sıçanlar lamba altında masaya yatırıldı.



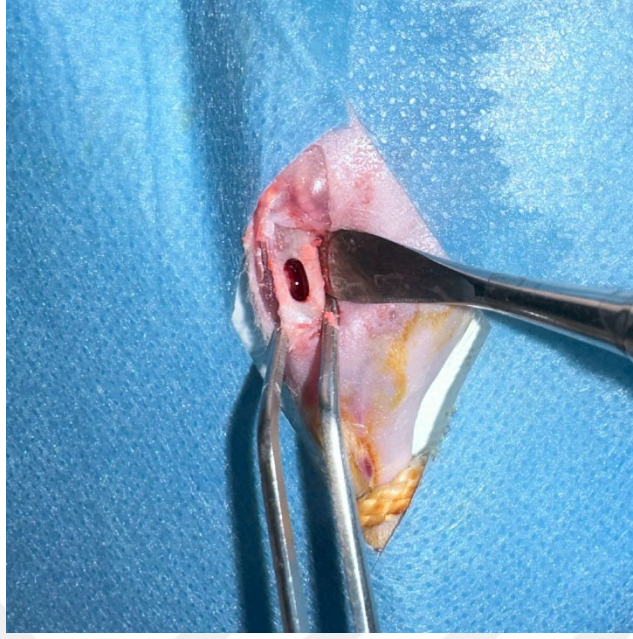
Görsel 1. Sıçanların bacağına işlem öncesi tıraşlanması

Ratlar genel anestezi sağlandıktan sonra, standart pozisyona getirilip sabitlendi. Sağ bacaklarının medial yüzeyi tıraşlandı (Görsel 1). Jetokain (Adeka 2ml; Türkiye) lokal anestezi uygulandı. Tıraşlanan bacaklar asepti ve antisepti kurallarına uyularak, fleksiyona getirilip, insizyon hattı belirlendi. Orta hatta Bard-Parker 15 no'lu bistüri ucu kullanılarak tibianın medial yüzeyine ulaşmak için 15 mm uzunluğunda dikey cilt, cilt altı ve periost kesisi yapıldı. İnsizyon sonrasında periost elevatörü ile subperiostal olarak flep kaldırılıp ve kemik açığa çıkartıldı (Görsel 2).



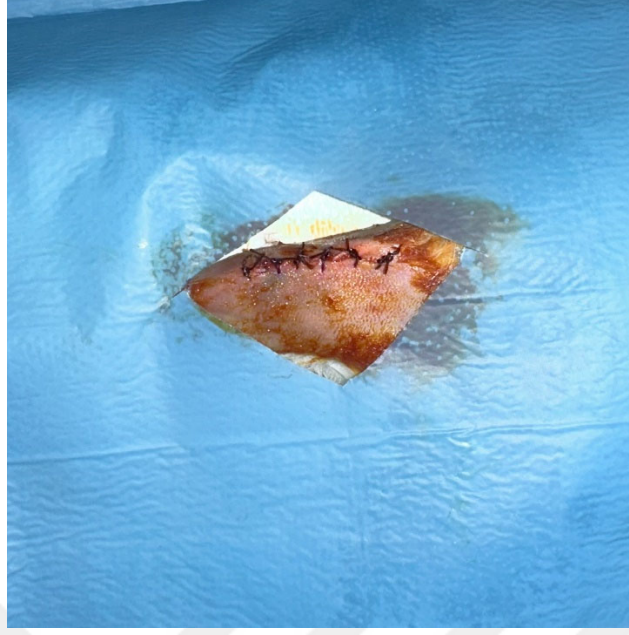
Görsel 2. *Kemiğın açığa çıkartılması*

Kemiğın kolaylıkla görülebildiğı rahat bir çalışma ortamının sağlanması sonrası fizyodispanlere bağı mikromotor- anguldurva 200-400 devir/dakikada ucundaki trefan frez ile steril serum fizyolojik irrigasyonu altında 5mm kemik defekti oluşturuldu (Görsel 3).



Görsel 3. *Oluşturulan defektin görünümü*

Açılan defektler periodontal sonda yardımı ile kontrol edildi. Bu işlemler esnasında defekt alanı içerisindeki kemik, doku penseti yardımıyla blok halinde çıkarıldı. Her bir gruptaki işlem bitirildikten sonra oluşturulan defekt etrafındaki periost ve kas 4-0 mm'lik 20 mm yarı yuvarlak iğneli vikril dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Türkiye) ile suture edildi. Suture sonrası yarı yuvarlak 3-0 mm'lik 20 mm yarı yuvarlak iğneli ipek dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Türkiye) ile primer olarak suture edildi (Görsel 4).



Görsel 4. *Cildin primer olarak sütüre edilmesi ve batikon uygulanması*

Ratlarda sütüre edilen alanlar Batikon (povidon iyot solüsyonu) (Bonmed Sağlık Ürünleri ve Makine San. Tic. Ltd. Şti., Türkiye) ile yapıldı (Şekil 3.16). Postoperatif enfeksiyonu kontrol altına almak amacıyla 30 mg/kg Sefazolin operasyon sonrası intramüsküler (IM) olarak uygulandı. Denekler metal kafeslerde uyanma odasına alındı ve post-operatif dönemde ağızdan beslenen deneklere ameliyattan sonraki ilk beş gün boyunca, günde 1 kez olmak üzere 30 mg/kg Sefazol (IM) ve Carprofen 4 mg/kg subkütan olarak uygulandı.

3.3. Berberin Uygulaması

Çalışma kapsamında operasyon gününden itibaren, günlük 100 mg/kg/gün berberin(Kenay GmbH (Berlin, Almanya)) solüsyonu deney gruplarına oral gavaj yöntemiyle her gün aynı saatte olacak şekilde uygulandı (Görsel 5). Kontrol gruplarına plasebo (NaCl 0.9% salin solüsyonu verildi.

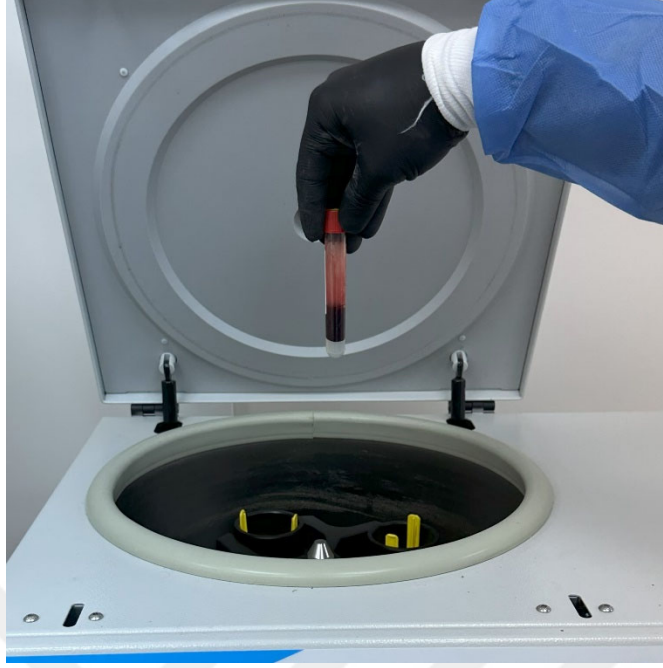


Görsel 5. *Gruplara oral gavaj uygulanması*

3.4. Örneklerin Elde Edilmesi

3.4.1. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Çalışmanın 14. Ve 28. günlerinde tüm ratlara 45 mg/kg Ketamin hidroklorür ve 2,5 mg/kg Xylasin hidroklorür ile anestezi uygulanmıştır ve takibinde tüm ratlardan intrakardiyak kan alındı. Alınan kanlar 10 dakika x 3000 g'de santrifüje edilerek gerekli biyokimyasal analizlerin yapılabilmesi için serum örnekleri elde edildi ve analiz gününe kadar -80 C°'de saklandı (Görsel 6). Daha sonra deneklerin tibiasından defekt alanı ve 1x1 cm'lik sağlam dokuyu da içerecek şekilde tam kat örnekler alındı. Çıkarılan dokular daha sonra %10' luk tamponlanmış formol içeren biyopsi kapları içerisine konuldu.



Görsel 6. *Alınan kanların santrifüj edilmesi*

3.5. Biyokimyasal Analizler

Serum örnekleri -80°C 'den oda sıcaklığına alınarak, TNF-a, NFKB, IL1, IL2, IL6 ve IL10 seviyesi EIA (Enzim Linked İmmunoassay) yöntemi ile belirlendi. Tüm parametreler Biotek ELx800 ELISA okuyucuda yapılan okumalarla değerlendirildi.

3.6. Histolojik Değerlendirme

Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal değerlendirmeler Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.7. Doku Hazırlama İşlemleri (Tissue Processing)

Sakrifiye edilen ratların tibiaları cerrahi makas çevre yumuşak dokulardan izole edilip, fiksasyon için % 10 nötr formaldehite (Noratex) konuldu. Formaldehit içerisinde 2-3 gün boyunca tespit edilen örnekler, formalinden iyice arındırılarak hidroklorik asit/formik asit çözeltisine (Biodec R, BIO-OPTICAL) yerleştirilmek suretiyle dekalsifiye edildi. Bu solüsyon üç hafta boyunca haftada bir yenilendi. Dekalsifasyonu takiben iyice yıkanarak fiksatiftan arındırılan dokular, yükselen derecelerdeki alkollerden (Etil Alkol) geçirilerek

dehidrate edildi. Dokular daha sonra şeffaflaşmaları için ksilol içerisinde bekletildi ve alkol-ksilol serilerinden geçirilen dokular parafin bloklara gömüldü.

Detaylı immunohistokimyasal incelemeler için hangi kesitlerin daha ideal olduğunu belirlemeye yönelik olarak, parafine gömülü dokular üzerinde pilot bir çalışma yapıldı. Tibiaların defekt uc kısmından başlanarak kök ucuna kadar 5 µm kalınlığında 10'lu horizontal kesitler alındı. Bu 10'lu kesitlerden bir tanesi seçilerek, 56°C'de bir fırında deparafinize edildi ve hemotoksilen-eozin ile boyandı. Belirlenen ideal çalışma bölgesinden alınan kesitler, immunohistokimyasal değerlendirmeler için boyama işlemine tabi tutuldu.

Histolojik kesitler rutin hematoksisilen-eozin (H-E) boyası ile boyanarak, ışık mikroskopunda değerlendirildi ve tüm örnekler için aynı alan boyamadan sonra 40 büyütmede görüntülendi.

Kontrol ve deney grupları için kesit alınan bölgenin ortasında 1.5 µm²'lik bir alan belirlendi ve bu alandaki ülserasyon, seröz dejenerasyon, epitelizasyon, ödem, polimorfonükleer lökosit, mononükleer hücreler, osteoblastik aktivite, osteoklastik aktivite, RANK, RANKL, OPG, yeni kemik oluşumu ve fibröz doku kalınlığı iki farklı patoloji uzmanı tarafından değerlendirildi. Ülserasyon, seröz dejenerasyon, epitelizasyon, ödem, polimorfonükleer lökosit, mononükleer hücreler, osteoblastik aktivite, osteoklastik aktivite, RANK, RANKL, OPG değerleri; hiç olmayanlar 0, az düzeyde olanlar +1, orta düzeyde olanlar +2, yüksek düzeyde olanlar ise +3 olarak puanlandırıldı. Yeni kemik oluşumu ve fibröz doku kalınlığı mikroskop altında mm olarak hesap edildi.

3.8. İmmünohistokimyasal Boyama ile RANK, RANKL ve OPG Belirteçlerinin Değerlendirilmesi

Osteoklastik ve osteoblastik aktiviteleri daha ayrıntılı gösteren, RANKL, OPG belirteçlerinin değerlendirilmesi için spesifik immunohistokimyasal boyamalar yapıldı. RANK, RANKL ve OPG için boyanma yoğunluğunu analiz edilmesinde kesitler yarı niceliksel olarak incelendi. Pozitif immünohistokimya boyanma yoğunluğu; 0 boyanma yok, 1 zayıf boyanma, 2 orta boyanma, 3 güçlü boyanma şeklinde sınıflandırıldı.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Sürekli verilerin analizinde SPSS 28.0 paket programı kullanıldı. Verilerin dağılımı ile normal dağılım arasında fark olup olmadığı kolmogorov-smirnov ve shapiro-wilk testleriyle araştırıldı. İki kategorik veri arasındaki ilişkinin araştırılmasında ki-kare testi kullanılırken, sürekli verilerin bağımsız grup kıyaslamalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Biyokimyasal verilerde çoklu karşılaştırmalar için normal dağılım gösteren grupların karşılaştırılmasında ANOVA, normal dağılım göstermeyen grupların karşılaştırılmasında ise Kruskal Wallis testi kullanıldı. Ön test ve son test ölçümlerinin ortalamaları arasında fark olup olmadığını test etmek için paired-sample t testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.10. Metot Hatasının Değerlendirilmesi

Kontrol ve deney grubundaki ratların, skorlanmış verileri iki farklı patoloji uzmanı tarafından birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi ve bu araştırmacılar arasındaki farklılıklar ‘gözlemciler arası güvenilirlik testi’ ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Ratlarla İlgili Gözlemsel Bulgular

Deney süresi boyunca tüm ratların sağlık durumları, yem ve su tüketimleri, ağırlıkları ve bacaklarının durumu düzenli olarak her gün kontrol edilmiştir. 28. gün deney grubunda 1 rat anestezi etkisine bağlı olarak kaybedildi.

4.2. Ratların Ağırlıklarıyla İlgili Bulgular

Tablo 3. Kilo başlangıç ve kilo bitiş ortalamalarının kıyaslanması

		Kilo Başlangıç		Kilo Bitiş		p
		Ortalama	SS	Ortalama	SS	
Grup	Deney	374.17	15.05	381.25	10.47	0.006
	Kontrol	373.57	14.99	381.07	12.43	0.004
	Referans	375.71	15.12	374.29	9.76	0.074

Tablo 3, deney, kontrol ve boş gruplarının kilo başlangıç ve kilo bitiş ortalamalarını karşılaştırmaktadır. Deney grubunda başlangıç kilosu ortalaması 374.17 (standart sapma 15.05) iken, kilo bitiş ortalaması 381.25 (standart sapma 10.47) olarak hesaplandı. Bu fark anlamlıdır ($p=0.006$). Kontrol grubunda başlangıç kilosu ortalaması 373.57 (standart sapma 14.99) iken, kilo bitiş ortalaması 381.07 (standart sapma 12.43) olarak hesaplandı. Bu fark da anlamlıdır ($p=0.004$). Boş grup için başlangıç kilosu ortalaması 375.71 (standart sapma 15.12) iken, kilo bitiş ortalaması 374.29 (standart sapma 9.76) olarak hesaplandı. Bu fark ise anlamsızdır ($p=0.074$).

4.3. Gözlemciler Arası Uyum Analizi

Tablo 4. Gözlemciler arası uyum analizi- Kappa katsayıları

	Epitelizasyon	Ödem	PMN	MNL	Osteoblastik	Osteoklastik	RANK	RANKL	OPG
Deney	0.61	0.67	0.68	0.60	0.72	0.76	0.61	0.66	0.72
Kontrol	0.60	0.78	0.73	0.68	0.65	0.73	0.69	0.64	0.80

Tablo 3 ve Tablo 4, gözlemciler arası uyum analizi sonuçlarını göstermektedir. Kappa katsayıları, gözlemciler arasındaki uyumu değerlendirmek için kullanılır ve 0 ile 1 arasında değer alır. Katsayı ne kadar yüksek olursa, gözlemciler arası uyum o kadar iyi kabul edilir. Genellikle 0.6'dan daha büyük Kappa katsayıları iyi uyum olarak değerlendirilir.

Tablo 3'da, deney ve kontrol grupları için Epitelizasyon, Ödem, Polimorfonükleer Lökosit (P. Lökosit), Mononükleer Lökosit (M.lökosit), Osteoblastik, Osteoklastik, RANK, RANKL ve OPG parametrelerine ilişkin Kappa katsayıları bulunmaktadır. Deney ve kontrol gruplarında Kappa katsayıları 0.61 ile 0.80 arasında değişmektedir. Bu değerler, gözlemciler arası uyumun genellikle yüksek seviyede olduğunu göstermektedir.

Tablo 5. Gözlemciler arası uyum analizi- Kappa katsayıları

	Yeni Kemik oluşumu	Fibröz Doku Kalınlığı
Deney	0.66	0.67
Kontrol	0.60	0.69

Tablo 4'de, Yeni Kemik Oluşumu ve Fibröz Doku Kalınlığı parametreleri için Kappa katsayıları bulunmaktadır. Deney grubunda Yeni Kemik Oluşumu için Kappa katsayısı 0.66, Fibröz Doku Kalınlığı için 0.67. Kontrol grubunda ise Yeni Kemik Oluşumu için Kappa katsayısı 0.60, Fibröz Doku Kalınlığı için 0.69'dur. Bu değerler, gözlemciler arası uyumun yüksek seviyede olduğunu göstermektedir.

4.4. Biyokimyasal Analiz Sonucu Bulgular

Tablo 6. Kontrol 14. gün ve Deney 14.gün gruplarının ELISA sonuçları arasındaki ilişki

	Referans	Kontrol-14. gün	Deney-14. gün	P
IL-1	364,6 $\pm$ 32,61	370,4 $\pm$ 107,1	335,1 $\pm$ 64,07	0,8048
IL-2	1,534 $\pm$ 0,1286	1,463 $\pm$ 0,1526	1,505 $\pm$ 0,2443	0,7082
IL-6	63,34 $\pm$ 1,872	60,59 $\pm$ 2,742	54,19 $\pm$ 7,704	0,0605
IL-10	94,77 $\pm$ 10,46	109,4 $\pm$ 26,74	100,3 $\pm$ 9,574	0,3650
TNF-a	94,77 $\pm$ 10,46	109,4 $\pm$ 26,74	100,3 $\pm$ 9,574	0,4169
NF-KB	1,466 $\pm$ 0,3100	1,741 $\pm$ 0,2275	1,568 $\pm$ 0,2483	0,1982

Not: Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu.

Kontrol 14. gün ve deney 14. gün gruplarının ELISA sonuçları arasında yapılan tek yönlü varyans analizi(ANOVA) sonucuna göre IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-a, NF-KB değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılmadı ($p>0.05$)

Tablo 7. Kontrol 28. gün ve Deney 28.gün gruplarının ELISA sonuçları arasındaki ilişki

	Referans	Kontrol-28. gün	Deney-28. gün	P
IL-1	364,6 $\pm$ 32,61	303,1 $\pm$ 83,04	279,5 $\pm$ 38,23	0,5414
IL-2	1,534 $\pm$ 0,1286	1,430 $\pm$ 0,2971	1,549 $\pm$ 0,2462	0,4523
IL-6	63,34 $\pm$ 1,872	51,36 $\pm$ 3,637	47,34 $\pm$ 7,208	0,2191
IL-10	94,77 $\pm$ 10,46	72,39 $\pm$ 11,34	82,56 $\pm$ 9,476	0,1057
TNF-a	94,77 $\pm$ 10,46	94,67 $\pm$ 12,85	90,49 $\pm$ 26,16	0,7297
NF-KB	1,466 $\pm$ 0,3100	1,579 $\pm$ 0,4248	1,298 $\pm$ 0,3779	0,2330

Not: Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu

Kontrol 28. gün ve deney 28. gün gruplarının ELISA sonuçları arasında yapılan tek yönlü varyans analizi(ANOVA) sonucuna göre IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-a, NF-KB değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılmadı ($p>0.05$).

4.5. Histolojik İncelemeye İlişkin Bulgular

Tablo 8. Ülserasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

			Ülserasyon				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	6	1	0	0	6.000	0.107
		% Grup	85.7%	14.3%	0.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	1	4	2		
		% Grup	0.0%	14.3%	57.1%	28.6%		

Tablo 8, ülserasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Tabloya göre, deney grubunda 6 denekte hiç ülserasyon göstermezken, 1 denekte az derecede ülserasyon gözlemlendi. Diğer taraftan, kontrol grubunda hiç ülserasyon göstermeyen denek bulunmamaktadır. Kontrol grubundaki deneklerin 1'i az, 4'ü orta ve 2'si ise çok derecede ülserasyon gösterdi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=6.000$ ve $p=0.107$ olarak bulundu. Bu sonuç, gruplar arasındaki ülserasyon derecesi açısından anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

Tablo 9. Seröz dejenerasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

			Seröz Dejenerasyon + Nekroz				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	6	1	0	0	5.905	0.058
		% Grup	85.7%	14.3%	0.0%	0.0%		
	Kontrol	n	1	2	3	1		
		% Grup	14.3%	28.6%	42.9%	14.3%		

Tablo 9, seröz dejenerasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda, 6 denekte hiç seröz dejenerasyon veya nekroz gözlenmezken, 1 denekte az derecede seröz dejenerasyon tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 1 denek hiç seröz dejenerasyon veya nekroz göstermemekte, 2 denek az, 3 denek orta ve 1 denek da çok derecede seröz dejenerasyon ve nekroz sergilemektedir. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=5.905$ ve

$p=0.058$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında seröz dejenerasyon ve nekroz açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığına işaret etmektedir.

