

DENİZ BAŞARAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2020



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

DOKTORA TEZİ

**FORMONONETİN MOLEKÜLÜNÜN OSTEOLAST
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO*
İNCELENMESİ**

DENİZ BAŞARAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. BİLGİN ÖNER**

AĞIZ, DİŞ, ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

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

İSTANBUL-2020



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

DOKTORA TEZİ

**FORMONONETİN MOLEKÜLÜNÜN OSTEOLAST
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO*
İNCELENMESİ**

DENİZ BAŞARAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. BİLGİN ÖNER**

AĞIZ, DİŞ, ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

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

İSTANBUL-2020

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

DOKTORA TEZİ

**FORMONONETİN MOLEKÜLÜNÜN OSTEOLAST
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO*
İNCELENMESİ**

DENİZ BAŞARAN

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. BAŞAK VAROL**

AĞIZ, DİŞ, ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

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

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Programında Doktora öğrencisi Deniz BAŞARAN tarafından Prof. Dr. Bilgin ÖNER'in danışmanlığında hazırlanan "**Formononetin molekülünün osteoblast hücreleri üzerine etkisinin *in vitro* incelenmesi**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 13/10/2020 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mustafa Sami YILDIRIM
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

**Jüri-Danışman**

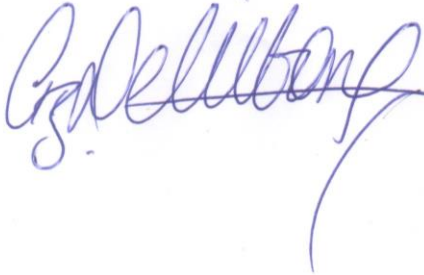
Prof. Dr. Bilgin ÖNER
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

**Jüri**

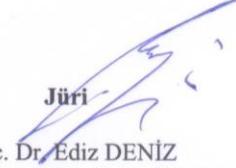
Prof. Dr. Muhammet BEKTAŞ
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Barış Çağrı DELİLBAŞI
Medipol Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Ediz DENİZ
Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

DENİZ BAŞARAN

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübesi ile bana her konuda yol gösteren, desteğini, iyi niyetini ve sevgisini hiç esirgemeyen çok değerli hocam, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Bilgin Öner'e,

Doktora eğitimim süresince benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Sami Yıldırım'a,

Doktora tez sürecimde bilgi ve desteklerini esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hülya Koçak Berberoğlu olmak üzere tüm Ağız, Diş, Çene Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Doktora eğitimimi Ağız, Diş, Çene Cerrahisi programında almamda tavsiye ve tecrübeleri ile bana yol gösteren Prof. Dr. Barış Çağrı Delilbaşı'na

Doktora tezime bilgi ve tecrübesi ile yön veren, karşılaştığım zorlukları çözmemde desteğini esirgemeyen ikinci tez danışmanım Doç. Dr. Başak Varol'a,

Tezimin laboratuvar aşamalarında büyük bir sabır ve titizlikle bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Ebru Haciosmanoğlu'na,

Doktora sürecim boyunca yardımlarını esirgemeyen başta Dr. Eda Kaya Akca ve Dt. Gülce Ecem Doğancı olmak üzere diğer tüm doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Sadece doktora sürecimde değil, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim sevgili eşim Dr. Elif Türkeş Başaran'a,

Hayatım boyunca olduğu gibi doktora sürecimde de desteklerini ve sevgilerini bir an olsun esirgemeyen annem, babam ve kardeşime,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31492

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	V
BEYAN.....	VI
İTHAF.....	VII
TEŞEKKÜR.....	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
TABLolar LİSTESİ.....	XII
ŞEKİLLER LİSTESİ	XIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XIV
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KEMİK DOKUSU	3
2.1.1. Kemik matriksi.....	3
2.1.1.1. İnorganik matriks	3
2.1.1.2. Organik matriks.....	4
2.1.2. Kemik dokusu hücreleri	4
2.1.2.1. Osteoblastlar.....	4
2.1.2.2. Osteoklastlar.....	5
2.1.2.3. Osteositler	5
2.1.2.4. Osteoprogenitör hücreler.....	6
2.1.2.5. Kemikteki diğer hücre tipleri	6
2.1.3. Mikroskopik olarak kemik tipleri	7
2.1.3.1. Primer kemik.....	7
2.1.3.2. Sekonder kemik.....	7
2.1.3.3. Komposit (bundle) kemik	8
2.1.4. Makroskopik olarak kemik tipleri.....	8
2.1.4.1. Kompakt kemik.....	8
2.1.4.2. Spongiöz kemik.....	9
2.1.5. Kemik zarları.....	9
2.1.5.1. Periosteum.....	9

2.1.5.2. Endosteum.....	10
2.1.6. Kemiğin kalsifikasyonu	10
2.1.7. Kemik büyümesi ve şekillenmesi	11
2.1.8. Kemik defekti iyileşmesi	12
2.1.9. Kemik formasyon göstergeleri.....	14
2.1.9.1. Alkalen fosfataz	14
2.1.9.2. Osteokalsin.....	15
2.1.9.3. Tip 1 prokollajen karboksiterminal propeptid (PCIP) ve tip 1 prokollajen aminoterminal propeptid (PNIP)	16
2.1.9.4. Kemik sialoproteini.....	16
2.1.9.5. Osteopontin	16
2.1.10. Kemiğin hücresel işlevlerini düzenleyen mekanizmalar	16
2.1.10.1. Yerel düzenleyici faktörler.....	17
2.1.10.2. Sistemik faktörler	18
2.2. FİTOÖSTROJENLER	21
2.2.1. Fitoöstrojenlerin biyolojik potansiyelleri ve etkileri.....	22
2.2.2. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması.....	23
2.2.3. Fitoöstrojenlerin doku ve sistemler üzerine etkileri.....	25
2.3. KEMİK GREFTLERİ.....	29
2.3.1. Kemik greftlerinin işlevleri.....	29
2.3.1.1. Osteogenezis	29
2.3.1.2. Osteoindüksiyon.....	29
2.3.1.3. Osteokondüksiyon.....	30
2.3.2. Kemik greftlerinin sınıflandırılması.....	30
2.3.2.1. Otojen greftler	30
2.3.2.2. Allogreftler	33
2.3.2.3. Ksenogreftler.....	35
2.3.2.4. Alloplastlar	36
2.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ	39
2.4.1. Hücre kültürünün tarihçesi.....	39
2.4.2. Kültür tipleri.....	40
2.4.3. Hücre kültürünün avantajları	41
2.4.4. Hücre kültürünün dezavantajları	42

2.4.5. Hücre kültürü aşamaları	42
2.4.5.1. Hücre ekimi	42
2.4.5.2. Pasajlama.....	43
2.4.6. Hücre kültürü laboratuvarı	43
2.4.7. MTT test yöntemi.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1.1. Deney grupları.....	46
3.1.2. Hücre kültürü medyumunun hazırlanması	48
3.1.3. Hücre kültürü	49
3.1.4. Hücrelerin pasajlanması	49
3.1.5. Deney düzeneğinin hazırlanması	50
3.1.6. MTT test kitinin uygulanması.....	51
3.1.7. Alkalen fosfataz (ALP) test kitinin uygulanması.....	52
3.1.8. Osteokalsin ve VEGF miktarının tayini	53
3.1.8.1. Hücre lizatlarının hazırlanması	53
3.1.8.2. Lizatlardaki protein miktar tayini.....	54
3.1.8.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western-Blot analizi	54
3.1.9. Verilerin istatistiksel analizi.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. MTT BULGULARI	56
4.2. ALP BULGULARI	64
4.3. PROTEİN ANALİZLERİ	72
5. TARTIŞMA	75
KAYNAKLAR	89
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	111
ÖZGEÇMİŞ	112

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: MTT ve ALP testleri için kullanılan 96 kuyucuklu deney düzeneği	50
Tablo 2: MTT kiti malzeme listesi ve saklama koşulları.....	51
Tablo 3: ALP kiti malzeme listesi ve saklama koşulları	53
Tablo 4: Protein miktar analizi için hazırlanan reaksiyon ortamı.....	54
Tablo 5: Yükleme ve ayırma jelinin içeriği.	54
Tablo 6: Gün gruplarında ayrı ayrı gruplara göre MTT parametrelerinin değerlendirilmesi	56
Tablo 7: MTT 1. gün bulguları	57
Tablo 8: MTT 1. gün deney sonuçlarının grafik üzerinde gösterimi.....	57
Tablo 9: MTT 6. gün bulguları	58
Tablo 10: MTT 6. gün deney sonuçlarının grafik üzerinde gösterimi.....	59
Tablo 11: MTT 9. gün bulguları	60
Tablo 12: MTT 9. gün deney sonuçlarının grafik üzerinde gösterimi.....	61
Tablo 13: Grupların kendi içlerinde gün gruplarına göre MTT parametrelerinin değerlendirilmesi	62
Tablo 14: Gün gruplarına göre MTT değerleri	63
Tablo 15: Gün gruplarında ayrı ayrı gruplara göre ALP parametrelerinin değerlendirilmesi	64
Tablo 16: ALP 1. gün bulguları	65
Tablo 17: 1. gün ALP düzeylerinin grafik üzerinde gösterimi	65
Tablo 18: ALP 6. gün bulguları	66
Tablo 19: 6. gün ALP seviyelerinin grafik üzerinde gösterimi	67
Tablo 20: ALP 9. gün bulguları	68
Tablo 21: 9. gün ALP değerlerinin grafikte gösterimi.....	69
Tablo 22: Grupların kendi içlerinde gün gruplarına göre ALP parametrelerinin değerlendirilmesi	70
Tablo 23: Gün gruplarına göre ALP değerleri.....	72
Tablo 24: VEGF bulguları	73
Tablo 25: 9. gün VEGF rölatif yoğunluk grafiği.....	73
Tablo 26: Osteokalsin bulguları.....	74
Tablo 27: 9. gün osteokalsin rölatif yoğunluk grafiği	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Laminer akım kabini.....	44
Şekil 2: Deneyde kullanılan greft materyali	45
Şekil 3: Formononetin	45
Şekil 4: Deneyde kullanılan DMEM/F12 medyum	48
Şekil 5: Osteoblast hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	50
Şekil 6: MTT testi için hazırlanan 96 kuyucuklu hücre plağı.....	51
Şekil 7: Beta-aktin Western-Blot görüntüsü	72
Şekil 8: VEGF Western-Blot görüntüsü	73
Şekil 9: Osteokalsin Western-Blot görüntüsü.....	74

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALP:	Alkalen fosfataz
ATCC:	American Type Culture Collection
BMP:	Kemik morfojenik protein
Ca:	Kalsiyum
Ca ₃ (PO ₄) ₂ :	Kalsiyum Fosfat
CO ₂ :	Karbondioksit
CJD:	Creutzfeld-Jacob Disease
DDKA:	Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
DKKA:	Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
dH ₂ O:	Distile su
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asitik
ER- α :	Östrojen reseptör alfa
ER- β :	Östrojen reseptör beta
HA:	Hidroksiapatit
HIV:	Human Immundeficiency Virus
IGF:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL:	İnterlökin
mRNA:	messenger Ribo Nükleik Asit
MTT:	Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum
NBT/BCIP:	Nitro blue tetrazolium/ Bromo kloro indol fosfat
O ₂ :	Oksijen
PCIP:	Prokollagen Karboksiterminal Propeptid
PGE:	Prostaglandin E
PNIP:	Prokollajen Aminoterminal Propeptid
PO ₄ :	Fosfat
SDS-PAGE:	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
TBST:	Tris tuz çözeltisi
TEMED:	Tetrametilendiamin

TCP:	Tricalcium Phosphate
VEGF:	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
gr:	Gram
nM:	Mikromolar
µl:	Mikrolitre
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
mm:	Milimetre
ng:	Nanogram
nm:	Nanometre
rpm:	Revelations per minute
cm ² :	Santimetrekare

ÖZET

Başaran, D. (2020). Formononetin Molekülünün Osteoblast Hücreleri Üzerine Etkisinin *In Vitro* İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2020.