Tablo 10. Epitelizasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

			Epitelizasyon			
			Yok	Az	χ^2	p
Grup	Deney	n	6	1	.424	0.515
		% Grup	85.7%	14.3%		
	Kontrol	n	5	2		
		% Grup	71.4%	28.6%		

Tablo 10, epitelizasyon derecesi ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 6 denekte hiç epitelizasyon gözlemlenmezken, 1 denekte az derecede epitelizasyon tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 5 denekte hiç epitelizasyon gözlenmezken, 2 denekte az derecede epitelizasyon gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=0.424$ ve $p=0.515$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında epitelizasyon derecesi açısından anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

Tablo 11. Ödem derecesi ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

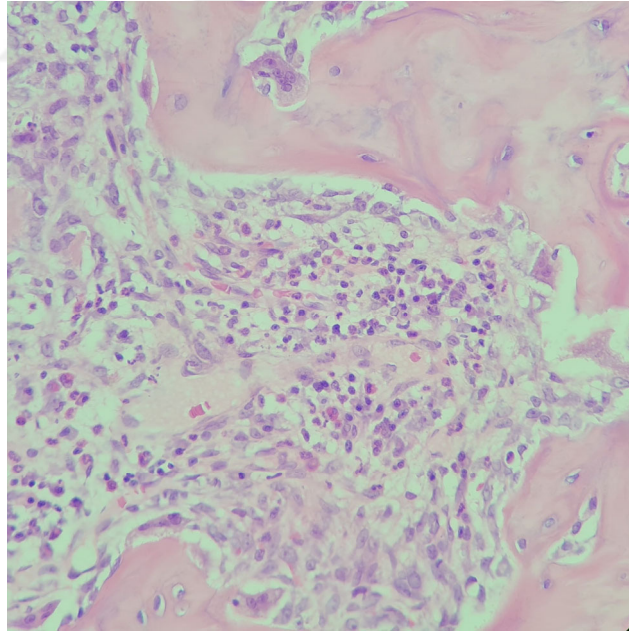
			Ödem				
			Yok	Az	Orta	χ^2	p
Grup	Deney	n	5	1	1	2.619	0.270
		% Grup	71.4%	14.3%	14.3%		
	Kontrol	n	2	3	2		
		% Grup	28.6%	42.9%	28.6%		

Tablo 11, ödem derecesi ve gruplar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Deney grubundaki deneklerin 5'i hiç ödem göstermemekte, 1'i az ve 1'i de orta derecede ödem sergilemektedir. Kontrol grubunda ise, 2 denek hiç ödem göstermezken, 3 denekte az ve 2 denekte orta derecede ödem gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=2.619$ ve $p=0.270$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında ödem derecesi açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığına işaret etmektedir.

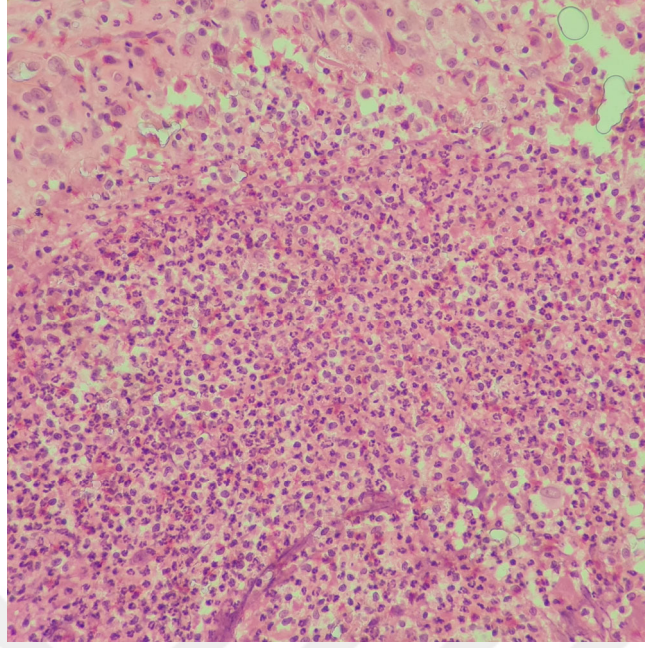
Tablo 12. Polimorfonükleer lökosit ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

			Polimorfonükleer Lökosit				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	6	1	0	0	12.000	0.007
		% Grup	85.7%	14.3%	0.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	1	4	2		
		% Grup	0.0%	14.3%	57.1%	28.6%		

Tablo 12, polimorfonükleer lökosit (PMN) ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 6 denekte hiç PMN gözlemlenmezken, 1 denekte az derecede PMN tespit edildi. Kontrol grubunda ise, hiç PMN gözlenmeyen denek bulunmamaktadır. Kontrol grubundaki deneklerin 1'i az, 4'ü orta ve 2'si çok derecede PMN gösterdi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=12.000$ ve $p=0.007$ olarak bulundu. Bu sonuç, gruplar arasındaki PMN açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Görsel 7 ve 8).



Görsel 7. 14. gün deney grubuna ait hematoxilen eozin boyamada düşük yoğunluk dereceli PMN hücreler, x100.

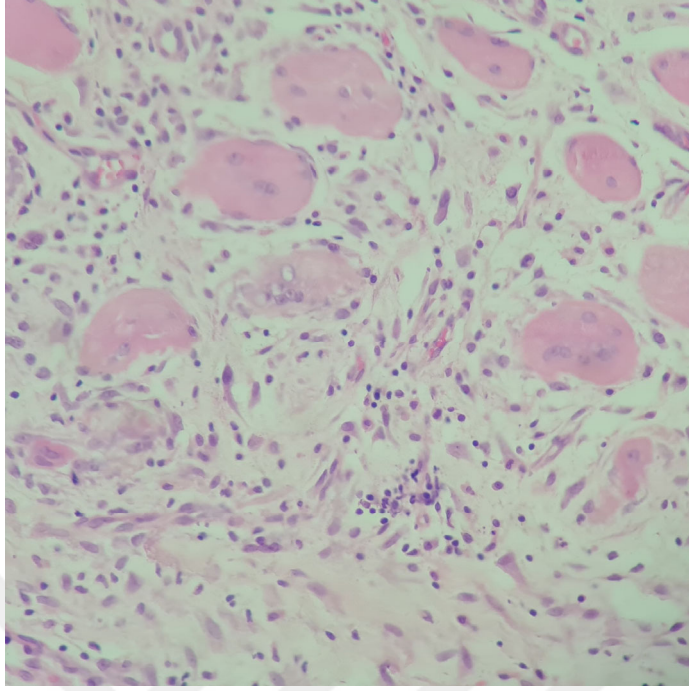


Görsel 8. 14. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek yoğunluk dereceli PMN hücreler, x100.

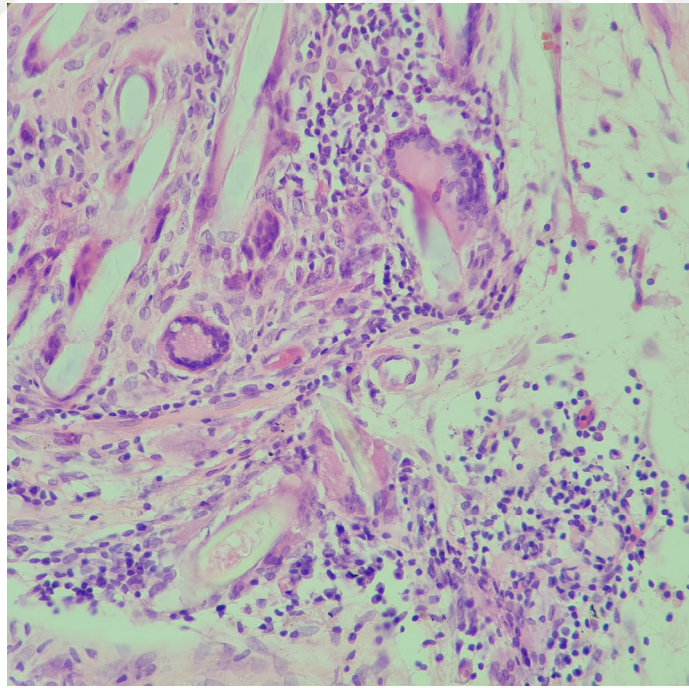
Tablo 13. Mononükleer hücreler ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

			Mononükleer Hücreler				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	3	4	0	0	14.000	0.003
		% Grup	42.9%	57.1%	0.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	0	5	2		
		% Grup	0.0%	0.0%	71.4%	28.6%		

Tablo 13, mononükleer hücreler ve gruplar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Deney grubundaki deneklerin 3'ünde hiç mononükleer hücre gözlenmezken, 4 denekte az derecede mononükleer hücre tespit edildi. Kontrol grubunda ise, hiç mononükleer hücre gözlemlenmeyen denek bulunmamakta, 5 denekte orta ve 2 denekte çok derecede mononükleer hücre gözlemlenmektedir. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=14.000$ ve $p=0.003$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında mononükleer hücreler açısından anlamlı bir farklılık bulunduğuna işaret etmektedir (Görsel 9 ve 10).



Görsel 9. 14. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük yoğunluk dereceli MNL hücreler, x100.

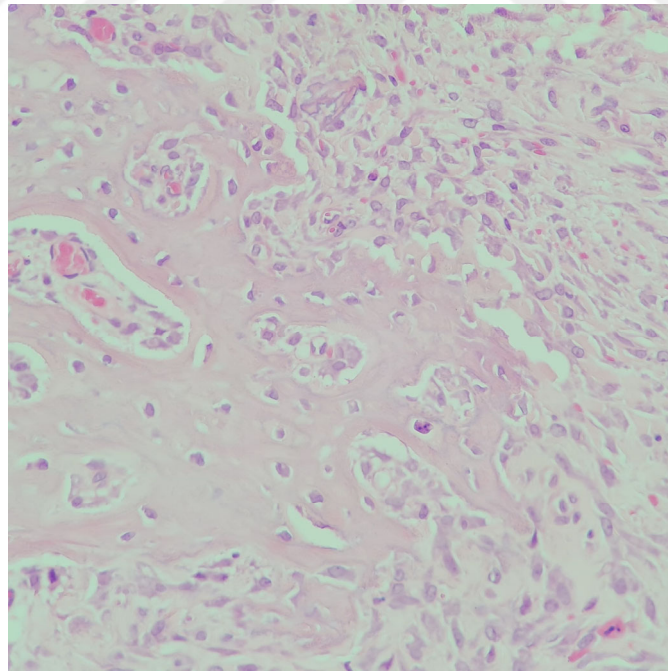


Görsel 10. 14. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek yoğunluk dereceli MNL hücreler, x100.

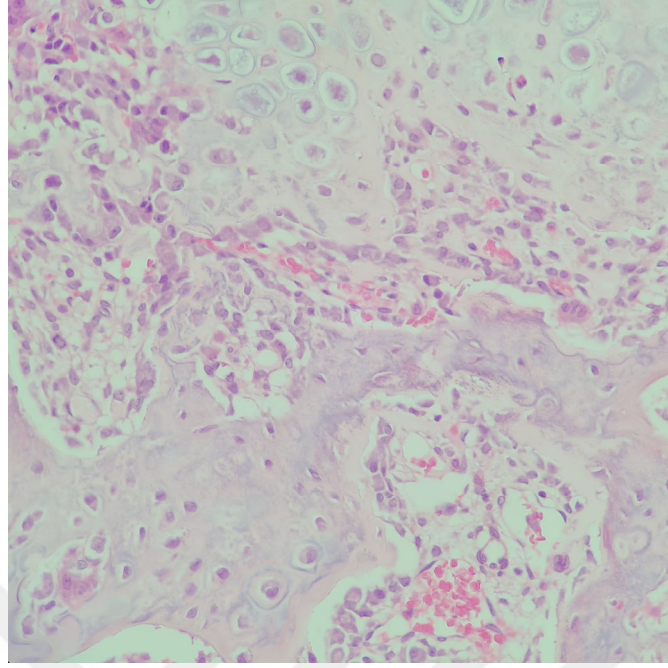
Tablo 14. Osteoblastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

			Osteoblastik Aktivite				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	0	1	2	4	11.333	0.010
		% Grup	0.0%	14.3%	28.6%	57.1%		
	Kontrol	n	5	2	0	0		
		% Grup	71.4%	28.6%	0.0%	0.0%		

Tablo 14, osteoblastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda hiç osteoblastik aktivite gözlemlenmeyen denek bulunmamakta, 1 denekte az, 2 denekte orta ve 4 denekte çok derecede osteoblastik aktivite tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 5 denekte hiç osteoblastik aktivite gözlenirken, 2 denekte az derecede osteoblastik aktivite gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=11.333$ ve $p=0.010$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında osteoblastik aktivite açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Görsel 11 ve 12).



Görsel 11. 14. gün kontrol grubuna ait hematoxilen eozin boyamada düşük dereceli osteoblastik aktivite , x100.

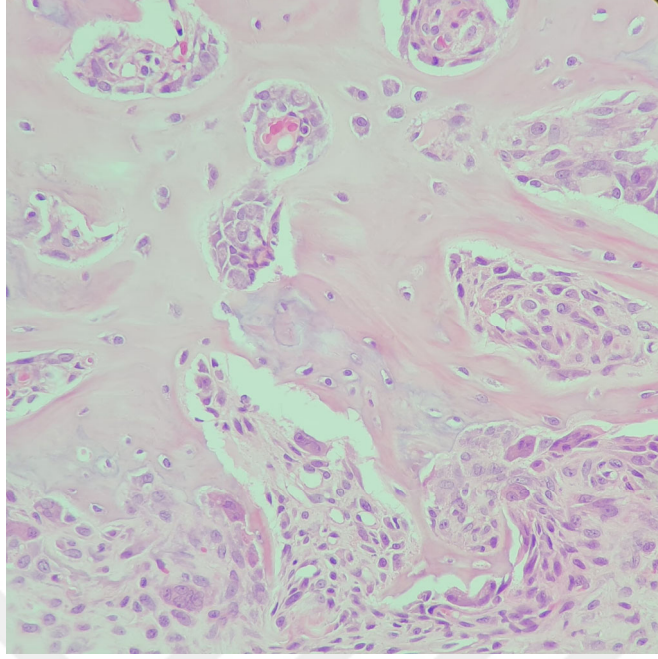


Görsel 12. 14. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek dereceli osteoblastik aktivite , x100.

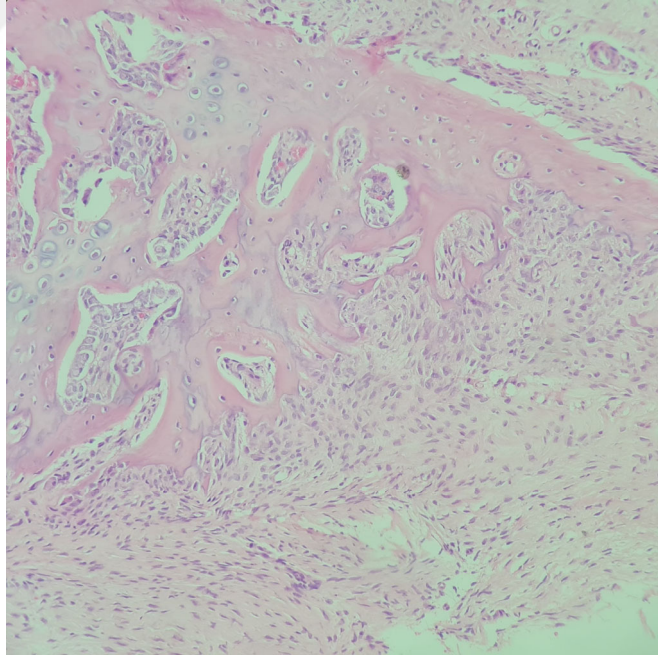
Tablo 15. Osteoklastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

			Osteoklastik Aktivite			χ^2	p
			Yok	Az	Orta		
Grup	Deney	n	5	1	1	8.000	0.018
		% Grup	71.4%	14.3%	14.3%		
	Kontrol	n	1	2	4		
		% Grup	0.0%	71.4%	28.6%		

Tablo 15, osteoklastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Deney grubundaki deneklerin 1'i hiç osteoklastik aktivite göstermemekte, 5'i az ve 1'i orta derecede osteoklastik aktivite sergilemektedir. Kontrol grubunda ise, 2 denek hiç osteoklastik aktivite göstermezken, 1 denekte az ve 4 denekte orta derecede osteoklastik aktivite gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=8.000$ ve $p=0.018$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında osteoklastik aktivite açısından anlamlı bir farklılık bulunduğuna işaret etmektedir (Görsel 13 ve 14).



Görsel 13. 14. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli osteoklastik aktivite , x100.

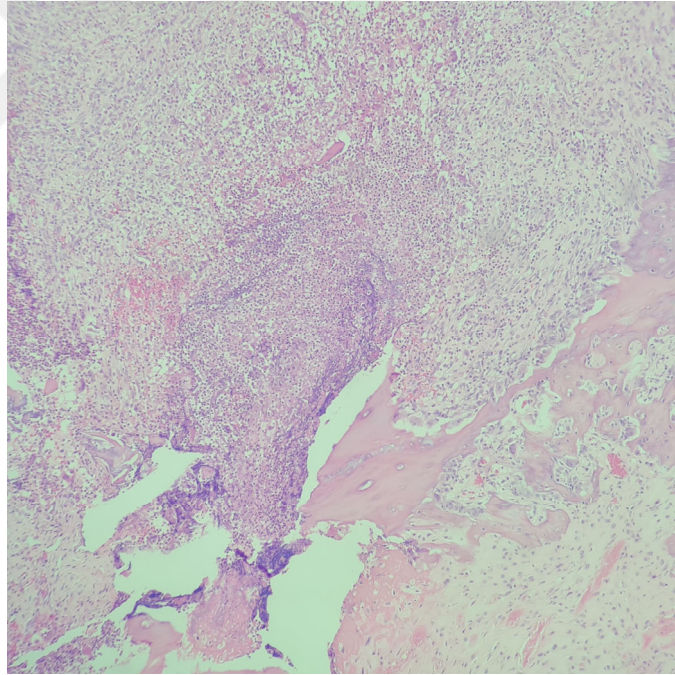


Görsel 14. 14. gün kontrol grubuna ait hematoksilen eozin boyamada yüksek dereceli osteoklastik aktivite , x100.

Tablo 16. Ülserasyon ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			Ülserasyon		χ^2	p
			Yok	Az		
Grup	Deney	n	3	2	1.029	0.310
		% Grup	60.0%	40.0%		
	Kontrol	n	6	1		
		% Grup	85.7%	14.3%		

Tablo 16, ülserasyon ve gruplar arasındaki ilişkiyi 28. gün verileri ile incelemektedir. Deney grubunda 3 denekte hiç ülserasyon gözlemlenmezken, 2 denekte az derecede ülserasyon tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 6 denekte hiç ülserasyon gözlenirken, 1 denekte az derecede ülserasyon gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=1.029$ ve $p=0.310$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında ülserasyon açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığını göstermektedir (Görsel 15).