Çene cerrahisi pratiğinde çeşitli nedenlerle meydana gelen kemik dokusu kayıpları uygun greft materyalleri ile tedavi edilmektedir. Literatürde greft materyallerinin osteojenik özelliklerini ve ogmentasyonların başarısını arttırabilecek materyal ve tekniklerle ilgili araştırmaları konu alan birçok çalışma bulunmaktadır. Fitoöstrojenlerin sistemik yolla alınmasının kemik dokusunda östrojenik etki yaratarak kemiğin fiziksel ve kimyasal yapısını koruyucu etki gösterdikleri bilinmektedir. Biz de bu çalışmada fitoöstrojenler olarak bilinen bileşiklerin izoflavonlar grubuna ait olan formononetin molekülünün tek başına ya da kemik grefti varlığında osteoblast hücreleri üzerine etkisi olup olmadığını *in vitro* olarak incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda insan fetal osteoblast hücreleri (hFOB1.19) greftli ya da greftsiz olarak, 1 µg/ml, 10µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda formononetin molekülü ile birlikte inkübe edilmiştir. Molekülün osteoblastlar üzerine etkisi 1., 6. ve 9. günde yapılan MTT ve ALP testleri ve 9. günde yapılan VEGF ve osteokalsin protein analizleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızda 1 günlük inkübasyon sonucunda gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Osteoblast hücrelerinin sadece greft materyali ile birlikte 6 günlük inkübasyonu sonucunda hücre proliferasyonunun azaldığı, greft materyali ile birlikte formononetin varlığında ise bu durumun tersine döndüğü ve proliferasyonun doza bağlı olarak arttığı görülmüştür. Ortamda greft materyali ya da formononetin bulunduğu ALP aktivitesinin arttığı, ikisinin birlikte bulunduğu durumlarda da ALP aktivitesinde sinerjik etki yarattıkları gözlenmiştir. 9 günlük inkübasyon sürecinin ardından Western-Blot yöntemi ile yapılan protein analizleri sonucunda en yüksek VEGF yoğunluğu greft materyali ile 100 µg/ml formononetinin birlikte bulunduğu grupta görülmüştür. Formononetinin osteoblastlardaki ALP aktivitesini ve VEGF sentezini arttırdığını gösteren bu bulgular molekülün ogmentasyon bölgesinde yeni kemik oluşumunu ve damarlanmayı artırma potansiyeli olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Formononetin, Osteoblast, Fitoöstrojen, Kemik iyileşmesi, ALP

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31492

ABSTRACT

Basaran, D. (2020). *In vitro* Investigation of the Effect of Formononetin on Osteoblast Cells. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Oral Surgery. PhD thesis. Istanbul. 2020.

It is known that systemic intake of phytoestrogens creates an estrogenic effect on bone tissue and protects the physical and chemical structure of the bone. In this study, we aimed to investigate *in vitro* whether the formononetin, has an effect on osteoblast cells alone or in the presence of graft material.

Human fetal osteoblast cells (hFOB1.19) with or without bone graft materials were incubated with formononetin at concentrations of 1 µg/ml, 10 µg/ml and 100 µg/ml. The effect of the molecule on osteoblasts was evaluated by MTT and ALP tests performed on the 1st, 6th and 9th days and VEGF and osteocalcin protein analyzes performed on the 9th day. As a result of the 6-day incubation of osteoblast cells with only the graft material, it was observed that cell proliferation decreased, and in the presence of formononetin with the graft material, this situation was reversed and proliferation increased depending on the dose. It was observed that ALP activity increased when there was graft material or formononetin in the environment, and when the two were present together, they created a synergistic effect on ALP activity. After the 9-day incubation period, as a result of the Western-Blot method, the highest VEGF density was observed in the group with the graft material and 100 µg/ml formononetin. These findings, which show that formononetin increases ALP activity and VEGF synthesis in osteoblasts, indicate that the molecule may have the potential to increase new bone formation and vascularization at the augmentation site.

Key Words: Formononetin, Osteoblast, Phytoestrogen, Bone healing, ALP

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 31492

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çene yüz bölgesinde meydana gelen travma, enfeksiyon, kist, çene kırıkları, konjenital anomali, artrofi vb sebeplerden dolayı oluşan kemik defektlerinin tedavileri, bu alanda çalışan maksillofasiyal cerrahların, plastik ve rekonstrüktif cerrahların ve ortopedistlerin ana problemleri arasında yer almaktadır. Bu defektlerin tedavisinde defektin çeşidine göre otojen greft, ksenojen greft, allogreft ve alloplast greftler kullanılmaktadır. Kişinin kendi kemiğinden elde edilen otojen greftler yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaz ve altın standart olarak kabul edilir. Ancak otojen kemik elde edilebilmesi için ikinci bir operasyona ihtiyaç duyulması, bu bölgede ilave bir kanama ya da enfeksiyon riskinin oluşması ve geniş defektlerin tedavisinde kısıtlı miktarda kemik dokusu alınabilmesi gibi dezavantajların varlığı araştırmacıları alternatif materyaller bulmaya yöneltmiştir. Ksenojen, allogreft ve alloplast greft materyalleri maksillofasiyal cerrahide alveolar rekonstrüksiyonda, diş çekimini takiben çekim soketinin doldurulmasında, periodontal cerrahide ve immediat implantasyonlarda implant çevresinin kapatılmasında başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.

Tıp alanında yeni materyallerin araştırılmasında dokuların çalışılan materyalden nasıl etkileneceğinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Tıbbi deneylerin canlılar üzerinde yapılması etik açıdan birçok sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle canlı dokuların küçük kopyalarının oluşturulması ve canlı dokularda çalışılan materyallerin ne tür bir etki yaratacağının araştırılması için hücre kültürü teknikleri geliştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları yapılması son derece titizlik gerektiren hassas çalışmalardır.

Vücudun yaşayan temel birimi hücredir. Her organ, birçok farklı hücrenin hücreler arası destek dokusuyla bir arada toplanmasından oluşmuştur. Hücre birçok kimyasal reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için gerekli değişik enzimlere ve en önemlisi yalnız başına kendisinin aynısını üretebilme yeteneğine sahiptir. Vücutta kemik yapımından sorumlu olan osteoblast hücrelerinin hücre kültürü çalışmaları için ticari olarak satışa sunulan formları bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalarda kullanılmak üzere insan osteoblast hücreleri genellikle bu yolla temin edilmektedir. Kemik metabolizmasında vücutta salgılanan birçok hormon görev almaktadır. Özellikle kadınlarda postmenopozal dönemde östrojen hormonunun etkinliğini kaybetmesine paralel olarak görülen osteoporoz tablosu olası kemik defektlerinin iyileşmesini olumsuz

yönde etkileyebilmektedir. Osteoporoz tedavisinde kimyasal yapıları östrojen ile benzerlik gösteren bitkisel östrojenler bir tedavi seçeneği olarak sunulmaktadır. Kemik metabolizması üzerine anabolik etkisinin varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilen fitoöstrojenler olarak da adlandırılan bitkisel östrojenler son yıllarda birçok çalışmaya konu olmuştur.

Günümüze dek yapılan çalışmalar incelendiğinde fitoöstrojenler arasında yer alan formononetin molekülünün deneysel amaçla oluşturulmuş kemik defektlerinin ve yumuşak doku yaralarının iyileşmeleri üzerine sistemik etkilerinin araştırıldığı çalışmaların olmasına karşın maksillofasiyal cerrahide kullanılan greftlerle birlikte kullanıldığındaki etkisini gösteren bir çalışma belirlenememiştir.

Bu çalışmada, sistemik kullanımı ile ileri derecede osteoporozu olan hastaların kemik kalitelerini arttırarak patolojik ya da iyatrojenik kırıkları engellemek veya greft materyali ile birlikte lokal kullanımı ile iyileşme süresini kısaltarak greftin rezorpsiyonunu önlemek gibi amaçlarla kullanılabileceği düşüncesiyle formononetinin osteoblastlar üzerine etkisini *in vitro* olarak incelemeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKUSU

Kemik; yüksek düzeyde innervasyon ve damarlanma içeren, mineralize bir bağ dokusudur (1). Organizmaya stabil bir form sağlamak, organizmadaki diğer dokuları desteklemek, bu dokulara hareket yeteneği sağlamak ve bu dokuları korumak kemiğin temel fonksiyonlarındandır (2). Bunların yanında mineral metabolizmasına, fosfat ve kalsiyum gibi minerallere depo görevi yaparak önemli katkı sağlar (3). Kemik hücreleri ve kemik matriksi olarak adlandırılan hücreler arası madde kemik dokusunu oluşturur (4). Ayrıca kemik iliği içermesiyle vücutta hematopoezde görev alır (5,6).

2.1.1. Kemik matriksi

Kemik hücrelerinin arasında kalan, organik ve inorganik elemanların oluşturduğu hücreler arası maddeye kemik matriksi denir. Organik ve inorganik komponentlerin birbiri ile uyumlu olması kemik dokunun işlevini ve fonksiyonlarını düzgün bir şekilde yerine getirebilmesini sağlar. Hacim olarak büyük çoğunluğunu kollajen oluştururken toplam kemik doku ağırlığının yaklaşık %20'si sudan oluşur. Kuru kemik ağırlığı %60-70 inorganik fosfat tuzlarından, %30-35 kollajen fibrillerden ve organik proteinlerden oluşur (7-9).

2.1.1.1. İnorganik matriks

İnorganik maddeler kemik doku matriksinin kuru ağırlığının %60'ını oluşturur. Kemik inorganik matriksinin içeriğinde özellikle kalsiyum ve fosfat (Ca , PO_4) oranı yüksektir. Ayrıca sitrat, bikarbonat, magnezyum ve sodyum gibi mineral ve bileşikler de inorganik elemanların önemli bir bölümünü oluşturur. Yapılan çalışmalarda; kalsiyum ve fosforun, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ formunda bileşik oluşturup hidroksiapatit kristallerini ortaya çıkardığı gözlemlenmiştir (7-9).

Hidroksiapatit kristallerinin yüzeyi hidrasyon tabakası da denilen su ve iyonlardan oluşan bir tabaka ile örtülüdür. Bu örtü; hidroksiapatit kristalleri ve vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştırırken aynı zamanda kollajen lif segmentlerine sıkıca bağlanarak tutunur ve kemikte yırtılmayı, yani kollajenin yerinden ayrılmasını önler. Bu sayede kemik yapısı gerilme ve sıkışmaya karşı direnç kazanmış olur (6,10-12).

2.1.1.2. Organik matriks

Organik matriks kemiğin kuru ağırlığının %30-40'ını oluşturan yapıdır. Kemiğin organik matriksinin %90'ını kollajen, %10'unu non-kollajen bileşenler olan proteinler, peptitler, lipitler, karbonhidratlar ve osteoid olarak da adlandırılan osteoblast hücrelerinden salgılanan mineralizasyon görülmeyen organik yapı oluşturur. Non-kollajen bileşenler glikoproteinlerden oluşur. Glikoproteinler; osteopontin, osteokalsin, osteonektin, vitronektin, fibrilin, fibronektin ve kemik sialoproteinleridir. Her ikisi de osteoblastlar tarafından salgılanırken; osteokalsin, kemik mineralizasyonu ve kalsiyum iyon hemostazında; osteonektin ise kemik mineralizasyonu, hücre-matriks etkileşimi ve kollajen bağlanması durumlarında görev alır. Osteopontin ise osteosit, osteoblast ve osteoklast hücrelerinde sentezlenip kemiğin yeniden şekillenmesine yardımcı olur (11,13-15).

İnorganik madde ve organik maddenin uyumlu biçimde olması kemik dokunun direncini ve sertliğini sağlar. Kemik dokudan organik matriksin çıkarılması dokunun kırılma direncini azaltır ve kolayca toz haline gelebilmesine sebep olur ancak kemik doku şeklini korumaya devam eder (6,8,9).

2.1.2. Kemik dokusu hücreleri

2.1.2.1. Osteoblastlar

Mineralize olmayan kemik matriksinin yani osteoid maddenin sentezi ve kalsifikasyonunda görevli olan kemik yapıcı hücrelere osteoblast denir (16,17).

Embriyonel dönemde ilk olarak periosteum iç yüzeyindeki ve kambiyum katmanındaki mezenkim hücrelerinden ve komşu osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar sonrasında ise bağ dokusunu meydana getiren fibroblastlardan farklılaşır (18).

Yüksek metabolik aktiviteye sahip olan osteoblastlar, osteoid maddenin sentezlenmesinin yanı sıra kollajen, non-kollajen proteinler, büyüme faktörleri, sitokinler, alkalin fosfataz ve prostaglandinlerin salgılanmasında görevlidir (19). Osteoblastik aktivite, yaşayan kemiklerde daima hafif bir biçimde devam eder, bu sayede kemik yapımının sürekliliği sağlanır (11). Osteoblastlar, osteoklastlarla bir araya gelerek kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde de etkili bir görev alır (20). Osteoblastların bir

bölümü osteoid madde içinde gömülü kalarak osteositlere dönüşürken bir bölümü ise 1 ila 10 haftalık aktif yaşam ömürlerinin sonunda kemik yüzeyini döşeyen hücelere dönüşmektedir (21).