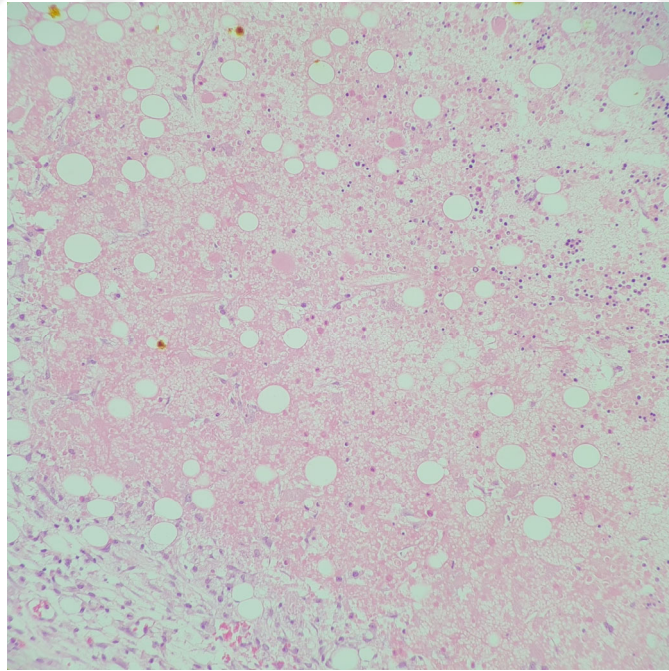


Görsel 15. Hematoksilen eozin boyamada ülserasyon, x100.

Tablo 17. Seröz dejenerasyon ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			Seröz Dejenerasyon+Nekroz			χ^2	p
			Yok	Az	Orta		
Grup	Deney	n	3	2	0	4.286	0.117
		% Grup	60.0%	40.0%	0.0%		
	Kontrol	n	5	0	2		
		% Grup	71.4%	0.0%	28.6%		

Tablo 17, 28. gün verileri ile seröz dejenerasyon ve nekroz ile gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 3 denekte hiç seröz dejenerasyon ve nekroz gözlemlenmezken, 2 denekte az derecede tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 5 denekte hiç seröz dejenerasyon ve nekroz gözlenirken, 2 denekte orta derecede gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=4.286$ ve $p=0.117$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında seröz dejenerasyon ve nekroz açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığını göstermektedir (Görsel 16).



Görsel 16. Hematoksilen eozin boyamada seröz dejenerasyon, x100

Tablo 18. Epitelizasyon ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

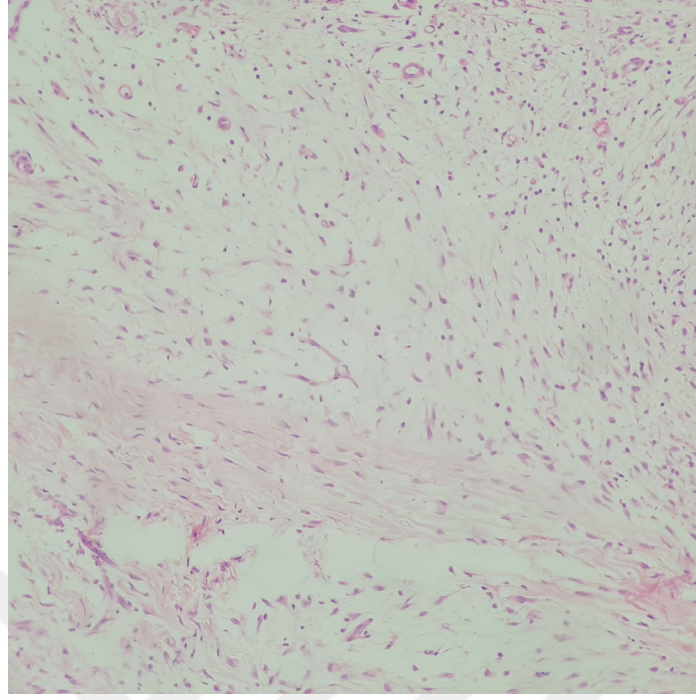
			Epitelizasyon			χ^2	p
			Yok	Az	Orta		
Grup	Deney	n	3	2	0	1.543	0.462
		% Grup	60.0%	40.0%	0.0%		
	Kontrol	n	5	1	1		
		% Grup	71.4%	14.3%	14.3%		

Tablo 18, 28. gün verileri ile epitelizasyon ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 3 denekte hiç epitelizasyon gözlemlenmezken, 2 denekte az derecede tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 5 denekte hiç epitelizasyon gözlenirken, 1 denekte az ve 1 denekte orta derecede gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=1.543$ ve $p=0.462$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında epitelizasyon açısından anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

Tablo 19. Ödem ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			Ödem			χ^2	p
			Yok	Az	Orta		
Grup	Deney	n	3	2	0	.833	0.659
		% Grup	60.0%	40.0%	0.0%		
	Kontrol	n	4	2	1		
		% Grup	57.1%	28.6%	14.3%		

Tablo 19, 28. gün verileri ile ödem ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 3 denekte hiç ödem gözlemlenmezken, 2 denekte az derecede tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 4 denekte hiç ödem gözlenirken, 2 denekte az ve 1 denekte orta derecede gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=0.833$ ve $p=0.659$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında ödem açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığını göstermektedir (Görsel 17).

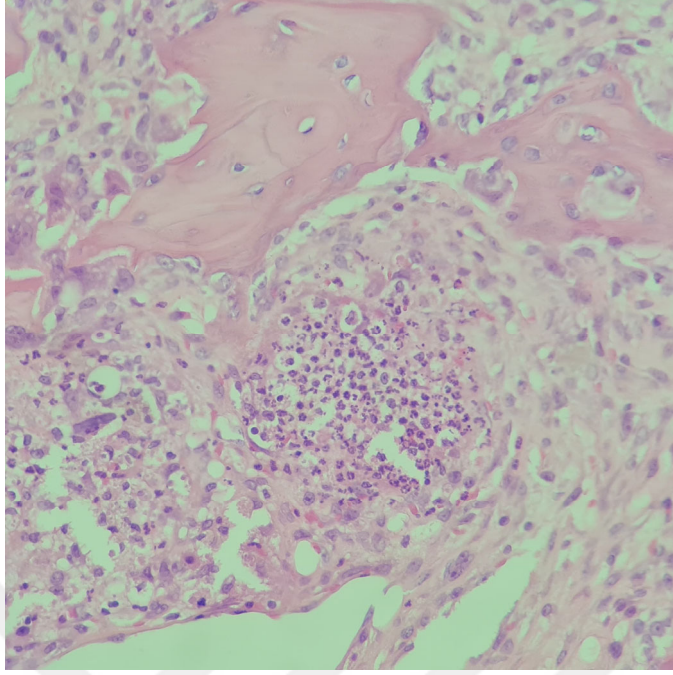


Görsel 17. Hematoksilen eozin boyamada ödem, x100.

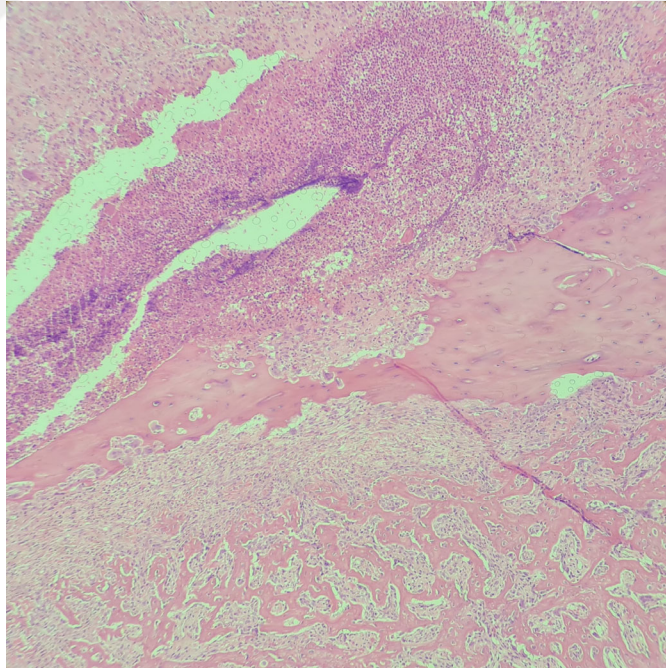
Tablo 20. Polimorfonükleer lökosit ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			Polimorfonükleer Lökosit				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	2	3	0	0	11.063	0.040
		% Grup	40.0%	60.0%	0.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	1	2	4		
		% Grup	0.0%	28.6%	28.6%	42.9%		

Tablo 20, 28. gün verileri ile polimorfonükleer lökosit ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 2 denekte hiç polimorfonükleer lökosit gözlemlenmezken, 3 denekte az derecede tespit edildi. Kontrol grubunda ise, hiç polimorfonükleer lökosit gözlenmeyen denek bulunmazken, 2 denekte az, 2 denekte orta ve 3 denekte çok derecede gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=11.063$ ve $p=0.040$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında polimorfonükleer lökosit açısından anlamlı bir farklılık göstermektedir (Görsel 18 ve 19).



Görsel 18. 28. gün deney grubuna ait hematoksilin eozin boyamada düşük dereceli PMN, x100

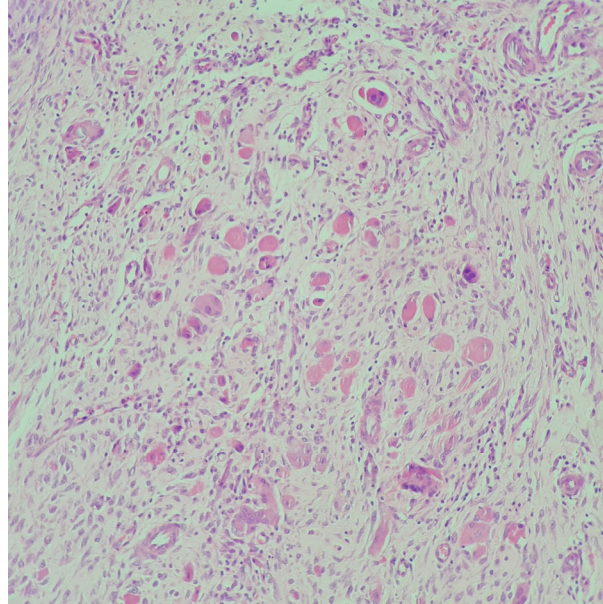


Görsel 19. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilin eozin boyamada yüksek dereceli PMN , x100

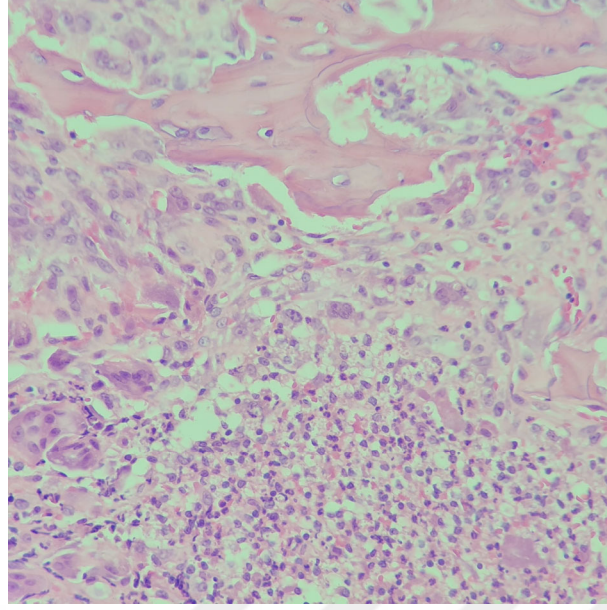
Tablo 21. Mononükleer hücreler ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			Mononükleer Hücreler				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	2	3	0	0	12.000	0.007
		% Grup	40.0%	60.0%	0.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	0	5	2		
		% Grup	0.0%	0.0%	71.4%	28.6%		

Tablo 21, 28. gün verileri ile mononükleer hücreler ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 2 denekte hiç mononükleer hücre gözlemlenmezken, 3 denekte az derecede tespit edildi. Kontrol grubunda ise, hiç mononükleer hücre gözlenmeyen denek bulunmazken, 5 denekte orta ve 2 denekte çok derecede gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=12.000$ ve $p=0.007$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında mononükleer hücreler açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Görsel 20 ve 21).



Görsel 20. 28. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli MNL, $\times 100$.

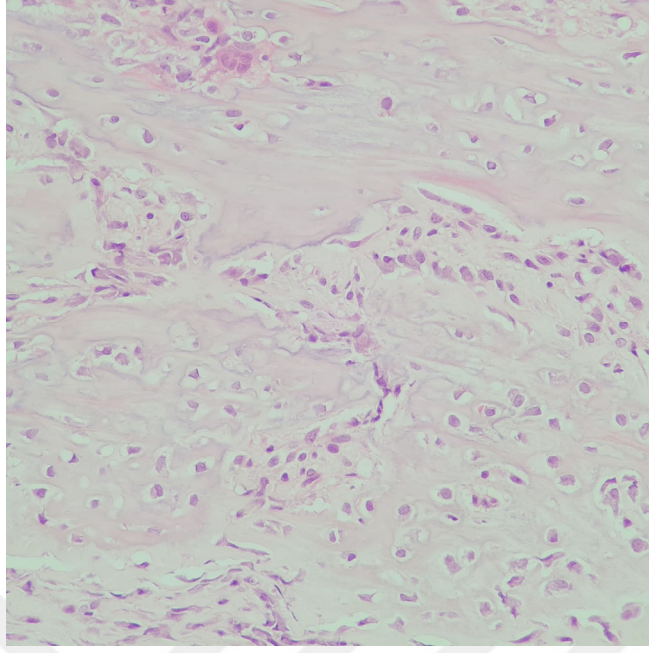


Görsel 21. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilin eozin boyamada yüksek dereceli MNL hücreler , x100.

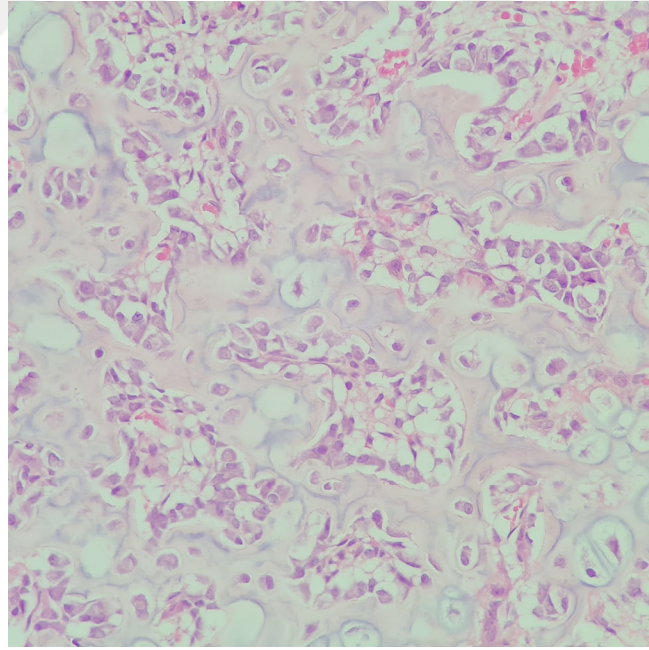
Tablo 22. Osteoblastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			Osteoblastik Aktivite			χ^2	p
			Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	0	3	2	8.914	0.012
		% Grup	0.0%	60.0%	40.0%		
	Kontrol	n	6	1	0		
		% Grup	85.7%	14.3%	0.0%		

Tablo 22, 28. gün verileri ile osteoblastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda hiç az osteoblastik aktivite gözlemlenmezken, 3 denekte orta ve 2 denekte çok derecede tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 6 denekte az, 1 denekte orta ve hiçbir denekte çok derecede osteoblastik aktivite gözlemlenmedi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=8.914$ ve $p=0.012$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında osteoblastik aktivite açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Görsel 22 ve 23).



Görsel 22. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilin eozin boyamada düşük dereceli osteoblastik aktivite, x100.

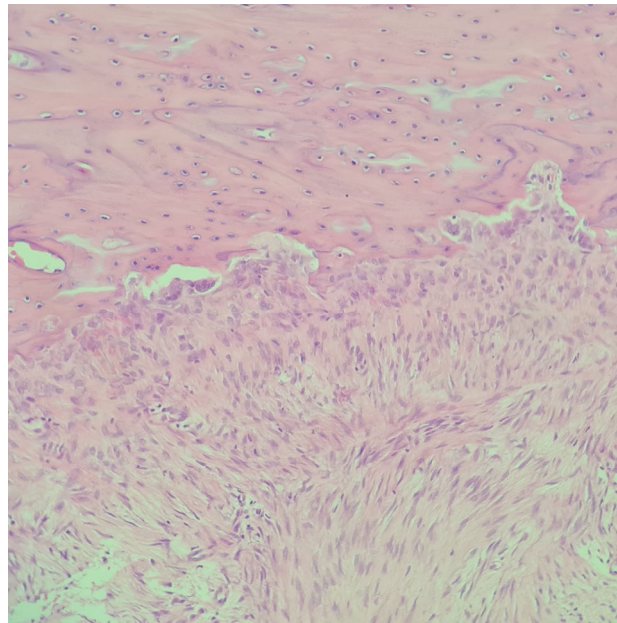


Görsel 23. 28. gün deney grubuna ait hematoksilin eozin boyamada yüksek dereceli osteoblastik aktivite, x100.

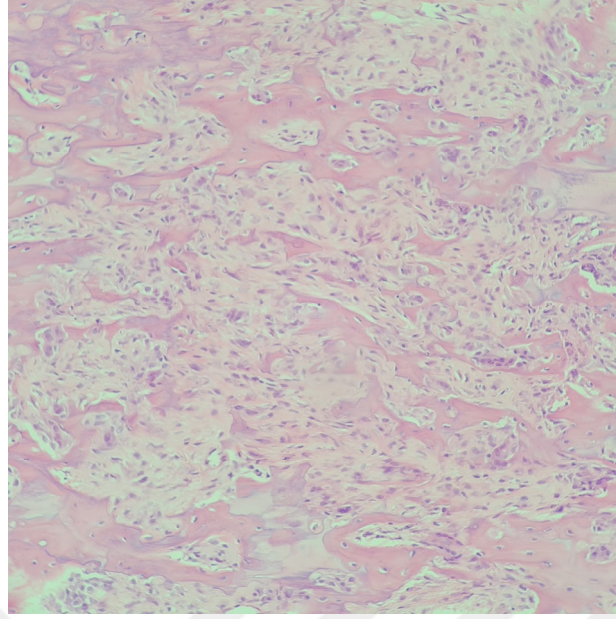
Tablo 23. Osteoklastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			Osteoklastik Aktivite				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	2	2	1	0	12.000	0.007
		% Grup	40.0%	40.0%	10.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	0	2	5		
		% Grup	0.0%	0.0%	28.6%	71.4%		

Tablo 23, 28. gün verileri ile osteoklastik aktivite ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 3 denekte hiç osteoklastik aktivite gözlemlenmezken, 2 denekte az derecede tespit edildi. Kontrol grubunda ise, hiç osteoklastik aktivite gözlenmeyen denek bulunmazken, 2 denekte orta ve 5 denekte çok derecede gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=12.000$ ve $p=0.007$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında osteoklastik aktivite açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Görsel 24 ve 25).



Görsel 24. 28. gün deney grubuna ait hematoksilen eozin boyamada düşük dereceli osteoklastik aktivite, $\times 100$.

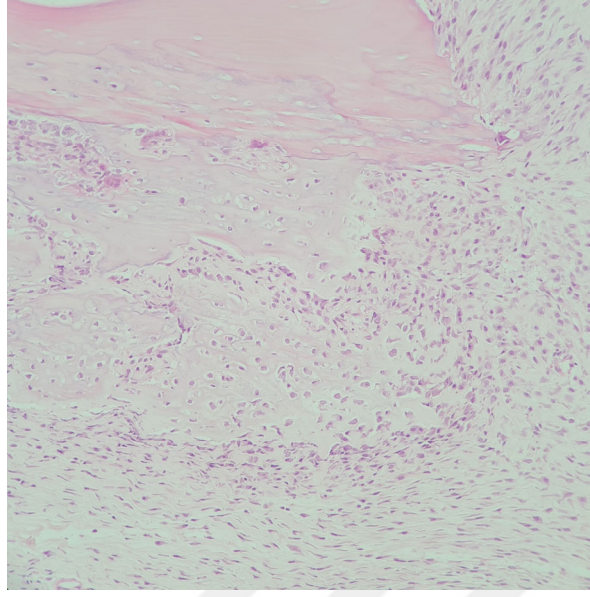


Görsel 25. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilin eozin boyamada yüksek dereceli osteoklastik aktivite, x100.