2.1.2.2. Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik dokunun yıkımı görevini üstlenen, kalsifiye kartilajı ve kemiği rezorbe eden hücelerdir. Geniş ve çok çekirdekli olan osteoklast hüceleri, tek çekirdekli öncü hücelerin füzyonu ile biçimlenir. Osteoklastların öncü mezenkimal hücelerden çok hematopoetik kök hücelerden türeyerek oluştuğu düşünülmektedir. Osteoklastların hücre şeklinin kaynağı monosit-makrofaj serisinden olsa da makrofajların yüzey belirteçleri osteoklast yüzeylerinde görülmez. Diferensiyasyonun erken dönemlerinde osteoklast ve monosit öncü hüceleri şekil olarak birbirinden farklılaşır (22).

Osteoklastların sitoplazmalarında mitokondri ve lizozom sayıları fazladır. Rezorpsiyon bölgesine komşu, girintili çıkıntılı ve yüzeyden kabarık bir sınırının olması osteoklastı diğer hücelerden ayıran en belirgin özelliklerinden biridir. Bu sınırın çevresinde temiz bir alan bulunur. Bu temiz alanın bir görevi osteoklast hücelisinin kemiğe tutunmasını sağlamaktır. Bir diğer görevi ise bölgedeki yüksek hidrojen iyonu konsantrasyonunu korumak için ekstraselüler sıvı ile girintili çıkıntılı hücre sınırının izolasyonunu sağlamaktır. Osteoklast hücresi, dışa dönük büyük bir fagolizozom görünümündedir. Bu hücelerin içerdikleri karbonik anhidraz enzimleri bol miktarda lizozomal enzim ve hidrojen iyonunun sekresyonuna yardımcı olur. Aynı zamanda osteoklast hüceleri asit fosfataz enziminden de oldukça zengindir. Hidrojen iyonları, mineralleri kemikten ayırmanın yanında ayrıca kemik matriks komponentlerinin azalmasını sağlayan lizozomal enzimlerin aktiveştirilmesinde de önemli bir rol oynar (23,24).

2.1.2.3. Osteositler

Osteoblastların bazıları kemik yapımı esnasında oluşan osteoid madde içinde hapsolür ve organellerinin büyük bir kısmını kaybederek osteositlere dönüşürler (25). Osteositler olgunlaşmış kemik içerisindeki ana hücre grubu olup kemik matriks devamlılığını sağlamakla görevlidir. Kemik lakünaları içerisinde bulunan sitoplazmik uzantıları yardımıyla osteositler; osteoblastlar, kemik yüzeyini kaplayan hüceler, diğer

osteositler ve damarlarla bağlantı kurarlar. Dolaşım sistemi ile bağlantıda olmaları gereken metabolitlerin ve iyonların transfer edilebilmesini sağlar (26). Kemiğin üzerine gelen mekanik kuvvetlere cevap olarak, gerektiği zaman diğer kemik hücre tiplerine dönüşebilmeleri ise hücreler arası etkileşimleri sayesinde (4,27). Metabolik açıdan osteoblastlara nazaran daha inaktif olan osteositlerin ömrü birkaç yıldan ibarettir ve yenilenemezler.

2.1.2.4. Osteoprogenitör hücreler

Kaynağı mezenkim hücrelerine dayanan osteoprogenitör hücreler, kemik dokusunun ana hücreleridir. Periosteum ve endosteumda bulunurlar. Büyüme sırasında daima aktif olan bu hücreler büyüme tamamlandığında kemiğin internal reorganizasyonunda, kırık iyileşmesinde ya da başka tip yaralanma durumlarında aktif hale gelerek osteoblast ve osteoklast gibi diğer kemik hücrelerine dönüşürler. Osteoprogenitör hücreler iki çeşittir. İlki az gelişmiş golgi cisimciği ve gelişmemiş endoplazmik retikulum bulunduran ve osteoblastlara öncülük eden preosteoblastlardır. İkincisi ise osteoklastları meydana getiren, belirgin mitokondri ve serbest ribozomları olan hücrelerdir (28–30).

2.1.2.5. Kemikteki diğer hücre tipleri

Kemik dokusu osteoblast, osteoklast, osteosit ve osteoprogenitör hücreler dışında diğer bazı hücre tiplerini de içerebilmektedir. Örnek olarak osteoklastların kemiği rezorbe etmesinin ardından ortamda makrofajlar bulunabilir. Makrofajların bu aşamadaki görevi tam olarak açıklanabilmiş değildir, ancak rezorpsiyon sonucu geriye kalan sindirilememiş rezidüel matriks makrofajlar tarafından kaldırılabilir. Bu sebeple lizozomal enzimler ile birlikte kollajenaz enzimi de salgılayabilirler. Makrofajlar kemik rezorpsiyonu için güçlü bir uyaran olmalarının yanı sıra preosteoblastların proliferasyonunu uyaran ve remodeling döngüsünün formasyon fazını başlatma potansiyeline sahip İnterlökin-1 ve PGE-2'nin de kaynağıdır. Ayrıca lenfositler de kemik rezorpsiyonunu uyaran faktörlerin salınımında rol alabilir.

Fibroblastik hücreler kemik dokusunda lokal düzenleyicilerin salgılanmasında görev alabilir. Somatomedin olarak ta bilinen insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) fibroblastlar tarafından sentezlenebilir ve kemik metabolizması üzerinde pozitif yönde güçlü bir etkiye sahiptir.

Mast hücreleri içerisindeki granüllerde kemiğin rezorpsiyon hızını arttıran heparini bol miktarda bulundurur, rezorpsiyon sürecinde olan kemiğe komşu alanda bulunabilirler.

Son olarak, endotelial hücreler de kemik metabolizmasına etki edebilirler. Bu hücreler büyüme faktörü sentezlerler. Aynı zamanda kemik rezorpsiyonunu uyaran ve kemik kan akımı üzerine etkisi olan prostasiklinin en önemli kaynağıdır (23).