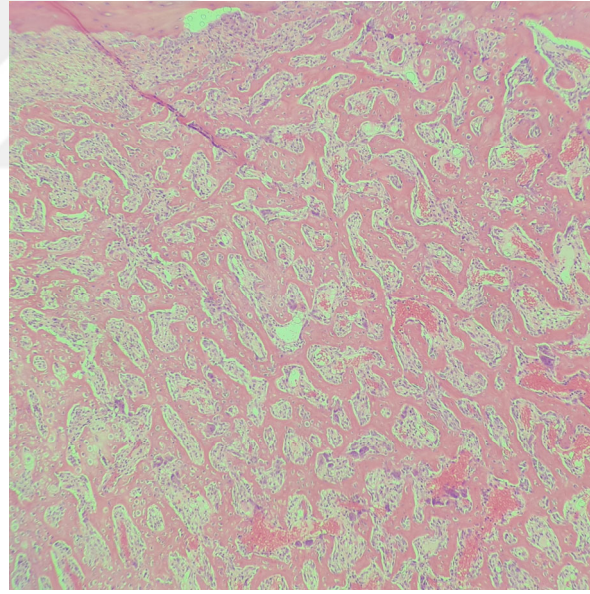
Tablo 24. Yeni kemik oluşumu ortalamasının gruplara göre kıyaslanması

			Yeni Kemik Oluşumu		
			Ortalama	SS	p
14. gün	Grup	Deney	3.71	2.21	0.021
		Kontrol	2.64	.63	
28. gün	Grup	Deney	4.10	.22	0.002
		Kontrol	1.64	1.49	

Tablo 24, yeni kemik oluşumu ortalamalarını gruplara göre kıyaslamaktadır. 14. gün verilerine göre, deney grubunda ortalama yeni kemik oluşumu 3.71 (standart sapma 2.21) iken kontrol grubunda 2.64 (standart sapma .63) olarak hesaplandı. İki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.021$). 28. gün verilerine göre ise, deney grubunda ortalama yeni kemik oluşumu 4.10 (standart sapma .22) iken kontrol grubunda 1.64 (standart sapma 1.49) olarak hesaplandı. İki grup arasındaki farklılık anlamlıdır ($p=0.002$). Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında yeni kemik oluşumu açısından anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir (Görsel 26 ve 27).



Görsel 26. 28. gün kontrol grubuna ait hematoksilin eozin boyamada az miktarda yeni kemik oluşum alanı, x100.

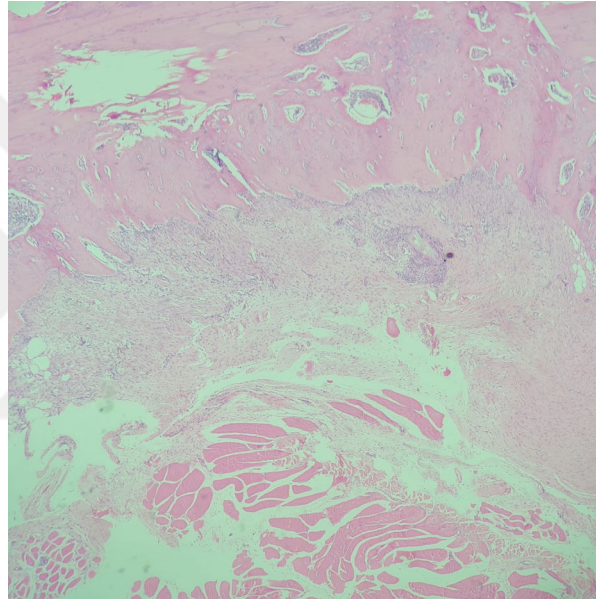


Görsel 27. 28. gün deney grubuna ait hematoksilin eozin boyamada yüksek miktarda yeni kemik yapım alanı, x100.

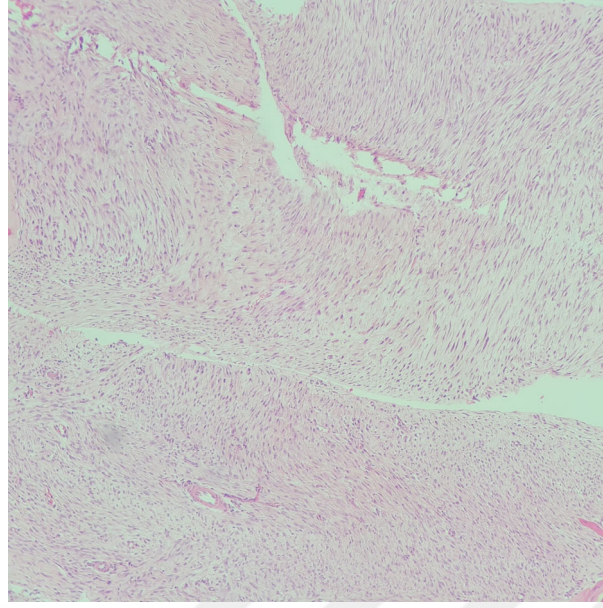
Tablo 25. Fibröz doku kalınlığı ortalamasının gruplara göre kıyaslanması

				Fibröz doku kalınlığı		p
				Ortalama	SS	
Gün	14 gün	Grup	Deney	2.21	1.91	0.002
			Kontrol	4.43	.35	
	28 gün	Grup	Deney	2.60	2.19	0.046
			Kontrol	4.00	.29	

Tablo 25, fibröz doku kalınlığı ortalamalarını gruplara göre kıyaslamaktadır. 14. gün verilerine göre, deney grubunda ortalama fibröz doku kalınlığı 2.21 (standart sapma 1.91) iken kontrol grubunda 4.43 (standart sapma .35) olarak hesaplandı. İki grup arasındaki farklılık anlamlıdır ($p=0.002$). 28. gün verilerine göre ise, deney grubunda ortalama fibröz doku kalınlığı 2.60 (standart sapma 2.19) iken kontrol grubunda 4.00 (standart sapma .29) olarak hesaplandı. İki grup arasındaki farklılık anlamlı bulundu ($p=0.046$). Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında fibröz doku kalınlığı açısından anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir (Görsel 28 ve 29).



Görsel 28. 28. gün deney grubuna ait hematoksilin eozin boyamada düşük miktarda fibröz doku kalınlığı, $\times 100$.



Görsel 29. 28. gün kontrol grubuna ait hematoxilen eozin boyamada yüksek miktarda fibröz doku kalınlığı, x100.

4.6. İmmünohistokimyasal Boyanma Sonucu Bulgular

Tablo 26. RANK ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

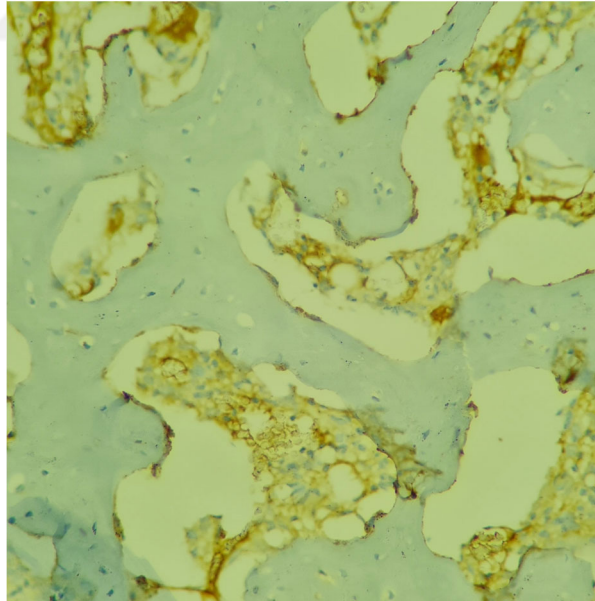
			RANK				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	1	6	0	0	14.000	0.003
		% Grup	14.3%	85.7%	0.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	0	2	5		
		% Grup	0.0%	0.0%	28.6%	71.4%		

Tablo 26, RANK ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 1 denekte hiç RANK gözlemlenmezken, 6 denekte az derecede RANK tespit edildi. Kontrol grubunda ise hiç RANK gözlemlenmeyen denek bulunmadı, 2 denekte orta ve 5 denekte çok derecede RANK gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=14.000$ ve $p=0.003$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında RANK açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

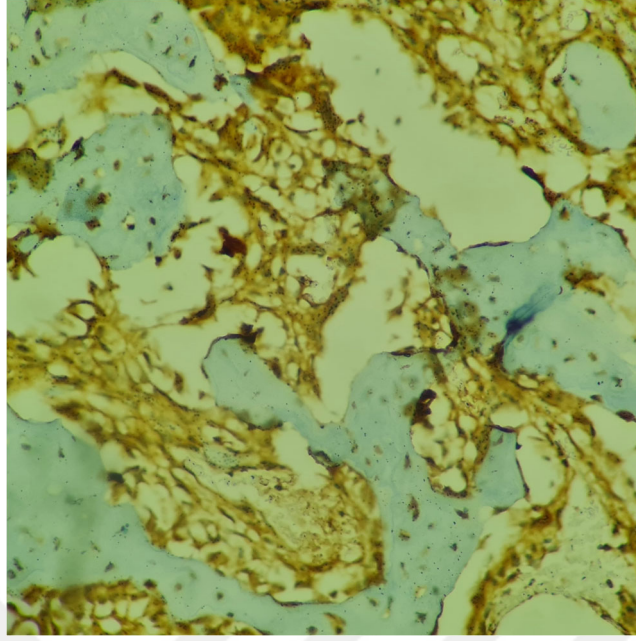
Tablo 27. RANK ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			RANK			χ^2	p
			Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	4	1	0	12.257	0.031
		% Grup	80.0%	20.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	1	6		
		% Grup	0.0%	28.6%	71.4%		

Tablo 27, 28. gün verileri ile RANK ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 4 denekte az, 1 denekte orta ve hiçbir denekte çok derecede RANK gözlemlendi. Kontrol grubunda ise, hiç az RANK gözlenmeyen denek bulunmazken, 2 denekte orta ve 5 denekte çok derecede gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=12.257$ ve $p=0.031$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında RANK açısından anlamlı bir farklılık göstermektedir (Görsel 30 ve 31).



Görsel 30. 28. gün deney grubuna ait RANK antikoru ile düşük boyanma yoğunluğu, x400.



Görsel 31. 28. gün kontrol grubuna ait RANK antikoru ile yüksek boyanma yoğunluğu, x400.

Tablo 28. RANKL ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

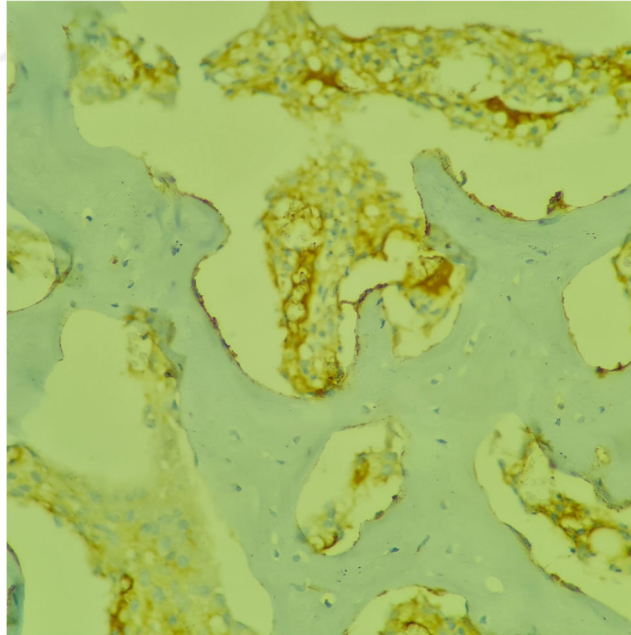
			RANKL				χ^2	p
			Yok	Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	1	5	1	0	14.100	0.029
		% Grup	14.3%	85.7%	0.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	0	1	6		
		% Grup	0.0%	0.0%	28.6%	71.4%		

Tablo 28, RANKL ve gruplar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Deney grubundaki deneklerin 1'inde hiç RANKL gözlenmezken, 5 denekte az ve 1 denekte orta derecede RANKL tespit edildi. Kontrol grubunda ise hiç RANKL gözlemlemeyen denek bulunmamakta, 1 denekte orta ve 6 denekte çok derecede RANKL gözlemlenmektedir. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=14.100$ ve $p=0.029$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında RANKL açısından anlamlı bir farklılık bulunduğuna işaret etmektedir.

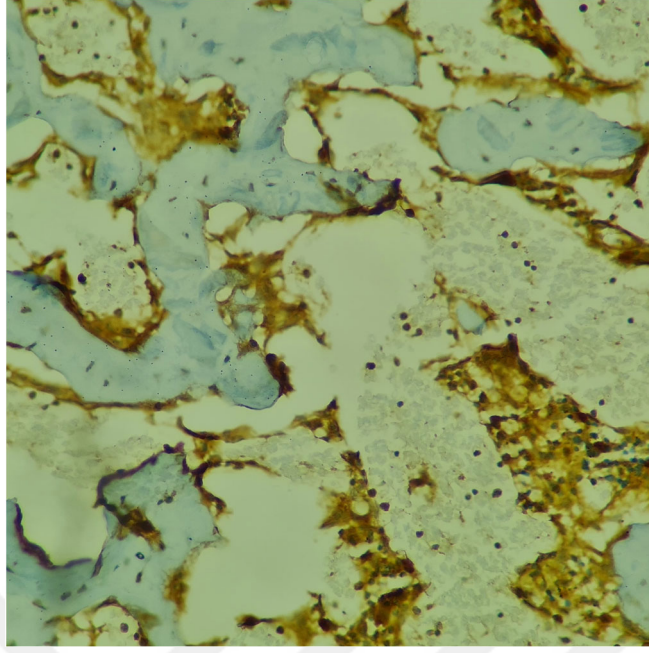
Tablo 29. *RANKL ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)*

			RANKL			χ^2	p
			Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	3	2	0	7.886	0.019
		% Grup	60.0%	40.0%	0.0%		
	Kontrol	n	0	2	5		
		% Grup	0.0%	28.6%	71.4%		

Tablo 29, 28. gün verileri ile RANKL ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda 3 denekte az, 2 denekte orta ve hiçbir denekte çok derecede RANKL gözlemlendi. Kontrol grubunda ise, hiç az RANKL gözlenmeyen denek bulunmazken, 2 denekte orta ve 5 denekte çok derecede gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=7.886$ ve $p=0.019$ olarak hesaplandı. Bu değerler, deney ve kontrol grupları arasında RANKL açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Görsel 32 ve 33).



Görsel 32. *28. gün deney grubuna ait RANKL antikoru ile düşük boyanma yoğunluğu, x400.*



Görsel 33. 28. gün kontrol grubuna ait RANKL antikoru ile yüksek boyanma yoğunluğu, $\times 400$.

Tablo 30. OPG ve gruplar arasındaki ilişki (14. gün)

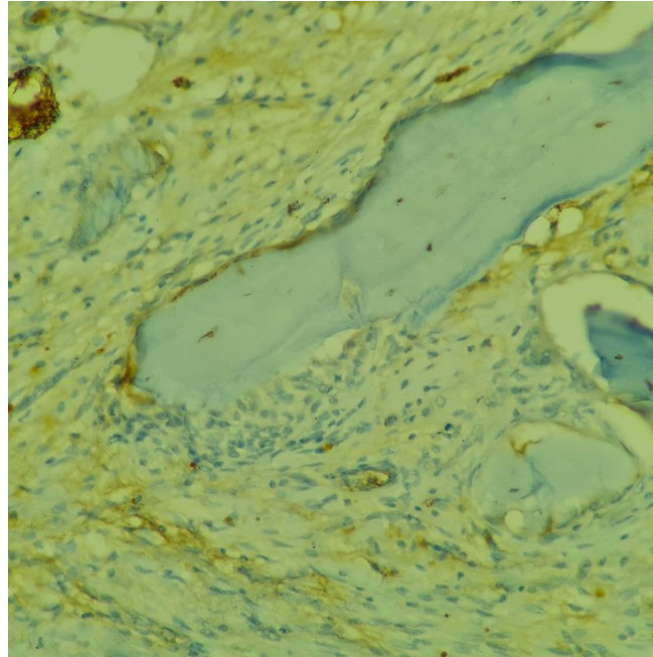
			OPG					
			Yok	Az	Orta	Çok	χ^2	p
Grup	Deney	n	0	0	2	5	13.609	0.004
		% Grup	0.0%	0.0%	28.6%	71.4%		
	Kontrol	n	3	4	0	0		
		% Grup	42.9%	57.1%	0.0%	0.0%		

Tablo 30, OPG ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda hiç OPG gözlemlenmeyen denek bulunmamakta, 2 denekte orta ve 5 denekte çok derecede OPG tespit edildi. Kontrol grubunda ise, 3 denekte hiç OPG gözlenirken, 4 denekte az derecede OPG gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=13.609$ ve $p=0.004$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında OPG açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

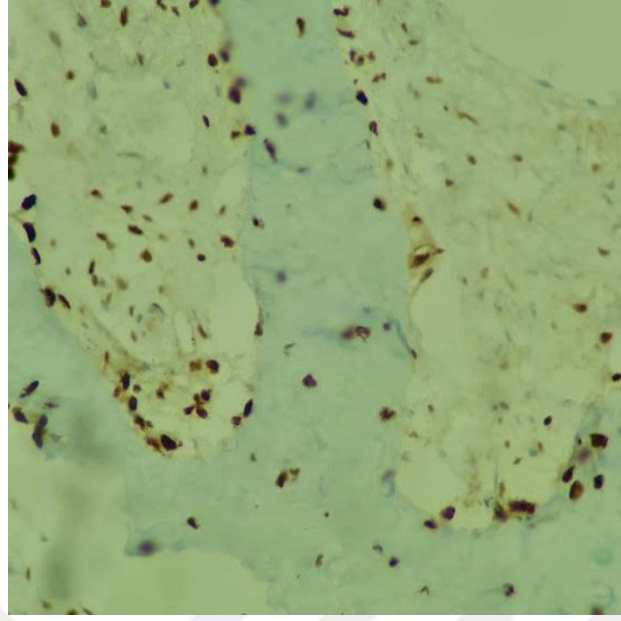
Tablo 31. OPG ve gruplar arasındaki ilişki (28. gün)

			OPG			χ^2	p
			Az	Orta	Çok		
Grup	Deney	n	0	1	4	9.257	0.010
		% Grup	0.0%	20.0%	80.0%		
	Kontrol	n	5	2	0		
		% Grup	71.4%	28.6%	0.0%		

Tablo 33, 28. gün verileri ile OPG ve gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Deney grubunda hiç az OPG gözlemlenmeyen denek bulunmazken, 1 denekte orta ve 4 denekte çok derecede gözlemlendi. Kontrol grubunda ise, 5 denekte az, 2 denekte orta ve hiçbir denekte çok derecede OPG gözlemlendi. Ki-kare testi sonucu $\chi^2=9.257$ ve $p=0.010$ olarak bulundu. Bu sonuçlar, deney ve kontrol grupları arasında OPG açısından anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Görsel 34 ve 35).



Görsel 34. 28. gün kontrol grubuna ait OPG antikoruna ile düşük boyanma yoğunluğu, x400.



Görsel 35. 28. gün deney grubuna ait OPG antikoru ile yüksek boyanma yoğunluğu, x400.

5. TARTIŞMA

Kemik, mineralize yapıya sahip, yetişkin iskeletin en önemli yapı taşını oluşturan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Kemik dokusunun, %60-70'ini inorganik yapı, %10-29'unu su, %30-40'ını da organik matriks oluşturmaktadır. Kemik aynı zamanda, kemik iliğini barındırmaktadır. Kemik, fosfat, kalsiyum ve diğer iyonların kontrollü salınımlarını veya depolanmalarını sağlamaktadır, böylece bu iyonların vücut sıvılarındaki konsantrasyonları belirli bir düzeyde tutulmaktadır. Bu fonksiyona ek olarak kemikler, yumuşak dokuları desteklemektedir, kafatası ve göğüs boşluğunda bulunan organları korumaktadır [56].

Osteoprojenitör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar, ve osteositler kemiğin hücresel yapıtaşlarını oluşturmaktadır. Kemik matriksinin organik kısmının üretilmesinden Osteoblast hücreleri, sorumludur. Kemik matriksinin rezorpsiyonundan osteoklastlar, sorumludur. Osteoblastlar osteoklastlarla beraber kemiğin remodelinginde görev almaktadır [203].