2.1.3. Mikroskopik olarak kemik tipleri

2.1.3.1. Primer kemik

Genellikle geçici bir kemik yapısı olan primer kemik, (olgunlaşmamış kemik-woven kemik) fetal gelişim veya kemik iyileşmesi sırasında oluşmaktadır. Primer kemikte düzensiz kollajen demetler biçiminde dağınık ilerleyerek ağ benzeri yapılar meydana getiren kollajen iplikler bulunur. Osteoblast hücreleri ile döşeli düzensiz vasküler boşluklar ve kollajen fibriller bu kemik dokuyu meydana getirmektedir. Lamel içermezler ve sekonder kemiğe göre, mineral yapıları daha az ancak osteositleri daha fazladır (7,31). Bolca hücreden oluşmakla birlikte yeterince kalsifiye odaklar bulundurmamaktadır ve ana maddesi yeterince kalsifiye değildir. Primer kemik 3-4 yaşlarından sonra erişkinde kafatasındaki yassı kemik birleşim yerleri, dişi çevreleyen alveol kemikleri ve tendonların kemiğe tutunma bölgeleri benzeri birkaç bölge haricinde yerini sekonder kemiğe bırakır. Sonrasında kansellöz veya kortikal kemiğe dönüşür (7). Bu sürekli döngü remodeling olarak adlandırılır. Organize olmayan bir yapı olması primer kemiği mekanik açıdan güçsüz kılar (5,7,32).

2.1.3.2. Sekonder kemik

Sekonder kemik, havers kanalları etrafında paralel veya eş merkezli olarak konumlanmış 3-7 µm kalınlığındaki lamellerden meydana gelen, matriksi primer kemiğe oranla daha kalsifiye olan ve genel olarak yetişkinlerde bulunan bir kemik türüdür. Aynı zamanda lameller veya olgunlaşmış kemik de denir (7,32).

Havers sistemi, sinirleri, kan damarlarını ve gevşek bağ dokusunu içinde barındıran bir kanalın çevresini saran, dairesel lamellerin oluşturduğu bütünlüktür. Aynı zamanda osteon olarak da adlandırılır. Lamellerin arasında veya nadiren içinde kemik hücrelerini (osteositleri) barındıran lakunalar bulunur. Her havers sisteminin çevresini

saran mineralize amorf matriksten meydana gelen yapıştırıcı madde ve kollajen lifler vardır. Havers sistemi, dış dairesel lameller, iç dairesel lamelcikler ve ara lameller kortikal kemik lamellerini oluşturmaktadır. diyafizin uzun eksenine paralel olan havers sistemi ortasında merkez bir kanal bulundurur. Bu merkezi kanalın çevresini saran 4 ila 20 arası dairesel lamelcik bulunmaktadır. Havers kanalları Volkman kanalları ile birbirine bağlanmaktadır ancak Volkman kanalları Havers kanalları gibi dairesel lameller bulundurmazlar (7,33).

İyi organize olmuş kollajen yapısı ve mineralizasyonu sayesinde sekonder kemik, kuvvete karşı direnebilen oldukça güçlü bir kemik yapısıdır. Primer kemiğe oranla büyüme hızı 0.6-1 mm/gün ile çok daha yavaştır (5,34). Sekonder kemik, morfolojik olarak toplam iskeletin %20'si olan kortikal (kompakt, sıkı) ve %80'i olan kanselöz (spongiöz, süngerimsi) kemik olmak üzere iki şekilde bulunur (35).

2.1.3.3. Komposit (bundle) kemik

Primer kemiğin sekonder kemiğe gelişimi esnasında lameller kemiğin woven kemikle bir arada bulunduğu kemik yapı komposit (bundle) kemik olarak isimlendirilir. Özellikle eklemelerin ve eklem ligamanlarının çevresinde görülen bu kemik, çizgisel iç bağlantılara sahiptir (5).

2.1.4. Makroskopik olarak kemik tipleri

2.1.4.1. Kompakt kemik

Kemik yapısı incelendiğinde kemiği saran en dış kısma kompakt kemik denir. Lameller kemik biçiminde ince kollajen fibrillerden oluşan bu kısım aynı zamanda kemiğe mekanik destek sağlamaktadır. Kemik kütlelerinin tamamının %80'ini kortikal kemik oluşturur. Havers sistemi veya osteon olarak adlandırılan kemik yapısındaki silindirik birimler olgun sert kemiği oluşturur. Osteonlar, gevşek bağ dokusu içinde sinirleri ve damarları bulunduran bir merkez kanal çevresinde konsantrik olarak konumlanmış havers kanalı olarak da isimlendirilen kemik lamellerini içerir. Kompakt kemik mikroskopik olarak incelendiğinde dokuyu havers kanallarının çevresinde 3-7 µm kalınlığındaki lamellerin, hücrelerin ve sert bir matriksin meydana getirdiği görülmektedir. Kompakt kemikteki osteoblastlar (laküna), düzgün ve boşluksuz bir düzene sahip olmakla birlikte dallıdır, içerisine osteositler (kemik hücreleri) yerleşmiştir

ve aynı zamanda kanalikül olarak da isimlendirilirler. Bu kanaliküller her bir lamelde çok miktarda bulunur ve bulunduğu havers sisteminin en iç ile en dış lameli arasında temas kurarak doku içerisinde ağ oluştururlar, bu şekilde metabolizma olaylarında görev alırlar. Uzun kemiklerin diyafizleri kemik iliği kavitesini çevreleyen sert kemikten oluşur. Epifizlerde ise ortada yer alan süngerimsi kemik bölümünü ince bir sert kemik tabakası kuşatır. Periosteum denilen bağ dokusu katmanı, eklem yüzeyleri hariç olmak üzere sert kemiklerin dış yüzeyini kuşatmaktadır (16).

2.1.4.2. Spongiöz kemik

Spongiöz kemik sert kemiğe benzeyen ancak içinde kemik iliğini bulunduran birbiriyle bağlantılı bir labirent sistemiyle bölünmüş kemik trabeküllerinden oluşur. Ayrıca gelişim sürecinde ilk oluşan kemiktir. Dolayısıyla histoloji çalışmalarında enine kesitte sirküler lamel dizilimine rastlanmaz. Bununla birlikte trabeküllerden meydana gelen bal peteğine benzeyen bir dokuya sahiptir. Bu boşlukların içinde kemik iliği bulunur. Basıncın veya kuvvetin geldiği yön doğrultusunda düzenlenmiş olan uzun kemiklerin epifizindeki spongiöz doku, kemik yapısını çok daha sağlam bir hale getirmektedir. Kemiğin metabolik faaliyetlerinde görev alan kısmıdır. Süngerimsi kemikte düzgün dizilmiş fibriller yoktur, matriksi gevşek bir yapıya sahiptir ve üzerinde hematopoetik elemanları bulundurur. Süngerimsi kemik aynı zamanda kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç bölümleri ile yassı kemiklerin iç yüzlerini oluşturur (16).