Travmanın kemiğe uygulanmasından sonra kemikte hasar ilk olarak matrikste olmaktadır. Daha sonra enflamasyon meydana gelmektedir, hematoma oluşmaktadır ve sonraki 48 saat içinde fibrin yapı sağlanmaktadır [203]. 7-12 gün sürecek onarım sürecinin sonunda kallus oluşumu meydana gelmektedir [203]. Yeniden şekillenme dönemi 4-16 hafta sürmektedir ve düzensiz kallusun sert kallusa dönüşmektedir [203].

Kemik iyileşmesi için osteoblastları içeren hücresel proliferasyon gerekmektedir. Kemik iyileşmesinde, defekt bazen skatrisyel bağ dokusuyla dolabilmektedir. Kemik defektinin iyileşmesini etkileyen en önemli faktörlerden biri yaranın büyüklüğüdür. Kemik iyileşmenin deneysel olarak değerlendirilmesi için defektin spontan olarak iyileşebileceği boyuttan büyük olması gerekmektedir [56].

Kemik iyileşmesinin azaldığı çeşitli hastalıklarda, kemik metabolizmasının kontrolü ve kemik dokusunda oluşan rezorpsiyonu azaltmak, iyileşmeyi hızlandırmak için gerekli bir durumdur. Bifosfanat, paratiroid hormon gibi sistemik ve lokal ajanlar kemik rezorpsiyonunu azaltmak ve kemikte depozisyonun arttırmak için test edilmektedir [204]. Bu ajanların birçok yan etkileri bulunmaktadır. Yan etkileri azaltmak için, yararları benzer ancak yan etki potansiyelleri daha az olan alternatif ilaçlar, çalışmalarda kullanılmaya başlandı. Bitkilerden elde edilip hazırlanan özellikle antioksidan bileşiklerin, örneğin acteoside, curcumin, resveratrol kullanımında artış meydana gelmektedir [179, 181, 185].

Bu bileşikler arasında yer alan berberin çeşitli klinik ve farmakolojik çalışmaların ışığında önemli hale gelmektedir.

Kemik iyileşmesinin tam olarak incelenebilmesi için, radyografik incelemelerin yanı sıra histolojik, histomorfometrik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmelerin de yapılması önemlidir. Radyografik muayene ve biyokimyasal değerlendirmeler insanlarda uygulanabilmelerine rağmen, doku örnekleri üzerinde yapılan histolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal değerlendirmelerin insanlar üzerinde yapılması mümkün değildir. Bu nedenle söz konusu çalışmaların hayvan deneyi olarak planlaması zorunlu olmaktadır. Araştırmalarda deney hayvanlarının kullanılarak, genetik ve çevresel faktörler standardize edilebilmektedir.

Kemik defekti model çalışmalarında birçok farklı canlı çeşidi kullanılmıştır. Ratların; ucuz olmaları, kolay üretilibilmeleri, uzun süre bakımlarının yapılabilmesi, histolojik hazırlıklarının kolay olması, defektlerin kolay bir şekilde oluşturulabilmesi, ayrıca defektlerin kısa bir sürede iyileşmesi, hücresel ve moleküler biyolojik teknikler için geliştirilmiş birçok antikorun, sadece ratlar ve fareler için kullanılabilmesi bu tarz çalışmalarda ratların kullanımını bir anlamda zaruri kılmaktadır.

Yeni oluşacak olan kemik dokusunun incelendiği deneysel çalışmalarda kullanılacak olan canlı deney hayvanının yaşı önemlidir. Yeni kemik yapımı genç olan hayvanlarda daha hızlı gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar ile ratlarda ilk üç aya kadar olan süre zarfında yeni kemik yapımının hızlı olduğu ortaya konulmaktadır [205]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda 4-6 aylık ratlar kullanıldı.

Çalışmamızda karşılaşılabilecek komplikasyon riskini en aza indirmek ve kolay manipüle etmek için defektin, sıçan tibiasında açılmasını uygun gördük. Ayrıca oral floradan kontamine olma olasılığı nedeniyle ağız içi deney modellerine göre defektin tibiada açılması daha avantajlıdır. Stabil olmayan bir metabolizmaları dönemsel hormonal farklılıklar sebebiyle oluşan disi memeli hayvanlar, bu nedenler göz önünde bulundurularak çalışmada kullanılmadı.

Deney hayvanlarında kritik boyutlu defekt kemiklerde ömürleri boyunca kendiliğinden onarılamayan en küçük kemik içi hasar olarak tanımlanabilmektedir. Yaş ve hayvan çeşidi kritik boyutlu bir defektin tespit edilmesinde iki önemli faktör olarak görülmektedir [206, 207]. Ratlarda tibia defekti yapan güncel çalışmalar incelendiğinde, 2.5 mm [208], 4mm [209], 5mm [210–212] olarak değişken boyutlarda defektler oluşturulduğu

görülmektedir. Bununla birlikte genel olarak 5mm defekt oluşturulduğundan çalışmamızda 5 mm uzunluğunda defekt tercih edildi.

Literatüre göre, sıçanların kemik iyileşmesi ortalama 4-6 hafta içinde gerçekleşmektedir [210]. Bu nedenle ekonomik olarak kısa sürede sonuç verebilmektedir. Sıçanda tibia kemik defekti oluşturan çalışmalarda incelemek için alınacak örnekleri cerrahi sonrası 2, 4, 6 ve 8. Haftada sakrifiye ederek [211], 4. Ve 8. Haftada sakrifiye ederek alan [213] ve 2. Ve 4. Haftada sakrifiye ederek alan [210] çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda İncelenecek inflamatuvar parametreler ve histopatolojik göstergeler göz önünde bulundurularak, berberinin hem kemik iyileşme sürecindeki erken dönem etkisinin incelenmesi hem de inflamatuvar hücrelerin defekt bölgesindeki akut ve kronik tepkilerinin gözlemlenebilmesi için cerrahi sonrası 2. ve 4. Haftada örnek alınmasına karar verildi.

Tıbbi bitkiler arasında, Berberis ve Coptis cinsine ait çok sayıda bitki, geleneksel tıpta karın ağrısı, ishal veya gastroenterit hastalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [214]. Bir izokinolin alkaloidi olan berberin, bu bitkilerdeki ana biyoaktif bileşenlerden biridir ve anti-inflamatuvar, anti-oksidasyon, anti-aterosklerotik, antimikrobiyal, antidiyabetik, antitümör ve nöroprotektif etkiler sergilemektedir [151, 152, 197, 215]. Berberinin bu tür pleiotropik biyolojik ve farmakolojik özelliklerinin esas olarak antienflamatuvar ve immünomodülatör özelliklerine atfedildiği öne sürülmektedir [151, 152, 197, 215]. Çalışmalar, BBR'nin MAPK yolu yoluyla TNF- α , IL-6, IL-1 β , matris metaloproteaz 9, COX-2, indüklenebilir nitrik oksit sentaz, monosit kemo-çekici protein 1 ve C-reaktif proteini inhibe edebildiğini, PGE2 üretimini azaltarak enflamasyonu ve eksüda oluşumunu modüle etmekte ve/veya baskılamaktadır [181, 182]. Liu ve ark. yaptığı sıçan ayağı ödem modelinde, berberin uygulanan grupta ödemli ayak ağırlığında ve serum IL6 seviyesinde berberin kullanılmayan gruba kıyasla anlamlı miktarda azalmaktadır [216].

Peng ve ark. prematüre over yetmezliği deney hayvanı modeli sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, deney grubunda berberin enjeksiyonu yaptıkları hayvanlarda over dokusunda güçlendirilmiş NF-KB protein ekspresyonunu inhibe etmektedir. BBR sadece NF-KB mRNA seviyelerini düşürmemekte, aynı zamanda over dokularında IL-6 ve IL-1 β mRNA ekspresyonunu da inhibe etmektedir [217].

Chen ve ark. hücre kültüründe yaptıkları çalışmada berberin, makrofajlarda doza bağlı bir şekilde TNF-a, IL-6 ve MCP-1 ekspresyonunu inhibe etmektedir [218].

Çalışmamızda tibialarında defekt oluşturduğumuz sıçanların, sakrifikasyon öncesinde aldığımız serum örneklerinden ELISA ile ölçtüğümüz IL1, IL2, IL6, IL10, TNF-a ve NF-KB değerlerinde, deney ve kontrol grupları arasında anlam oluşturacak farklılık tespit edilemedi. Çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde Xu ve ark. ülseratif kolitli Çinlilerde berberinin faz I deneyi çalışmasında berberin kullandırılan hastaların kanları alınarak ölçülen TNFa, IL4, IL6, IL8 ve IL10'un plazma konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlenmektedir [219]. Araştırmaların bazılarında bulunan sonuçların farklılığının, bu araştırmaların doku ve hücre kültüründeki inflamasyonu ölçmüş olmalarından kaynaklanabileceğini düşünülmektedir.

Berberinin antiinflamatuvar etkisi göz önünde bulundurularak ödem, seröz dejenerasyon, ülserasyon ve epitelizeasyon derecelerinde iyileştirici etkileri beklenmektedir. Yara iyileşmesi üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalarda berberinin epitelizeasyonu anlamlı olarak artırdığı tespit edilmektedir [220–222]. Berberinin epitelizeasyon üzerindeki etkisini incelediği tespit edilen çalışmaların topikal yolla uygulama yapmış olması bizim çalışmamızla net kıyas yapmayı engellemektedir. Literatürde berberinin ödem üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalara bakıldığında, akciğer, beyin ve pençe dokusunda yapılan araştırmalar bulunmaktadır [223–225]. Bu çalışmalarda ödem derecesinin tayini ağırlık ölçümüne dayanmaktadır ve anlamlı olarak berberin uygulanan deneklerde ödem derecesi azalmaktadır. Çalışmamızda ödem derecesi histopatolojik olarak incelendi. Çalışmamızda berberin kullanımının ödem derecesinde önemli farklılık oluşturmadığı bulundu. Yapılan çalışmalardan farklı bulduğumuz sonucumuzun, incelenen doku farklılıklarından ve inceleme yönteminden kaynaklanabileceğini düşünülmektedir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, berberinin seröz dejenerasyon, üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar tespit edilemedi. Yaptığımız çalışmamızda berberin kullanımı kemik doku iyileşmesinde ülserasyon ve seröz dejenerasyon derecesi üzerinde anlamlı farklılık oluşturmadığı tespit edildi.

Mevcut literatür, kırık iyileşmesinin enflamatuvar fazının, kemik onarımının sonraki süreçlerini etkilediğini ileri sürmektedir [226, 227]. Bulgular, erken kemik onarımı sırasında ortaya çıkan inflamatuvar süreçlerin yeterli kemik rejenerasyonu için gerekli olduğunu ileri sürmektedir. Bununla birlikte, diğer çalışmalar, bazı inflamatuvar durumların kırık iyileşmesinin sonucunu olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir [226, 227]. Şu anda mevcut olan kanıtlar, enflamasyonun kemik dokusu rejenerasyonunun sonucu üzerinde

önemli bir etkiye sahip olmakla birlikte lokal ve sistemik hiperenflamatuar durumların kemik iyileşmesinde bozulmaya sebep olabileceği düşünülmektedir. Nötrofiller kanda en çok bulunan bağışıklık hücreleridir ve enfekte/hasarlı dokuya ilk katılanlardır [228–232]. Nötrofiller, aktivasyon, polarizasyon ve ilk inflammatuar uyaranlara doğru migrasyonla sonuçlanan, konak ve patojen kaynaklı sinyalleri entegre etmektedir [233]. Aktive edilmiş nötrofiller, nötrofil kaynaşması sırasında benzersiz bir hücreler arası iletişim sinyal rölesinde daha fazla nötrofil toplamak için lökotrien B₄'ü (LTB₄) serbest bırakmaktadır [234, 235]. Nötrofil kaynaşması, nötrofiller hızla steril enflamasyon, enfeksiyon oluşturan kümeler veya hasarlı hücreler bölgesine doğru göçlerini koordine ettiklerinde meydana gelmektedir [236, 237]. Konakçıdan mikrobiyal eliminasyon için vazgeçilmez olsa da, nötrofillerin aşırı birikmesi doku hasarına neden olmaktadır [238–242]. Yapılan çalışmalarda berberin kullanımının hasarlı dokularda nötrofil miktarını anlamlı olarak azalttığı bildirilmektedir [215, 243]. Bu çalışmada histopatolojik olarak tespit edilen PMN miktarı, hem 14. gün hem de 28. günde berberin kullandırılan deney grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu.

Lenfositlerin vücutta hareketinin doğru kontrolü, etkili bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için bir ön koşuldur. İmmün hücreler, kemik rejenerasyonunun orta-geç aşamalarında kırık kallusuna sızar ve esas olarak B lenfositlerinden oluşur. T hücreleri, osteojenik hücrelerin mineralizasyon kapasitesini programlayarak endokondral kemik oluşumunun hızını kontrol eder [244]. Yapılan çalışmalarda berberin, T lenfositleri üzerindeki aktivasyon antijenlerinin ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe etmektedir ve aynı zamanda lenfositlerin hücre döngülerinin ilerlemesini de bloke etmektedir; bu, berberinin aktivasyonu ve proliferasyonu inhibe ederek immünosüpresif etki gösterebileceğini düşündürmektedir [245]. Yapılan bir diğer çalışmalarda berberin, meme kanseri ve hepatit modeli oluşturulan hayvanlarda karaciğer inflamasyonunu, TNF-a ve VEGF seviyesini azaltmaktadır [246, 247]. Çalışmamızda, defekt oluşturulan kemik dokuda histopatolojik olarak incelediğimiz mononükleer hücre seviyesi, 14. ve 28. gün gruplarının her ikisinde de berberin kullanan deney gruplarında, kontrol grubuna kıyasla önemli olarak düşük bulundu. Bu sonuçlar, yapılan diğer çalışmalarda gösterilen berberinin antiinflammatuar etkisiyle uyumludur.

Yapılan çalışmalarda berberinin kemik yapım üzerindeki etkisi incelenmektedir. İlk olarak, önceki çalışmalar BBR'nin proosteogenez etkisini bildirmektedir [178, 181]. Ayrıca

yapılan çalışmada berberin, osteojenik gen ekspresyonunun LPS kaynaklı inhibisyonunu iyileştirebilmektedir [186]. Runx2 ve Osterix'in osteojenik farklılaşma sürecindeki en önemli transkripsiyon faktörlerinden ikisi olduğu iyi bilinmektedir. Bunlar, Wnt/ β -katenin sinyal yolu tarafından düzenlenen aşağı yöndeki hedef genlerdir [50].

Berberinin, kemik kök hücrelerinde hem Wnt/ β -katenin sinyallemesinin hem de osteojenik farklılaşmanın pozitif modülatörü olarak rolünü desteklemektedir ve Wnt/ β -katenin sinyallemesi, berberinin indüklediği osteojenik farklılaşma sürecinde yer almaktadır [178, 187].

Berberinin doğrudan osteblast oluşumunu artırdığına yönelik kanıtların bir diğeri de, BBR'nin Runx2'nin p38 MAPK ile aktivasyonu yoluyla osteoblast farklılaşmasını desteklediğini göstermektedir [181].

Berberinin osteoblastik aktiviteyi artırdığı, kemik yapımını artırdığı, osteblast oluşumunu artırdığı, titanyum implantların osteointegrasyonunu aktive ettiği sonuçları literatürde bulunmaktadır [178, 181, 185, 187, 191].

Yaptığımız çalışmada histopatolojik olarak incelediğimiz osteoblastik aktivite, berberin kullandırılan ratlarda hem 14. gün hem de 28. günde deney grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak fazla olduğu tespit edildi. Sonuçlarımız yapılan diğer çalışmalarla uyumludur.

Osteoklast oluşumuna ağırlıklı olarak monosit/makrofajlardaki RANKL/RANK etkileşimi aracılık eder. Ancak son çalışmalar, IL-21'in tek başına, RANKL varlığında/yokluğunda monosit/makrofajların osteoklast farklılaşmasını teşvik etme özelliğine sahip olduğunu ortaya koymaktadır [248–250].

İlk rapor, minimum düzeyde RANKL varlığında IL-21'in osteoklast oluşumunu indükleyebildiğini ileri sürmektedir [250]. Bu çalışmaya benzer şekilde Kim ve ark. ayrıca IL-21'in, bazal RANKL seviyelerinin varlığında PBMC'lerde osteoklast oluşumunu indükleyebildiğini kanıtlamıştır [248]. Ancak Xing, Zhang ve ark., RAW 264.7 makrofajlarında, IL-21'in, RANKL varlığı olmadan PI3K/Akt'a bağımlı bir şekilde osteoklast oluşumunu destekleyebildiğini tahmin etmektedir [249].

IL-21 uyarımı minimum düzeyde RANKL ile birlikte gerçekleştirildiğinde, osteoklast oluşumunu tek başına RANKL veya IL-21'inkinden daha fazla arttırmaktadır. Bu fenomen, belirli bir derecede RANKL'ın osteoklast oluşumu için gerekli olduğunu açıklığa

kavuşturdu. Yapılan çalışmalarda BBR ile tedavi, osteoklast oluşumunu inhibe etti ve maksimum konsantrasyonda hiçbir görünür osteoklast görülmediği, berberinin osteoporoz üzerinde koruyucu etkisinin varlığı bildirilmektedir [8, 193, 197]. Çalışmamızda berberin kullandırılan deney gruplarında histopatolojik olarak incelenen osteoklast aktivitesi hem 14. hem de 28. günde anlamlı olarak düşük olduğu bulundu. Bu sonucun literatürde yapılan diğer çalışmalarla benzer nitelikte olduğu görüldü.

Osteoklast farklılaşması, birden fazla hücre içi sinyal yolunu aktive edebilen temel faktörler tarafından düzenlenir; bunlardan nükleer faktör kappa B (NF-KB) reseptör aktive edici faktör ligandı (RANKL), ana düzenleyicilerden biridir [192]. Berberin, RANKL ve RANK (osteoklast üzerindeki RANKL reseptörü) kombinasyonunu inhibe ederek RANKL kaynaklı osteoklast farklılaşmasını inhibe edebilmektedir [193]. RANKL ve RANK'ın bağlanması, p38MAPK, ERK, JNK, Akt ve NF-KB gibi osteoklast farklılaşması için gerekli olan birkaç erken sinyal yolunu aktive etmektedir [194].

Bunlar arasında, osteoklast soyundaki hem NF-KB hem de Akt, berberin tedavisine oldukça duyarlıdır. Berberin, NF-KB ve Akt aktivasyonunu baskılayarak RANKL tarafından indüklenen osteoklastogenezi ve osteoklast sağkalımını inhibe etmektedir[196]. Osteoklastların farklılaşmasına katılan ve düzenleyen sinyal yollarında berberin, p38, ERK ve Akt'ın fosforilasyonunu [196]. IKb'nin bozulmasını [196] ve PI3K/Akt seviyesini inhibe etmektedir [197]. Dolayısıyla MAPK (p38MAPK ve ERK'yi içerir), NF-Kb ve Akt gibi osteoklast farklılaşması için gerekli olan çeşitli sinyal yollarının aktivasyonunu baskılamaktadır. RANK ve RANKL ekspresyon seviyelerini immünohistokimyasal boyama yaparak histopatolojik olarak incelediğimiz çalışmamızda, berberin kullanan deney gruplarında hem 14. hem de 28. günlerde RANK ve RANKL seviyeleri anlamlı olarak düşük olarak tespit edildi. Bu sonuç yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte, berberinin osteoklastogenei baskılaması sonucuyla da uyumludur.

Zhao ve ark. [251] ayrıca OPG/RANKL yolunun osteoklast farklılaşmasında önemli bir sinyal iletim yolu olduğunu göstermektedir. Ayrıca incelemelerinde Kobayashi ve ark. [27] artan oksidatif stres seviyeleriyle RANKL ifadesinin arttığını, OPG ifadesinin ve OPG/RANKL oranının azaldığını bildirmektedir. Bu, artan oksidatif stresin RANKL/RANK etkileşimini uyarırken OPG/RANKL/RANK sistemini inhibe ettiği anlamına gelmektedir. Bu durumda, osteoklastların oluşumu, farklılaşması ve olgunlaşması desteklenmektedir, sonuçta kemik dokusunun zarar görmesine ve osteoporozun gelişmesine yol açmaktadır.