2.1.5. Kemik zarları

Kemiğin dış ve iç yüzeyini kaplayan iki farklı tipte kemik zarı bulunur.

2.1.5.1. Periosteum

Kortikal kemiklerin dış tabakasını örten fibröz bir kılıftır. Dış yüzeyde fibröz tabaka olan stratum fibrosum ile iç yüzeyde osteojenik tabaka olan stratum cambiumdan oluşur. Bu iki bağ dokusu katmanının birbirinden ayrılması oldukça zordur. Periosteum, kortikal kemik ile onu çevreleyen yumuşak dokular arasındaki bağlantıyı sağlar (18,36).

Dış yüzeydeki fibröz tabaka düzensiz dağılım gösteren fibroblastlardan ve kollajen liflerden oluşur. Bu kollajen lifler, kemik matriksine doğru penetre olarak periost ile kemiği birbirine bağlayıp Sharpey lifleri adını alırlar. Kemik yüzeyiyle temas halinde

olan osteojenik tabaka ise mitoz çoğalma yapabilen ve osteoblastlara dönüşebilen osteoprogenitör hücrelerden oluşan, sempatik sinirlerden zengin ve damarlanması iyi bir tabakadır (37–39).

2.1.5.2. Endosteum

Kemik hücrelerinin tek sıra dizilmesi ile meydana gelmiş, kemik iliği ile kemik yüzeyi arasındaki sınırı oluşturan tabakadır. Kortikal ve kansellöz kemiğin iç yüzeyini döşer (40,41). Endosteum, periosteuma göre daha ince olup, retiküler bağ dokusundan meydana gelmiştir. Hem osteojenik hem de hematopoetik özellik gösterir ve osteojenik etkinliğini büyüme sona erdikten sonra da sürdürür (40,42).

Kemik zarlarının esas görevleri sardıkları kemik dokusunun beslenmesini sağlamaktır. Aynı zamanda kemiğin olağan gelişim süreci ve gerektiğinde onarımı için ihtiyaç duyulan osteoblastları da sağlamakla görevlidir (43).

2.1.6. Kemiğin kalsifikasyonu

Kalsifikasyon temel olarak iki fazda gerçekleşir.

Birinci faz osteoblastlardan salgılanan kollajen 1 (prokollajen) ve amorf maddenin kalsifikasyona uygun ortam sağlamak amacı ile düzenli bir şekilde yerleşmelerini içerir. Amorf yapı içinde kollajen lifleri proteoglikanlar, protein peptitleri ve lipidlerden oluşan makromoleküler özel bir yapılanma gösterirler. Düzenli bir şekilde dizilerek inorganik kristalleri barındırmak için kanallar veya delik bölgeler oluştururlar (4,21,44).

Kalsifikasyonun ikinci fazında ise mineralizasyon gerçekleşir. Kemiğin esasını oluşturan kalsiyum ve fosfat mineralleri lokal olarak depolanarak çekirdekleri oluştururlar. Mineralizasyon bu çekirdek çevresinde devam eder (4,21,44).

Osteoid dokunun mineralizasyonunun nerede ve ne şekilde gelişeceğine ait mekanizmalar hala tartışılmakta olup değişik yaklaşımlar vardır. Bunlardan ilki, osteoblastlardan salgılanan alkalen fosfat enziminin fosfat esterleri üzerine etki ederek, serbestlenen kalsiyum ve fosfatın lokal olarak çökmesi şeklindedir. Kemik dışındaki dokularda profosfat, fosfonat ve difosfonat enzimleri sayesinde kalsifikasyon gerçekleşmez (4,21,44).

İkinci mekanizmada ise; biyolojik dokuların etkisiyle kalsiyum ve fosfat bileşikleri eriyebilir hale gelir. Bu iyonlar stabil olmayan iyonik sıvı ortamda organik matriksin katalizörlüğünde heterojen çekirdekleşme mekanizmasıyla önce amorf sonra hidroksiapatit kristalini oluşturur (4,21,44).

Bugün en çok kabul gören mekanizma ise kalsifikasyonun hücrel olarak düzenlenmesidir. Mineralizasyon, osteoblastlardan ve kondrositlerden kaynağını alan matriks vezikülleri ile başlar ve devam eder. Organik matriks sentezi ile birlikte bu hücrelerden matriks vezikülleri denilen özel oluşumlar dışarı salınır. Bu veziküller lipid, yoğunlaşmış kalsiyum fosfat, alkalen fosfataz, alkali adenozin trifosfataz ve profosfataz enzimlerini içerir. Osteoblast ve kondrositlerden dışarı salınan bu yapı salındıktan sonra olgunlaşmaya başlar ve içinde amorf kalsiyum fosfat depolanır. Fosfolipid ve alkalen fosfatazın kalsiyumu süzdüğü ve ATP'nin gerekli enerjiyi sağladığına inanılmaktadır. Olgunlaşan matriks vezikülleri organik matriks üzerine taşınarak parçalanır ve biriktirdiği kalsiyum fosfat amorf fazda depolanmaya başlar. İhtiva ettiği enzimlerde mineralizasyon için uygun ortamı sağlar. Zira mineralizasyon başladığında vezikül enzimleri dramatik oranda düşmektedir (4,21,44).

2.1.7. Kemik büyümesi ve şekillenmesi

Kemiğin büyümesi, dokunun bir bölümünde yeni kemik yapılırken daha önce yapılmış olan bölümünün aynı anda yıkımı ile gerçekleşir. Kemik dokusu kaybı yeni kemik sentezinden daha azdır. Çocuklarda kemik süratle yeniden şekillenir hatta yetişkinlere oranla küçük çocuklarda yenilenme 200 kat daha hızlı olabilir. Kemiğin yeniden şekillenmesi birkaç etkene bağlıdır; bunlar, kas kasılımı ve vücut hareketlerinin oluşturduğu çekilme ve gerilme, hormonlar ve büyüme faktörleridir (4,44–46).

Yakın zamanda Martin tarafından ortaya atılan, kemik yüzeyini döşeyen hücrelerin, mekanik olarak uyarılan osteositik sinyallerin inhibisyonu olmadıkça kemiğin yeniden şekillendirilmesi yönünde işlev görme eğiliminde olduklarını öne süren teorisi kabul görmüştür. Bu önermeye göre azalan yük sonucunda osteoblastik sinyal üretimi düşerken yeniden şekillendirme artmakta ve aşırı yük gelmesi ve/veya mineralleşme sonucunda sinyal iletimi veya üretimi zarar görmekte ve remodeling bu durumda tekrar artmaktadır (4,44–46).