RANKL/OPG oranı da osteoporoz grubunda artmaktadır. Yapılan bir çalışmada berberin, osteoporozlu ratlarda osteoprotegerin (OPG) ekspresyon seviyesini artırmaktadır [199]. Diyabetli ratlarda yapılan bir diğer çalışmada da berberin OPG seviyesini artırmaktadır [252]. Yaptığımız çalışmamızda berberin kullanan deney gruplarında 14. ve 28. günlerde, immünohistokimyasal boyama yaparak histopatolojik olarak incelediğimiz OPG ekspresyon seviyesi, anlamlı olarak daha fazla bulundu. Yapılan diğer çalışmamalarla uyumlu olan bu sonuç, berberinin osteoblastogenezi aktive etmesiyle de paralel niteliktedir.

Tüm bu çalışmaların ve yaptığımız araştırmaların sonucunu kanıtlar niteliğe olarak incelediğimiz bir diğer parametre olan yeni kemik oluşum miktarı ve fibröz doku kalınlığı sonuçlarında, berberin kullanımının kemik oluşumunu artırırken fibröz iyileşmeyi azalttığı anlamlı olarak tespit edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Berberin'in, tibialarında kemik defekti oluşturulan ratlarda kemik iyileşmesi üzerine etkisinin incelendiği çalışmamızdan şu sonuçlar çıkarılabilmektedir:

1. Ülserasyon, seröz dejenerasyon, epitelizasyon ve ödem değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı. Bu durum incelenen gruplardan en erken olanın 14. günde sakrifiye edilmesinden kaynaklanmış olabilir. Daha erken günlerde alınacak doku örneklerinin incelenmesi önerilmektedir.

2. Çalışmamızda berberin, histopatolojik olarak incelenen polimorfonükleer lökositler ve mononükleer hücrelerin seviyesini berberin kullanan deney gruplarında anlamlı olarak azaltmıştır. Kemik iyileşmesini değerlendirmek için histopatolojik olarak incelenen osteoblastik aktivite, yeni kemik oluşumu, OPG ekspresyon seviyeleri berberin kullanan gruplarda anlamlı olarak fazla bulundu. Osteoklastik aktivite, fibröz doku kalınlığı, RANK ekspresyon seviyesi ve RANKL ekspresyon seviyesi berberin kullanan gruplarda anlamlı olarak düşük çıktı. Bu sonuçlar, diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda bildirilen berberinin antiinflamatuvar etkisiyle ve kemik iyileşmesini artırdığı sonucuyla uyumludur.

3. Çalışmamızda da gösterdiğimiz, Berberin'in antiinflamatuvar özelliklerinin ve kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin klinik şartlarda uygulanabilmesi için, zayıf çözünürlük, kısa yarılanma ömrü ve bağırsaklarda büyük ilk geçiş etkisi dahil olmak üzere, bazı önemli sorunların ele alınması gerekmektedir.

4. Berberin, geleneksel tıbbi bir üründür. Klinikte, osteoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyebileceği gibi kemik rejenerasyonunu teşvik etmek için osteoklastların üretimini de inhibe edebilecektir. Kemik için implant uygulamalarında Berberinin hem osteogenez etkisi hem de antiinflamatuvar etkisi göz önünde bulundurularak berberinin implant malzemeleriyle kombinasyonu, düşük bağışıklık riskiyle osteogenezi daha iyi indükleyebilir ve kemik rejenerasyonunu teşvik edebilir.

5. Berberinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisinin ve oral ve maksillofasiyal cerrahi alanında kullanım alanının ve etkin dozunun tespiti için, hayvan deneyleri yanı sıra insanlar üzerinde yapılacak çalışmalarla da daha kapsamlı olarak değerlendirilmesi, bu alanda mevcut literatür bilgilerine olumlu katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKÇA

1. Simon, M. J., Niehoff, P., Kimmig, B., Wiltfang, J., & Ail, Y. (2010). Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clinical oral investigations*, 14, 51-58.,
2. Bouxsein, M. L., Turek, T. J., Blake, C. A., D'Augusta, D., Li, X., Stevens, M., Seeherman, H. J. & Wozney, J. M. (2001). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *JBJS*, 83(8), 1219-1230.
3. Martiniakova, M., Babikova, M., & Omelka, R. (2020). Pharmacological agents and natural compounds: available treatments for osteoporosis. *Journal of Physiology & Pharmacology*, 71(3).
4. Baker, D. D., & Alvi, K. A. (2004). Small-molecule natural products: new structures, new activities. *Current opinion in biotechnology*, 15(6), 576-583.
5. Wong, S. K., Chin, K. Y., & Ima-Nirwana, S. (2020). Berberine and musculoskeletal disorders: the therapeutic potential and underlying molecular mechanisms. *Phytomedicine*, 73, 152892.
6. Zou, K., Li, Z., Zhang, Y., Zhang, H. Y., Li, B., Zhu, W. L., Shi, J. Y., Jia, Q., & Li, Y. M. (2017). Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(2), 157-167.
7. Gu, C., Yin, Z., Nie, H., Liu, Y., Yang, J., Huang, G., Shen, J., Chen, L., & Fei, J. (2020). Identification of berberine as a novel drug for the treatment of multiple myeloma via targeting UHRF1. *BMC biology*, 18, 1-17.
8. Xu, D., Yang, W., Zhou, C., Liu, Y., & Xu, B. (2010). Preventive effects of berberine on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. *Planta medica*, 76(16), 1809-1813.
9. Kong, W., Wei, J., Abidi, P., Lin, M., Inaba, S., Li, C., Wang, Y., Wang, Z., Si, S., Pan, H., Wang, S., Wu, Ji., Wang, Y., Li, Z., Liu, J., & Jiang, J. D. (2004). Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nature medicine*, 10(12), 1344-1351.
10. Yin, J., Xing, H., & Ye, J. (2008). Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 57(5), 712-717.

11. Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., & Recker, R. (1996). Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. Instructional course lectures, 45, 371-386.
12. Parfitt, A. M. (1976). The actions of parathyroid hormone on bone: Relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease: Part III of IV parts: PTH and osteoblasts, the relationship between bone turnover and bone loss, and the state of the bones in primary hyperparathyroidism. *Metabolism*, 25(9), 1033-1069.
13. Parfitt, A. M. (1976). The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease: part IV of IV parts: the state of the bones in uremic hyperparathyroidism—The mechanisms of skeletal resistance to PTH in renal failure and pseudohypoparathyroidism and the role of PTH in osteoporosis, osteopetrosis, and osteofluorosis. *Metabolism*, 25(10), 1157-1188.
14. Burr, D. B. (2019). Bone morphology and organization. In *Basic and applied bone biology* (pp. 3-26). Academic Press.
15. Myllyharju, J., & Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *TRENDS in Genetics*, 20(1), 33-43.
16. Koch, M., Laub, F., Zhou, P., Hahn, R. A., Tanaka, S., Burgeson, R. E., Gerecke, D. R., Ramirez, F., & Gordon, M. K. (2003). Collagen XXIV, a vertebrate fibrillar collagen with structural features of invertebrate collagens: selective expression in developing cornea and bone. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43236-43244.
17. Boot-Handford, R. P., Tuckwell, D. S., Plumb, D. A., Rock, C. F., & Poulsom, R. (2003). A novel and highly conserved collagen (pro α 1 (XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31067-31077.
18. Matsuo, N., Tanaka, S., Gordon, M. K., Koch, M., Yoshioka, H., & Ramirez, F. (2006). CREB-AP1 protein complexes regulate transcription of the collagen XXIV gene (Col24a1) in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5445-5452.
19. Herring, G. M., Ashton, B. A., & Chipperfield, A. R. (1974). The isolation of soluble proteins, glycoproteins, and proteoglycans from bone. *Preparative Biochemistry*, 4(2), 179-200.
20. Lamoureux, F., Baud'huin, M., Duplomb, L., Heymann, D., & R  dini, F. (2007). Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays*, 29(8), 758-771.

21. Gleghorn, L., Ramesar, R., Beighton, P., & Wallis, G. (2005). A mutation in the variable repeat region of the aggrecan gene (AGC1) causes a form of spondyloepiphyseal dysplasia associated with severe, premature osteoarthritis. *The American Journal of Human Genetics*, 77(3), 484-490.
22. Vigetti, D., Karousou, E., Viola, M., Deleonibus, S., De Luca, G., & Passi, A. (2014). Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(8), 2452-2459.
23. Millán, J. L., & Whyte, M. P. (2016). Alkaline phosphatase and hypophosphatasia. *Calcified tissue international*, 98, 398-416.
24. Bhattacharya, S., Bunick, C. G., & Chazin, W. J. (2004). Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1742(1-3), 69-79.
25. Delmas, P. D., Tracy, R. P., Riggs, B. L., & Mann, K. G. (1984). Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis. *Calcified tissue international*, 36, 308-316.
26. Väänänen, H. K., & Laitala-Leinonen, T. (2008). Osteoclast lineage and function. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 132-138.
27. Kobayashi, Y., Udagawa, N., & Takahashi, N. (2009). Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 19(1).
28. Crockett, J. C., Mellis, D. J., Scott, D. I., & Helfrich, M. H. (2011). New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporosis International*, 22, 1-20.
29. Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman D. & Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656), 175-179.
30. Arey, L. B. (1920). The origin, growth and fate of osteoclasts and their relation to bone resorption. *American Journal of Anatomy*, 26(3), 314-345.
31. Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J. D., Schu, P. & Von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13453-13458.

32. Bossard, M. J., Tomaszek, T. A., Thompson, S. K., Amegadzie, B. Y., Hanning, C. R., Jones, C., ... & Levy, M. A. (1996). Proteolytic Activity of Human Osteoclast Cathepsin K: Expression, Purification, Activation, And Substrate Identification, *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12517-12524.
33. Goujon, E. (1869). Recherches expérimentales sur les propriétés physiologiques de la moelle des os. *J de l'Anatomie et de la Physiologie Normales et Pathologiques de l'Homme et des Animaux*, 6, 399.
34. Owen, M., & Friedenstein, A. J. (2007). Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. In *Ciba Foundation Symposium 136-Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues: Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues: Ciba Foundation Symposium 136* (pp. 42-60). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd..
35. Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*, 2(4), 313-319.
36. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell proliferation*, 20(3), 263-272.
37. Nahian, A., & Davis, D. D. (2022). Histology, osteoprogenitor cells. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
38. Ibrahim, A., Bulstrode, N. W., Whitaker, I. S., Eastwood, D. M., Dunaway, D., & Ferretti, P. (2016). Suppl-3, M5: nanotechnology for stimulating osteoprogenitor differentiation. *The Open Orthopaedics Journal*, 10, 849.
39. Henrichsen, J. L., Wilhem, S. K., Siljander, M. P., Kalma, J. J., & Karadsheh, M. S. (2018). Treatment of patella fractures. *Orthopedics*, 41(6), e747-e755.
40. Sui, Z., Sun, H., Weng, Y., Zhang, X., Sun, M., Sun, R., ... & Zhang, L. (2020). Quantitative proteomics analysis of deer antlerogenic periosteal cells reveals potential bioactive factors in velvet antlers. *Journal of Chromatography A*, 1609, 460496.
41. De Baat, P., Heijboer, M. P., & De Baat, C. (2005). Development, physiology, and cell activity of bone. *Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde*, 112(7), 258-263.
42. Bahney, C. S., Zondervan, R. L., Allison, P., Theologis, A., Ashley, J. W., Ahn, J., ... & Hankenson, K. D. (2019). Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research®*, 37(1), 35-50.
43. Buckwalter, J. A., & Cooper, R. R. (1987). Bone structure and function. *Instructional course lectures*, 36, 27-48.

44. Dwek, J. R. (2010). The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence?. *Skeletal radiology*, 39(4), 319-323.
45. Squier, C. A., Ghoneim, S., & Kremenak, C. R. (1990). Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *Journal of anatomy*, 171, 233.
46. Allen, M. R., Hock, J. M., & Burr, D. B. (2004). Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*, 35(5), 1003-1012.
47. de Souza, L. E. B., Malta, T. M., Kashima Haddad, S., & Covas, D. T. (2016). Mesenchymal stem cells and pericytes: to what extent are they related?. *Stem cells and development*, 25(24), 1843-1852.
48. Diaz-Flores L., Gutierrez, R., Lopez-Alonso, A., Gonzalez, R., Varela, H., (1992). Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007), 275, 280-286.
49. Boskey, A. L., & Posner, A. S. (1984). Bone structure, composition, and mineralization. *The Orthopedic clinics of North America*, 15(4), 597-612.
50. Sims, N. A., & Vrahnas, C. (2014). Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, 22-28.
51. Christodoulou, C., Spencer, J. A., Yeh, S. C. A., Turcotte, R., Kokkaliaris, K. D., Panero, R., Ramos, A., Guo, G., Seyedhassantehrani, N., Esipova, T. V., Vinogradov, S. A., Rudzinskas, S., Zhang, Y., Perkins, A. S., Orkin, S. H., Calogero, R. A., Schroeder, T., Lin C. P. & Camargo, F. D. (2020). Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells. *Nature*, 578(7794), 278-283.
52. Weiner, S., & Wagner, H. D. (1998). The material bone: structure-mechanical function relations. *Annual review of materials science*, 28(1), 271-298.
53. Reznikov, N., Shahar, R., & Weiner, S. (2014). Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta biomaterialia*, 10(9), 3815-3826.
54. Gartner, L. P., *Textbook of histology*. Elsevier Health Sciences, Fifth Edition, Canada, 2020.
55. Burr, D. B., & Allen, M. R., *Basic and applied bone biology*, Second Edition, Academic Press, 2019.
56. L Mescher, A., *Junqueira's basic histology*, 14th edition, MC GRAW HILL, New York, 2016
57. Havers, C. (1729). *Osteologia nova: or some new observations of the bones...* W. Innys.

58. Cooper, R. R., Milgram, J. W., & Robinson, R. A. (1966). Morphology of the osteon: an electron microscopic study. *JBJS*, 48(7), 1239-1271.
59. Stover, S. M., Pool, R. R., Martin, R. B., & Morgan, J. P. (1992). Histological features of the dorsal cortex of the third metacarpal bone mid-diaphysis during postnatal growth in thoroughbred horses. *Journal of Anatomy*, 181(Pt 3), 455.
60. Lassen, N. E., Andersen, T. L., Pløen, G. G., Søre, K., Hauge, E. M., Harving, S., ... & Delaisse, J. M. (2017). Coupling of bone resorption and formation in real time: new knowledge gained from human Haversian BMUs. *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(7), 1395-1405.
61. Ascenzi, M. G., & Lomovtsev, A. (2006). Collagen orientation patterns in human secondary osteons, quantified in the radial direction by confocal microscopy. *Journal of structural biology*, 153(1), 14-30.
62. Ascenzi, M. G., & Roe, A. K. (2012). The osteon: the micromechanical unit of compact bone. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 17(4), 1551-1581.
63. Frost, H. M. (1991). Some ABC's of skeletal pathophysiology. 6. The growth/modeling/remodeling distinction. *Calcified Tissue International*, 49(5), 301-302.
64. Kahla, R. B., & Barkaoui, A., Bone Remodeling Process: Mechanics, Biology, and Numerical Modeling. Mara Conner, India, 2021.
65. Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of biological chemistry*, 285(33), 25103-25108.
66. Ma, Y. L., Cain, R. L., Halladay, D. L., Yang, X., Zeng, Q., Miles, R. R., ... & Onyia, J. E. (2001). Catabolic effects of continuous human PTH (1–38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*, 142(9), 4047-4054.
67. Delaisse, J. M. (2014). The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *BoneKEY reports*, 3.
68. Andersen, T. L., Abdelgawad, M. E., Kristensen, H. B., Hauge, E. M., Rolighed, L., Bollerslev, J., ... & Delaisse, J. M. (2013). Understanding coupling between bone resorption and formation: are reversal cells the missing link?. *The American journal of pathology*, 183(1), 235-246.
69. Everts, V., Delaisse, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., & Beertsen, W. (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(1), 77-90.

70. Stylianou, E., & Saklatvala, J. (1998). Interleukin-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 30(10), 1075-1079.
71. Hofbauer, L. C., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L., & Khosla, S. (1999). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, 25(3), 255-259.
72. Jimi, E., Nakamura, I., Duong, L. T., Ikebe, T., Takahashi, N., Rodan, G. A., & Suda, T. (1999). Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Experimental cell research*, 247(1), 84-93.
73. Lorenzo, J. A., Sousa, S. L., Alander, C., Raisz, L. G., & Dinarello, C. A. (1987). Comparison of the bone-resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to interleukin 1. *Endocrinology*, 121(3), 1164-1170.
74. Lee, S. K., Gardner, A. E., Kalinowski, J. F., Jastrzebski, S. L., & Lorenzo, J. A. (2006). RANKL-stimulated osteoclast-like cell formation in vitro is partially dependent on endogenous interleukin-1 production. *Bone*, 38(5), 678-685.
75. Lee, S. K., Kalinowski, J., Jastrzebski, S., & Lorenzo, J. A. (2002). 1, 25 (OH) 2 vitamin D3-stimulated osteoclast formation in spleen-osteoblast cocultures is mediated in part by enhanced IL-1 α and receptor activator of NF- κ B ligand production in osteoblasts. *The Journal of Immunology*, 169(5), 2374-2380.
76. Nakamura, I., & Jimi, E. (2006). Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1. *Vitamins & Hormones*, 74, 357-370.
77. Sato, K., Fujii, Y., Asano, S., Ohtsuki, T., Kawakami, M., Kasono, K., Tsushima, Toshio. & Shizume, K. (1986). Recombinant human interleukin 1 alpha and beta stimulate mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) to produce macrophage-colony stimulating activity and prostaglandin E2. *Biochemical and biophysical research communications*, 141(1), 285-291.
78. Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K. & Taga, T. (1993). Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11924-11928.
79. Palmqvist, P., Lundberg, P., Persson, E., Johansson, A., Lundgren, I., Lie, A., Conaway, H. H. & Lerner, U. H. (2006). Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with

- increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2414-2429.
80. Stashenko, P. H. I. L. I. P., Dewhirst, F. E., Peros, W. J., Kent, R. L., & Ago, J. M. (1987). Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 138(5), 1464-1468.
 81. Tashjian Jr, A. H., Voelkel, E. F., Lazzaro, M., Goad, D., Bosma, T., & Levine, L. (1987). Tumor necrosis factor- α (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology*, 120(5), 2029-2036.
 82. Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.
 83. Tyrovola, J. B., Spyropoulos, M. N., Makou, M., & Perrea, D. (2008). Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *Journal of oral science*, 50(4), 367-376.
 84. Alhashimi, N., Frithiof, L., Brudvik, P., & Bakhiet, M. (2001). Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 119(3), 307-312.
 85. Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. & Boyle, W. J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *cell*, 93(2), 165-176.
 86. Kostenuik, P. J. (2005). Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Current opinion in pharmacology*, 5(6), 618-625.
 87. Ham, A. W., & Cormack, D. H., *Histophysiology of Cartilage. Bone and Joints*. JB Lippincott. Philadelphia, 1979.
 88. Parfitt, A. M. (1983). The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation.*, 143-223.
 89. Urist, M. R. (1980). Bone transplants and implants. *Fundamental and clinical bone physiology*, 331-368.
 90. Bucholz, R. W., *Rockwood and Green's Fractures in Adults: Two Volumes Plus Integrated Content Website (Rockwood, Green, and Wilkins' Fractures)*. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

91. Frost, H. M. (1989). The Biology of Fracture Healing: An Overview for Clinicians. Part II. Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007), 248, 294-309.
92. Buser, D., Dahlin, C., & Schenk, R., Guided bone regeneration. Chicago Quintessence, 1994.
93. Schenk, R. K., Histophysiology of bone remodelling and bone repair. Perspectives on biomaterials, 75-94, Elsevier Science, Amsterdam, 1986.
94. Kabaca, G., Diabetik sıçanlarda selenyumun kemik iyileşmesi üzerine etkileri. Tez (Doktora). İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. İstanbul, 2007.
95. Ballı, B., Kemik iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler. İÜ Diş Hekimliği Fakültesi Bitirme Tezi, 2004.
96. Cruess, R. L., & Dumont, J. (1975). Healing of bone, tendon, and ligament. Fractures, 97, 32-4.
97. Marks Jr, S. C., & Popoff, S. N. (1988). Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. American Journal of Anatomy, 183(1), 1-44.
98. Halıcı, M., Öner, M., Güney, A., Canöz, Ö., Narin, F., & Halıcı, C. (2010). Melatonin promotes fracture healing in the rat model. Joint Diseases and Related Surgery, 21(3), 172-177.
99. Reeve, J., Meunier, P. J., Parsons, J. A., Bernat, M., Bijvoet, O. L., Courpron, P., ... & Potts, J. T. (1980). Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. Br Med J, 280(6228), 1340-1344.
100. Lufkin, E. G., Wahner, H. W., O'Fallon, W. M., Hodgson, S. F., Kotowicz, M. A., Lane, A. W., Judd, H. L., Caplan, R. H., Riggs, L., & Riggs, B. L. (1992). Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. Annals of internal Medicine, 117(1), 1-9.
101. Pollak, D., Floman, Y., Simkin, A., Avinezer, A., & Freund, H. R. (1986). The effect of protein malnutrition and nutritional support on the mechanical properties of fracture healing in the injured rat. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 10(6), 564-567.
102. Yılmaz, C., Erdemli, E., Selek, H., Kinik, H., Arıkan, M., & Erdemli, B. (2001). The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. Archives of orthopaedic and trauma surgery, 121, 426-428.
103. Miller, M. D., Miller'ın Ortopedi Kitabı (Çev. Yetkin H ve Yazıcı M) Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006.

104. Dalle Carbonare, L., & Giannini, S. (2004). Histologic diagnosis of metabolic bone diseases: Bone histomorphometry. *Reumatismo-The Italian Journal of Rheumatology*, 56(1), 15-23.
105. Folwarczna, J., Janiec, W., & Śliwiński, L. (2004). Effects of heparin and low-molecular-weight heparins on bone mechanical properties in rats. *Thrombosis and haemostasis*, 92(11), 940-946.
106. Baldik, Y., Talu, U., Altinel, L., Bilge, H., Demiryont, M., & Aykac-Toker, G. (2002). Bone healing regulated by nitric oxide: an experimental study in rats. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 404, 343-352.
107. Kanis, J. A., Johnell, O., Odén, A., Johansson, H., De Laet, C., Eisman, J. A., ... & Tenenhouse, A. (2005). Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporosis international*, 16, 155-162.
108. Seitz, I. A., Teven, C. M., & Reid, R. R. (2012). Repair and grafting of bone. *Plastic surgery*, 1, 285-314.
109. Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop D. J. & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
110. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284(5411), 143-147.
111. Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12), 4279-4295.
112. De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I. M., Archer, C. W., Jones, E. A., McGonagle, D., Mitsiadis, T. A., Pitzalis, C. & Luyten, F. P. (2006). Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis & Rheumatism*, 54(4), 1209-1221.
113. Miura, Y., Fitzsimmons, J. S., Commisso, C. N., Gallay, S. H., & O'DRISCOLL, S. W. (1994). Enhancement of Periosteal Chondrogenesis In Vitro Dose-Response for Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF- β 1). *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 301, 271-280.

114. Lavasani, M., Lu, A., Thompson, S. D., Robbins, P. D., Huard, J., & Niedernhofer, L. J. (2013). Isolation of muscle-derived stem/progenitor cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. *Stem Cells and Aging: Methods and Protocols*, 53-65.
115. Xu, G. P., Zhang, X. F., Sun, L., & Chen, E. M. (2020). Current and future uses of skeletal stem cells for bone regeneration. *World journal of stem cells*, 12(5), 339.
116. Shane, E., Burr, D., Ebeling, P. R., Abrahamsen, B., Adler, R. A., Brown, T. D., ... & Whyte, M. (2010). Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(11), 2267-2294.
117. Neer, R. M., Arnaud, C. D., Zanchetta, J. R., Prince, R., Gaich, G. A., Reginster, J. Y., Hodsman, A. B., Eriksen, E. F., Ish-Shalom, S., Genant, H. K., Wang, O., Mellström, D., Oefjord, E. S., Marcinowska-Suchowierska, E., Salmi, J., Mulder, H., Halse, J., Sawicki A. Z. & Mitlak, B. H. (2001). Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *New England journal of medicine*, 344(19), 1434-1441.
118. Greenspan, S. L., Bone, H. G., Ettinger, M. P., Hanley, D. A., Lindsay, R., Zanchetta, J. R., ... & Treatment of Osteoporosis with Parathyroid Hormone Study Group*. (2007). Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 146(5), 326-339.
119. Jia, M., Nie, Y., Cao, D. P., Xue, Y. Y., Wang, J. S., Zhao, L., Rahman, K., Zhang, Q. Y. & Qin, L. P. (2012). Potential antiosteoporotic agents from plants: a comprehensive review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012.
120. Wang, T., Liu, Q., Tjhi, W., Zhao, J., Lu, A., Zhang, G., Xiang Tan, R., Zhou, M., Xu, J., & Tian Feng, H. (2017). Therapeutic potential and outlook of alternative medicine for osteoporosis. *Current drug targets*, 18(9), 1051-1068.
121. Domazetovic, V., Marcucci, G., Iantomasi, T., Brandi, M. L., & Vincenzini, M. T. (2017). Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 14(2), 209.
122. Pietschmann, P., Mechtcheriakova, D., Meshcheryakova, A., Föger-Samwald, U., & Ellinger, I. (2016). Immunology of osteoporosis: a mini-review. *Gerontology*, 62(2), 128-137.

123. Liu, S. C., Lee, H. P., Hung, C. Y., Tsai, C. H., Li, T. M., & Tang, C. H. (2015). Berberine attenuates CCN2-induced IL-1 β expression and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. *Toxicology and applied pharmacology*, 289(1), 20-29.
124. Pan, G. Y., Wang, G. J., Liu, X. D., Fawcett, J. P., & Xie, Y. Y. (2002). The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption. *Pharmacology & toxicology*, 91(4), 193-197.
125. Chen, W., Miao, Y. Q., Fan, D. J., Yang, S. S., Lin, X., Meng, L. K., & Tang, X. (2011). Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *Aaps Pharmscitech*, 12, 705-711.
126. Fratter, A. (2015). New oral delivery system to improve absorption of berberine: likely interaction of cationized chitosan with PG-P pump. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 5(1).
127. Imenshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2016). *Berberis vulgaris* and berberine: an update review. *Phytotherapy research*, 30(11), 1745-1764.
128. Feng, R., Shou, J. W., Zhao, Z. X., He, C. Y., Ma, C., Huang, M., ... & Jiang, J. D. (2015). Transforming berberine into its intestine-absorbable form by the gut microbiota. *Scientific Reports*, 5(1), 12155.
129. Tan, X. S., Ma, J. Y., Feng, R., Ma, C., Chen, W. J., Sun, Y. P., ... & Jiang, J. D. (2013). Tissue distribution of berberine and its metabolites after oral administration in rats. *PloS one*, 8(10), e77969.
130. Zuo, F., Nakamura, N., Akao, T., & Hattori, M. (2006). Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(12), 2064-2072.
131. Tsai, P. L., & Tsai, T. H. (2004). Hepatobiliary excretion of berberine. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(4), 405-412.
132. Qiu, F., Zhu, Z., Kang, N., Piao, S., Qin, G., & Yao, X. (2008). Isolation and identification of urinary metabolites of berberine in rats and humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(11), 2159-2165.
133. Kumar, A., Chopra, K., Mukherjee, M., Pottabathini, R., & Dhull, D. K. (2015). Current knowledge and pharmacological profile of berberine: an update. *European journal of pharmacology*, 761, 288-297.

134. Ma, J. Y., Feng, R., Tan, X. S., Ma, C., Shou, J. W., Fu, J., ... & Jiang, J. D. (2013). Excretion of berberine and its metabolites in oral administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(11), 4181-4192.
135. Shen, M. P., Sun, Q., & Wang, H. Studies on the intravenous pharmacokinetics and oral absorption of berberine HCL in beagle dogs. *Chin Pharmacol Bull* 1993; 9: 64–67. External Resources Chemical Abstracts Service (CAS).
136. Feng, R., Zhao, Z. X., Ma, S. R., Guo, F., Wang, Y., & Jiang, J. D. (2018). Gut microbiota-regulated pharmacokinetics of berberine and active metabolites in beagle dogs after oral administration. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 214.
137. Gu, S., Cao, B., Sun, R., Tang, Y., Paletta, J. L., Wu, X. L., ... & Wang, G. (2015). A metabolomic and pharmacokinetic study on the mechanism underlying the lipid-lowering effect of orally administered berberine. *Molecular BioSystems*, 11(2), 463-474.
138. Wang, X., Wang, Q., Liu, Z., & Zheng, X. (2017). Preparation, pharmacokinetics and tumour-suppressive activity of berberine liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(6), 625-632.
139. Bhattacharyya, R., Saha, B., Tyagi, M., Bandyopadhyay, S. K., Patro, B. S., & Chattopadhyay, S. (2017). Differential modes of photosensitisation in cancer cells by berberine and coralyne. *Free Radical Research*, 51(7-8), 723-738.
140. Li, X. Y., Zhao, Z. X., Huang, M., Feng, R., He, C. Y., Ma, C., ... & Jiang, J. D. (2015). Effect of Berberine on promoting the excretion of cholesterol in high-fat diet-induced hyperlipidemic hamsters. *Journal of translational medicine*, 13(1), 1-9.
141. Imanshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2008). Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytotherapy research*, 22(8), 999-1012.
142. Pang, B., Zhao, L. H., Zhou, Q., Zhao, T. Y., Wang, H., Gu, C. J., & Tong, X. L. (2015). Application of berberine on treating type 2 diabetes mellitus. *International journal of endocrinology*, 2015.
143. Kheir, M. M., Wang, Y., Hua, L., Hu, J., Li, L., Lei, F., & Du, L. (2010). Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(4), 1105-1110.
144. Birdsall, T. C. (1997). Berberine: Therapeutic potential of alkaloid found in several medicinal plants. *Altern. Med. Rev.*, 2, 94-103.

145. Linn, Y. C., Lu, J., Lim, L. C., Sun, H., Sun, J., Zhou, Y., & Ng, H. S. (2012). Berberine-induced haemolysis revisited: safety of *Rhizoma coptidis* and *cortex phellodendri* in chronic haematological diseases. *Phytotherapy Research*, 26(5), 682-686.
146. Ye, M., Fu, S., Pi, R., & He, F. (2009). Neuropharmacological and pharmacokinetic properties of berberine: a review of recent research. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(7), 831-837.
147. Peng, W. H., Lo, K. L., Lee, Y. H., Hung, T. H., & Lin, Y. C. (2007). Berberine produces antidepressant-like effects in the forced swim test and in the tail suspension test in mice. *Life sciences*, 81(11), 933-938.
148. Wang, X., Su, B., Zheng, L., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2009). The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 109, 153-159.
149. Wang, X., Wang, R., Xing, D., Su, H., Ma, C., Ding, Y., & Du, L. (2005). Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of *Coptidis rhizoma* extract. *Life Sciences*, 77(24), 3058-3067.
150. Wang, F., Zhao, G., Cheng, L., Zhou, H. Y., Fu, L. Y., & Yao, W. X. (2004). Effects of berberine on potassium currents in acutely isolated CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *Brain research*, 999(1), 91-97.
151. Hussien, H. M., Abd-Elmegied, A., Ghareeb, D. A., Hafez, H. S., Ahmed, H. E., & Abd El-moneam, N. (2018). Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals-induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats. *Food and chemical toxicology*, 111, 432-444.
152. Abd El-Wahab, A. E., Ghareeb, D. A., Sarhan, E. E., Abu-Serie, M. M., & El Demellawy, M. A. (2013). In vitro biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 1-12.
153. Bhutada, P., Mundhada, Y., Bansod, K., Tawari, S., Patil, S., Dixit, P., ... & Mundhada, D. (2011). Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Behavioural brain research*, 220(1), 30-41.
154. Zhu, F., & Qian, C. (2006). Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1 β and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC neuroscience*, 7(1), 1-9.

155. Zhang, J., Yang, J. Q., He, B. C., Zhou, Q. X., Yu, H. R., Tang, Y., & Liu, B. Z. (2009). Berberine and total base from rhizoma coptis chinensis attenuate brain injury in an aluminum-induced rat model of neurodegenerative disease. *Saudi medical journal*, 30(6), 760-766.
156. Kulkarni, S. K., & Dhir, A. (2010). Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24(3), 317-324.
157. Kong, L. D., Cheng, C. H., & Tan, R. X. (2001). Monoamine oxidase inhibitors from rhizoma of *Coptis chinensis*. *Planta Medica*, 67(01), 74-76.
158. Lau, C. W., Yao, X. Q., Chen, Z. Y., Ko, W. H., & Huang, Y. (2001). Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovascular Drug Reviews*, 19(3), 234-244.
159. Affuso, F., Mercurio, V., Fazio, V., & Fazio, S. (2010). Cardiovascular and metabolic effects of Berberine. *World journal of cardiology*, 2(4), 71.
160. Min Xia; Mei-Hong Luo, L. (2015). Study progress of berberine for treating cardiovascular disease. *慢性疾病与转化医学 (英文)*, 1(004).
161. Bagade, A., Tumbigeremutt, V., & Pallavi, G. (2017). Cardiovascular effects of berberine: a review of the literature. *Journal of restorative medicine*, 6(1), 37.
162. Xu, Z., Cao, H. Y., & Li, Q. (1989). Protective effects of berberine on spontaneous ventricular fibrillation in dogs after myocardial infarction. *Zhongguo yao li xue bao= Acta Pharmacologica Sinica*, 10(4), 320-324.
163. Huang, W. M., Yan, H., Jin, J. M., Yu, C., & Zhang, H. (1992). Beneficial effects of berberine on hemodynamics during acute ischemic left ventricular failure in dogs. *Chinese medical journal*, 105(12), 1014-1019.
164. QM, C. (1986). Studies on the hypoglycemic effect of *Coptis chinensis* and berberine. *Yao Xue Xue Bao*, 21, 401-406.
165. Dong, H., Wang, N., Zhao, L., & Lu, F. (2012). Berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a systemic review and meta-analysis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012.
166. Zhang, M., & Chen, L. (2012). Berberine in type 2 diabetes therapy: a new perspective for an old antidiarrheal drug?. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(4), 379-386.

167. Xia, X., Yan, J., Shen, Y., Tang, K., Yin, J., Zhang, Y., Yang, D., Liang, H., Ye, J. & Weng, J. (2011). Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *PLoS one*, 6(2), e16556.
168. Yin, J., Gao, Z., Liu, D., Liu, Z., & Ye, J. (2008). Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.
169. Lee, Y. S., Kim, W. S., Kim, K. H., Yoon, M. J., Cho, H. J., Shen, Y., Ye, J. M., Lee, C. H., Oh, W. K., Kim, C. T., Hohnen-Behrens, C., Gosby, A., Kraegen, E. W., James, D. E. & Kim, J. B. (2006). Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes*, 55(8), 2256-2264.
170. Kim, S. H., Shin, E. J., Kim, E. D., Bayarara, T., Frost, S. C., & Hyun, C. K. (2007). Berberine activates GLUT1-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(11), 2120-2125.
171. Kong, W. J., Zhang, H., Song, D. Q., Xue, R., Zhao, W., Wei, J., ... & Jiang, J. D. (2009). Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression. *Metabolism*, 58(1), 109-119.
172. Zhang, H., Kong, W. J., Shan, Y. Q., Song, D. Q., Li, Y., Wang, Y. M., ... & Jiang, J. D. (2010). Protein kinase D activation stimulates the transcription of the insulin receptor gene. *Molecular and cellular endocrinology*, 330(1-2), 25-32.
173. Pérez-Rubio, K. G., González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., Robles-Cervantes, J. A., & Espinel-Bermúdez, M. C. (2013). Effect of berberine administration on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and insulin secretion. *Metabolic syndrome and related disorders*, 11(5), 366-369.
174. Derosa, G., Limas, C. P., Macías, P. C., Estrella, A., & Maffioli, P. (2014). State of the art papers Dietary and nutraceutical approach to type 2 diabetes. *Archives of medical science*, 10(2), 336-344.
175. Pan, G. Y., Huang, Z. J., Wang, G. J., Fawcett, J. P., Liu, X. D., Zhao, X. C., Sun, J. G. & Xie, Y. Y. (2003). The antihyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta medica*, 69(07), 632-636.
176. Olivares-Navarrete, R., Raines, A. L., Hyzy, S. L., Park, J. H., Hutton, D. L., Cochran, D. L., ... & Schwartz, Z. (2012). Osteoblast maturation and new bone formation in response

to titanium implant surface features are reduced with age. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(8), 1773-1783.

177. Duplomb, L., Dagouassat, M., Jourdon, P., & Heymann, D. (2007). Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem cells*, 25(3), 544-552.

178. Tao, K., Xiao, D., Weng, J., Xiong, A., Kang, B., & Zeng, H. (2016). Berberine promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells osteogenic differentiation via canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Toxicology letters*, 240(1), 68-80.

179. Han, Y., Kim, M. J., & Lee, K. Y. (2018). Berberine derivative, Q8, stimulates osteogenic differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 504(1), 340-345.

180. Huang, C., Zhang, Y., Gong, Z., Sheng, X., Li, Z., Zhang, W., & Qin, Y. (2006). Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR γ pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(2), 571-578.

181. Lee, H. W., Suh, J. H., Kim, H. N., Kim, A. Y., Park, S. Y., Shin, C. S., Choi, J. Y., & Kim, J. B. (2008). Berberine promotes osteoblast differentiation by Runx2 activation with p38 MAPK. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(8), 1227-1237.

182. Xin, B. C., Wu, Q. S., Jin, S., Luo, A. H., Sun, D. G., & Wang, F. (2020). Berberine promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells through activating EGFR-MAPK-Runx2 pathways. *Pathology & Oncology Research*, 26, 1677-1685.

183. Li, W., Liu, Y., Wang, B., Luo, Y., Hu, N., Chen, D., Zhang, X. & Xiong, Y. (2016). Protective effect of berberine against oxidative stress-induced apoptosis in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(6), 4041-4048.

184. Li, Q. J., & Luo, Q. (2018). Berberine promotes the in vitro migration of bone marrow mesenchymal stem cells via activation of PI3K/AKT pathway. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 22(29), 4620.

185. Liu, M., & Xu, Z. (2021). Berberine promotes the proliferation and osteogenic differentiation of alveolar osteoblasts through regulating the expression of miR-214. *Pharmacology*, 106(1-2), 70-78.

186. Zhou, R., Chen, F., Liu, H., Zhu, X., Wen, X., Yu, F., ... & Xu, Y. (2021). Berberine ameliorates the LPS-induced imbalance of osteogenic and adipogenic differentiation in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 23(5), 1-11.

187. Zhang, R., Yang, J., Wu, J., Xiao, L., Miao, L., Qi, X., ... & Sun, W. (2019). Berberine promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells with therapeutic potential in periodontal regeneration. *European journal of pharmacology*, 851, 144-150.
188. Bebek, G., & Yang, J. (2007). PathFinder: mining signal transduction pathway segments from protein-protein interaction networks. *BMC bioinformatics*, 8(1), 1-13.
189. Isfort, I., Elges, S., Cyra, M., Berthold, R., Renner, M., Mechtersheimer, G., ... & Trautmann, M. (2019). Prevalence of the Hippo effectors YAP1/TAZ in tumors of soft tissue and bone. *Scientific Reports*, 9(1), 19704.
190. Deng, Y., Wu, A., Li, P., Li, G., Qin, L., Song, H., & Mak, K. K. (2016). Yap1 regulates multiple steps of chondrocyte differentiation during skeletal development and bone repair. *Cell reports*, 14(9), 2224-2237.
191. Yang, B., Sun, H., Xu, X., Zhong, H., Wu, Y., & Wang, J. (2020). YAP1 inhibits the induction of TNF- α -stimulated bone-resorbing mediators by suppressing the NF- κ B signaling pathway in MC3T3-E1 cells. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4698-4708.
192. Teo, B. H. D., Bobryshev, Y. V., Teh, B. K., Wong, S. H., & Lu, J. (2012). Complement C1q production by osteoclasts and its regulation of osteoclast development. *Biochemical Journal*, 447(2), 229-237.
193. Han, S. Y., & Kim, Y. K. (2019). Berberine suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation by inhibiting c-Fos and NFATc1 expression. *The American journal of Chinese medicine*, 47(02), 439-455.
194. Lee, K., Chung, Y. H., Ahn, H., Kim, H., Rho, J., & Jeong, D. (2016). Selective regulation of MAPK signaling mediates RANKL-dependent osteoclast differentiation. *International Journal of Biological Sciences*, 12(2), 235.
195. Novack, D. V. (2011). Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell research*, 21(1), 169-182.
196. Hu, J. P., Nishishita, K., Sakai, E., Yoshida, H., Kato, Y., Tsukuba, T., & Okamoto, K. (2008). Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF- κ B and Akt pathways. *European journal of pharmacology*, 580(1-2), 70-79.
197. Dinesh, P., & Rasool, M. (2018). Berberine inhibits IL-21/IL-21R mediated inflammatory proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the attenuation of PI3K/Akt signaling pathway and ameliorates IL-21 mediated osteoclastogenesis. *Cytokine*, 106, 54-66.

198. Zhou, L., Song, F., Liu, Q., Yang, M., Zhao, J., Tan, R., Xu, J., Zhang, G., Quinn J. M.W., Tickner J. & Xu, J. (2015). Berberine sulfate attenuates osteoclast differentiation through RANKL induced NF- κ B and NFAT pathways. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 27087-27096.
199. He, X. F., Zhang, L., Zhang, C. H., Zhao, C. R., Li, H., Zhang, L. F., Tian, G. F., Guo, M. F., Dai, Z. & Sui, F. G. (2017). Berberine alleviates oxidative stress in rats with osteoporosis through receptor activator of NF- κ B/receptor activator of NF- κ B ligand/osteoprotegerin (RANK/RANKL/OPG) pathway. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 17(4), 295.
200. Tang, P., Xiong, Q., Ge, W., & Zhang, L. (2014). The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. *RNA biology*, 11(11), 1355-1363.
201. Sun, Q., Zhang, B., Zhu, W., Wei, W., Ma, J., & Tay, F. R. (2019). A potential therapeutic target for regulating osteoporosis via suppression of osteoclast differentiation. *Journal of dentistry*, 82, 91-97.
202. Jia, X., Jia, L., Mo, L., Yuan, S., Zheng, X., He, J., ... & Zhou, X. (2019). Berberine ameliorates periodontal bone loss by regulating gut microbiota. *Journal of dental research*, 98(1), 107-116.
203. Green, J. A. C. O. B., Schotland, S. A. N. D. R. A., Stauber, D. J., Kleeman, C. R., & Clemens, T. L. (1995). Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(5), C1090-C1103.
204. Murakami, Y., Kojima, T., Nagasawa, T., Kobayashi, H., & Ishikawa, I. (2003). Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *Journal of periodontology*, 74(6), 780-786.
205. Carroll, J. D. (2011). Photomedicine and LLLT literature watch. *Photomedicine and laser surgery*, 29(2), 139-141.
206. Frame, J. W. (1980). A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of oral surgery (American Dental Association: 1965)*, 38(3), 176-180.
207. Takagi, K., & Urist, M. R. (1982). The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Annals of surgery*, 196(1), 100.
208. Al-Hamed, F. S., Abu-Nada, L., Rodan, R., Sarrigiannidis, S., Ramirez-Garcialuna, J. L., Moussa, H., ... & Tamimi, F. (2021). Differences in platelet-rich plasma composition influence bone healing. *Journal of clinical periodontology*, 48(12), 1613-1623.

209. Teotia, A. K., Qayoom, I., Singh, P., Mishra, A., Jaiman, D., Seppälä, J., ... & Kumar, A. (2021). Exosome-functionalized ceramic bone substitute promotes critical-sized bone defect repair in rats. *ACS Applied Bio Materials*, 4(4), 3716-3726.
210. Dilogu, I. H., Fiolin, J., Canintika, A. F., Pawitan, J. A., & Luviah, E. (2022). The Effect of Secretome, Xenogenic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, Bone Morphogenetic Protein-2, Hydroxyapatite Granule and Mechanical Fixation in Critical-Size Defects of Rat Models. *Archives of Bone and Joint Surgery*, 10(1), 17.
211. Xu, J., Shen, J., Sun, Y., Wu, T., Sun, Y., Chai, Y., Kang, Q., Rui, B. & Li, G. (2022). In vivo prevascularization strategy enhances neovascularization of β -tricalcium phosphate scaffolds in bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation*, 37, 143-151.
212. Cohen, T., Kossover, O., Peled, E., Bick, T., Hasanov, L., Chun, T. T., Cool, S., Lqwinson, D. & Seliktar, D. (2022). A combined cell and growth factor delivery for the repair of a critical size tibia defect using biodegradable hydrogel implants. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(4), 380-395.
213. Durmaz, B., Gunes, N., Koparal, M., Gul, M., Dundar, S., & Bingul, M. B. (2023). Investigation of the effects of quercetin and xenograft on the healing of bone defects: An experimental study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 13(1), 22-27.
214. Liu, F., Zhang, H., & Qing, L. S. (2013). Study on HPLC digital fingerprint of *Coptidis Rhizoma* and content determination of seven alkaloids. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 38(21), 3713-3719.
215. Mombeini, M. A., Kalantar, H., Sadeghi, E., Goudarzi, M., Khalili, H., & Kalantar, M. (2022). Protective effects of berberine as a natural antioxidant and anti-inflammatory agent against nephrotoxicity induced by cyclophosphamide in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 395(2), 187-194.
216. Liu, L., Xing, R., Xue, J., Fan, J., Zou, J., Song, X., Jia, R., Zou, Y., Li, L., Zhou, X., Lv, C., Wan, H., Zhao X. & Yin, Z. (2023). Low molecular weight fucoidan modified nanoliposomes for the targeted delivery of the anti-inflammation natural product berberine. *International Journal of Pharmaceutics*, 642, 123102.
217. Peng, Y., Sun, L., Guo, W., Liu, Z., Wang, T., Zou, T., Zhou, J., Yang, X. & Fan, X. (2023). Berberine protects cyclophosphamide and busulfan-induced premature ovarian insufficiency in mouse model. *Journal of Pharmacological Sciences*, 153(1), 46-54.

218. Chen, F. L., Yang, Z. H., Liu, Y., Li, L. X., Liang, W. C., Wang, X. C., ... & Hu, R. M. (2008). Berberine inhibits the expression of TNF α , MCP-1, and IL-6 in AcLDL-stimulated macrophages through PPAR γ pathway. *Endocrine*, 33, 331-337.
219. Xu, L., Zhang, Y., Xue, X., Liu, J., Li, Z. S., Yang, G. Y., Song, Y., Pan, Y., Ma, Y., Hu, S., Wen, A., Jia, Y., Rodriguez, L. M., Tull, M. B., Benante, K., Khan, S. A., Cao, Y., Jovanovic, B., Richmond, E., Umar, A., Bergan, R., Wu, K. & Wu, K. (2020). A phase I trial of berberine in Chinese with ulcerative colitis. *Cancer Prevention Research*, 13(1), 117-126.
220. Maity, B., Alam, S., Samanta, S., Prakash, R. G., & Govindaraju, T. (2022). Antioxidant silk fibroin composite hydrogel for rapid healing of diabetic wound. *Macromolecular Bioscience*, 22(9), 2200097.
221. Hu, J., Yu, X., Zhang, S., Zhang, Y., Chen, X., Iscience, Z. L.-, & 2023, undefined. (2023). Hydrogel with ROS scavenging effect encapsulates BR@ Zn-BTB nanoparticles for accelerating diabetic mice wound healing via multimodal therapy. *cell.com*JJ Hu, XZ Yu, SQ Zhang, YX Zhang, XL Chen, ZJ Long, HZ Hu, DH Xie, WH Zhang, JX ChenIscience, 2023•cell.com, 26, 106775.
222. Li, S., Wang, Y., Wang, S., Xie, J., Fu, T., & Li, S. (2023). In situ gelling hydrogel loaded with berberine liposome for the treatment of biofilm-infected wounds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1189010.
223. Huang, L., Zhang, X., Ma, X., Zhang, D., Li, D., Feng, J., Pan, X., Lü, J., Wang, X. & Liu, X. (2018). Berberine alleviates endothelial glycocalyx degradation and promotes glycocalyx restoration in LPS-induced ARDS. *International Immunopharmacology*, 65, 96-107.
224. Del Gaudio, M. P., Kraus, S. I., Melzer, T. M., Bustos, P. S., & Ortega, M. G. (2023). Antinociceptive effect and identification of berberine alkaloid in *Berberis ruscifolia* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 305, 116066.
225. Hajipour, S., Farbood, Y., Dianat, M., Nesari, A., & Sarkaki, A. (2023). Effect of Berberine against Cognitive Deficits in Rat Model of Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy (Behavioral, Biochemical, Molecular and Histological Evaluations). *Brain Sciences*, 13(6), 944.
226. Claes, L., Recknagel, S., & Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(3), 133-143.

227. Bastian, O., Pillay, J., Alblas, J., Leenen, L., Koenderman, L., & Blokhuis, T. (2011). Systemic inflammation and fracture healing. *Journal of leukocyte biology*, 89(5), 669-673.
228. Abaricia, J. O., Shah, A. H., Musselman, R. M., & Olivares-Navarrete, R. (2020). Hydrophilic titanium surfaces reduce neutrophil inflammatory response and NETosis. *Biomaterials science*, 8(8), 2289-2299.
229. Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z., & Bowlin, G. L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative biomaterials*, 4(1), 55-68.
230. Blum, C., Taskin, M. B., Shan, J., Schilling, T., Schlegelmilch, K., Teßmar, J., & Groll, J. (2021). Appreciating the First Line of the Human Innate Immune Defense: A Strategy to Model and Alleviate the Neutrophil Elastase-Mediated Attack toward Bioactivated Biomaterials. *Small*, 17(13), 2007551.
231. Jhunjhunwala, S. (2017). Neutrophils at the biological–material interface. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(4), 1128-1136.
232. Kaplan, S. S., Basford, R. E., Mora, E., Jeong, M. H., & Simmons, R. L. (1992). Biomaterial-induced alterations of neutrophil superoxide production. *Journal of biomedical materials research*, 26(8), 1039-1051.
233. McDonald, B., & Kubes, P. (2010). Chemokines: Sirens of neutrophil recruitment—But is it just one song?. *Immunity*, 33(2), 148-149.
234. Kienle, K., & Lämmermann, T. (2016). Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response. *Immunological reviews*, 273(1), 76-93.
235. Lämmermann, T., Afonso, P. V., Angermann, B. R., Wang, J. M., Kastenmüller, W., Parent, C. A., & Germain, R. N. (2013). Neutrophil swarms require LTB₄ and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, 498(7454), 371-375.
236. Isles, H. M., Loynes, C. A., Alasmari, S., Kon, F. C., Henry, K. M., Kadochnikova, A., Hales, J., Muir, C. F., Keightley, M. C., Kadiramanathan, V., Hamilton, N., Lieschke, G. J. & Elks, P. M. (2021). Pioneer neutrophils release chromatin within in vivo swarms. *Elife*, 10, e68755.
237. Ng, L. G., Qin, J. S., Roediger, B., Wang, Y., Jain, R., Cavanagh, L. L., Smith, A.L., Jones, C. A., Veer, M. D., Grimbaldeston, M. A., Meeusen, E. N. & Weninger, W. (2011). Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), 2058-2068.

238. Flach, R. J. R., & Czech, M. P. (2015). NETs and traps delay wound healing in diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(9), 451-452.
239. Huang, H., Tohme, S., Al-Khafaji, A. B., Tai, S., Loughran, P., Chen, L., Wang, S., Kim, J., Billiar, T., Wang, Y., & Tsung, A. (2015). Damage-associated molecular pattern–activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology*, 62(2), 600-614.
240. Abrams, S. T., Zhang, N., Manson, J., Liu, T., Dart, C., Baluwa, F., Wang, S. S., Brohi, K., Kipar, A., Yu, W., Wang, G. & Toh, C. H. (2013). Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(2), 160-169.
241. Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., ... & Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine*, 15(11), 1318-1321.
242. Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., Rubin, C.J., Zhao, W., Olsen, S. H., Klinker, M., Shealy, D., Denny, M. F., Plumas, J., Chaperot, L., Kretzler, M., Bruce, A. T. & Kaplan, M. J. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 187(1), 538-552.
243. Ozturk, M., Chia, J. E., Hazra, R., Saqib, M., Maine, R. A., Guler, R., Suzuli, H., Mishra, B. B., Brombacher, F. & Parihar, S. P. (2021). Evaluation of Berberine as an Adjunct to TB Treatment. *Frontiers in Immunology*, 12, 656419.
244. Serra, A., Könnecke, I., Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Radbruch, A., & Duda, G. (2012). Lymphocytes control bone fracture healing by programming the mineralisation capacity of migratory osteogenic precursors. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(Suppl 1), A63-A63.
245. Xu, L., Liu, Y., & He, X. (2005). Inhibitory effects of berberine on the activation and cell cycle progression of human peripheral lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 2(4), 295-300.
246. Lu, Z., Lu, F., Wu, L., He, B., Chen, Z., & Yan, M. (2021). Berberine attenuates non-alcoholic steatohepatitis by regulating chemerin/CMKLR1 signalling pathway and Treg/Th17 ratio. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394, 383-390.
247. Pierpaoli, E., Piacenza, F., Fiorillo, G., Lombardi, P., Orlando, F., Salvatore, C., Geroni, C. & Provinciali, M. (2021). Antimetastatic and antitumor activities of orally administered

NAX014 compound in a murine model of HER2-positive breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2653.

248. Kim, K. W., Kim, H. R., Kim, B. M., Cho, M. L., & Lee, S. H. (2015). Th17 cytokines regulate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology*, 185(11), 3011-3024.

249. Xing, R., Zhang, Y., Li, C., Sun, L., Yang, L., Zhao, J., & Liu, X. (2016). Interleukin-21 promotes osteoclastogenesis in RAW264. 7 cells through the PI3K/AKT signaling pathway independently of RANKL. *International journal of molecular medicine*, 38(4), 1125-1134.

250. Kwok, S. K., Cho, M. L., Park, M. K., Oh, H. J., Park, J. S., Her, Y. M., Lee, S. Y., Youn J., Ju, J. H., Park, K. S., Kim, S. I., Kim, H. Y. & Park, S. H. (2012). Interleukin-21 promotes osteoclastogenesis in humans with rheumatoid arthritis and in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 64(3), 740-751.

251. Zhao, H., Xu, H., Qiao, S., Lu, C., Wang, G., Liu, M., Guo, B., Tan, Y., Ju, D. & Xiao, C. (2017). Boldine isolated from *Litsea cubeba* inhibits bone resorption by suppressing the osteoclast differentiation in collagen-induced arthritis. *International immunopharmacology*, 51, 114-123.

252. Adil, M., Mansoori, M. N., Singh, D., Kandhare, A. D., & Sharma, M. (2017). Pioglitazone-induced bone loss in diabetic rats and its amelioration by berberine: A portrait of molecular crosstalk. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 1010-1019.

8. EKLER

8.1. EK-1. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

T.C. ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı				
Toplantı Tarihi	Oturum Sayısı	Karar No	Protokol No	Proje Yürütücüsü
30.09.2021	7	9	2021/038	Doç. Dr. Bilal EGE
“Berberin Kullanımının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin DeneySEL Olarak İncelenmesi” başlıklı araştırma projenizde 35 Adet Wistar Albino Rat kullanılacağı ve hayvanlar üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı tarafınızdan beyan edilmiştir. Bu çerçevede aşağıda ismi bulunan araştırmacılara ait bu çalışmanın “Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi” yönünden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. 1. Doç. Dr. Mahmut KOPARAL 2. Dr. Öğr. Üyesi Onur CEYLAN 3. Arş. Gör. Muhammed Yusuf KURT 4. Öğr. Gör. Miray EGE				
Prof. Dr. Mehmet Reşat ÖZERCAN Başkan				
Dr. Öğr. Üyesi Zümrüt DOĞAN Başkan Yardımcısı		Dr. Öğr. Üyesi Gülrü ESEN Üye		
Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt DOĞUKAN Üye		Doç. Dr. Ali PARLAR Üye		
Öğr. Gör. Elif Merve Betül YANILMAZ Sorumlu Veteriner Hekim		Fatma ERGİN Üye		
Doç. Dr. Metin ÇALIŞIR Üye		Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ÖZKAYA Üye		
Dr. Öğr. Üyesi Hasan AYDIN Üye		Orhan ÖZTÜRK Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi		
Dr. Öğr. Üyesi Sebile AZIRAK Üye		Bilal ZEMİN Sivil Üye		Katılmadı

8.2. EK-2. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Muhammed Yusuf KURT
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Doğum tarihi ve yeri	
e-posta adresi	

Eğitim Bilgileri

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Uzmanlık Tezi	Adıyaman Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2023
Yüksek Lisans		
Lisans	Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2017
Lise	Mecidiye Anadolu Lisesi	2012

İş Deneyimi

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2019-2023	Adıyaman Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	Araştırma Görevlisi
2018	Erzurum E Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumu	Diş Hekimi

Yabancı Dil	İngilizce
-------------	-----------

Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

Sıra No	Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetler
1	Bozgeyik, E., Ege, B., Erdogmus, Z., Bozgeyik, I., Koparal, M., Bayazit, S., & Kurt, M. Y. (2023). Inflammation-associated long non-coding RNA signature in radicular cyst tissues. Pathology-Research and Practice, 245, 154456.
2	Koparal, M., Ege, B., Dogan, E. I., Kurt, M. Y., & Bayazit, S. (2023). Evaluation of biochemical variables in patients with recurrent aphthous stomatitis. Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery, 124(1), 101294.
3	Ege, B., Kurt, M. Y., Koparal, M., Geyik, A., & Kaplanoglu, K. (2023). Comparison of Diagnostic Accuracy of Panoramic Radiography to CBCT in Maxillary Sinus Diseases. Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, 1-12.
4	Koparal, M., Bozgeyik, E., Ceylan, O., Ege, B., Kurt, M. Y., Yumrutas, O., & Bozgeyik, I. (2022). Salivary gland tumors exhibit distinct miRNA signatures involved in Wnt/ β -Catenin signaling in formalin fixed paraffin embedded tissue samples. Pathology-Research and Practice, 238, 154119.
5	Koparal, M., Ege, B., Sirik, M., Kurt, M. Y., & Kurt, E. (2022). Evaluation of the associations between maxillary sinus dimensions and adenoid hypertrophy using multislice computed tomography. Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial

	Surgery, 123(4), 459-464.
6	Bozgeyik, I., Koparal, M., Ege, B., Bozgeyik, E., Kurt, M. Y., & Ceylan, O. (2022). Deciphering miRNAs associated with cellular stress response and apoptosis mechanisms regulated by p53 activity in patients with lower lip cancer. Pathology-Research and Practice, 236, 153952.
7	Ege, B., Koparal, M., Kurt, M. Y., & Bozgeyik, E. (2022). Investigation of the expression level of long non-coding RNAs in dental follicles of impacted mandibular third molars. Clinical Oral Investigations, 1-9.
8	Ege, B., Erdogmus, Z., Bozgeyik, E., Koparal, M., Kurt, M. Y., & Gulsun, B. (2021). Asporin levels in patients with temporomandibular joint disorders. Journal of Oral Rehabilitation, 48(10), 1109-1117.
9	Miray, E. G. E., KURT, M. Y., Bilal, E. G. E., KOPARAL, M., & YILDIZ, S. (2021). Evaluation of the use and awareness of herbal products of the patients applying to the faculty of dentistry. Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 7(2), 146-157.
10	EGE, M., KURT, M. Y., EGE, B., & KOPARAL, M. (2021). Investigation of the Knowledge Level and Usage Habits About Herbal Products and Phytotherapy of Undergraduate Students of the Faculty of Dentistry. Journal of Traditional Medical Complementary Therapies, 4(1).
11	Kurt, M. Y., Bilal, E. G. E., & ÖRMECİ, A. (2020). Yetersiz Biyopsi Sonrası Yanlış Yorumlanan Ameloblastik Fibro-Odontoma Vakası: Olgu Sunumu. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 11(2), 282-286.
12	EGE, B., KURT, M. Y., EGE, M., & GEYİK, A. (2020). Diş Hekimliği Fakültesi Öğrencilerinin Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları ile İlgili Tutumlarının Değerlendirilmesi. Journal of Traditional Medical Complementary Therapies, 3(2).
13	Bilal, E. G. E., Geyik, A., KURT, M. Y., & Koparal, M. (2020). Preoperative hemogram and biochemistry values of patients undergoing oral and dental surgical operations under local anesthesia. Cukurova Medical Journal, 45(2), 439-447.

Ödülleri

Yıl	Derece	Ödül Adı	Yeri

Mesleki Birlik/Dernek/Kuruluş Üyelikleri:

Yıl	Birlik/Dernek/Kuruluş Adı	Yeri