Kraniyal kemiklerin büyümesi esas olarak, kemik dokularının şekillenmesi için genellikle dış yüzeyleri ile sutureları arasında yer alan periosteum aracılığı ile olur. Aynı zamanda bunların iç yüzeylerinde de rezorpsiyon gerçekleşir. Şekil değiştirebilme özelliğine sahip kemik dokusu, beynin büyümesine ayak uydurarak kafatasını oluşturur. Beyin tam olarak gelişmezse kafatası küçük kalır (4,44–46).

Uzun kemiklerin büyümesi kompleks bir olaydır. Epifizler, kıkırdağın radyal büyümesini izleyip epifizdeki süngerimsi kısmı artıran enkonral kemikleşmenin ardından boyutlarını artırırlar. Epifizlerin hızlı büyümeleri nedeniyle, diyafizlerin uzantıları çabuk bir şekilde büyür ve diyafiz şaftı tarafından ayrılan iki diyafiz hunisi ortaya çıkar. Diyafiz şaftının boyu, genel olarak epifiz plağının osteojenik aktivitesi ile kemik kısmın dış yüzeyindeki periostun kemiği şekillendirmesi sonucunda artar. Bu sırada kemik iliği boşluğunun çapının artmasıyla kemik iç kısımdan dışa doğru uzaklaştırılır ve silindirik şeklini alır (4,44–46).

Özet olarak uzun kemikler epifiz plaklarındaki faaliyetler sonucunda uzamakta, periyostal apozisyonla genişlemektedir. Epifiz kıkırdağının büyümesi sona erdiğinde kemikleşme sürecinin bir sonucu olarak yerini kemik dokusu alır. Epifizin kapanması her kemiğe göre kronolojik bir sıra izler ve 20 yaşına doğru tamamlanır. Büyüyen iskeletin röntgen muayenesi yapılarak genç yaştaki bir kişinin “kemik yaşı”nı belirlemek olanaklıdır. Bu muayenede hangi epifizin açık olduğu, hangisinin kapalı olduğu görülebilir. Epifiz kapandığında kemiğin enine büyümesi sürebilmesine karşın, uzunlumasına büyüme olanaksız hale gelir (4,44–46).

2.1.8. Kemik defekti iyileşmesi

Kemik dokusunda bir travma ya da bir defekt oluştuğunda, çevreleyen yumuşak dokuda ve kemik içinde hemoraji meydana gelir. Bu bölge kanla dolar ve kanın pıhtılaşması ile kemikte iyileşme başlamış sayılır. İnflamasyon sahasında, çevre damarlarda meydana gelen hasara bağlı olarak bu bölge hipoksik ve asidik pH'a sahip olur. Lizozomal enzimler ortama salınır ve ilk etapta osteojenik aktivite bozularak dokuda nekroz alanı oluşur. Defekt bölgesinde polimorfnükleer lökositler, mast hücreleri ve makrofajlar çokça bulunur. Ayrıca travma sonrası yara iyileşmesinde görev alan bazı mediyatörler salgılanır ve reparatif hücre çoğalmasını uyarırlar. Ortamda osteoblastların, endotelial hücrelerin ve kondroblastların sayısı artar. Çevre dokulardan mast hücreleri, reparatif hücreler ve bazı makrofajlar defekt alanına göç ederler. Polimorfonükleer

lökositler de kan yoluyla defekt bölgesine gelir. Aynı zamanda, osteoklastlar makrofajlarla birlikte travma alanındaki nekrotik kemiği ve doku artıklarını yok eder (44,47).

İnflamasyon evresinden sonra reperasyon evresi başlar. Bu evrede periosteum ve endosteumdan organize olmuş pıhtı içine mezenkim hücreler girer. Defekt bölgesinde mezenkim hücrelerinin hızla çoğalıp fibroblast ve osteoblastlara dönüşmesiyle granülasyon dokusu (yumuşak kallus) oluşumu başlar. Granülasyon dokusunun kemik kallusa dönüşebilmesi için damarlanmanın artması gerekir. Tam kırıklarda parçaların stabilizasyonu bu doku tarafından sağlanır. Yumuşak kallus; kollajen ve glikoproteinleri içeren matriks içinde gömülü fibroblast, kondroblast ve yeni oluşan kılcal damarlardan oluşur. Yumuşak kallus, dış kallus ve iç kallus olmak üzere iki ayrı katman halinde incelenir. Dış kallus periostun kemiğe bakan osteojenik tabakası içinde bulunan osteoblastların proliferasyonu ile meydana gelir. İç kallus ise endosteal hücrelerden gelişir. Bu evre organizasyon evresi olarak adlandırılabilir (44,47).

Defektin meydana gelmesini takiben üç ila dört hafta içinde bu süreç gerçekleşir ve sert kallus evresi başlar. İç ve dış kallusların derece derece örgüsel kemiğe dönüşmesiyle düzensiz kemik yapımı başlamış olur. Hücre sayısı artar ve vaskülarizasyon devam eder, süreç ilerledikçe devaskülarizasyon gerçekleşir. Osteoblastların osteoid madde üretmesiyle ortamın pH'ı artmaya başlar. Osteoblastlar pH'ın yükselmesinin ardından onuncu günden itibaren alkalen fosfataz sentezler ve kalsiyum karbonat kristalleri osteoid madde üzerine çöker (44,47).

İlk oluştuğunda düzensiz olan bu yapı osteoklastlar tarafından rezorbe edilir ve düzenli kemik oluşumu sağlanır. Bu evre, yeniden şekillenme (remodelling) olarak adlandırılır. Dış kallus rezorbe olurken iç ve dış kallus arasında kalan intermediyal kallus Havers sistemi içeren kompakt kemiğe dönüşür, iç kallus ise spongiöz kemiği oluşturur. Remodeling evresinde damarlanmanın normal halini almasıyla birlikte dokudaki oksijenasyon da normale döner ve bu evre birkaç yıl devam eder (44,47).

2.1.9. Kemik formasyon göstergeleri

2.1.9.1. Alkalen fosfataz

Alkalen fosfatazlar (ALP) birçok dokudan kaynağını alan ve kompleks bir işleyişe sahip enzimlerdir (48). Kanda saptanabilen ALP izoenzimleri dört grupta incelenebilir. Kaynağı olan dokuya spesifik olanlar PLALP (plasentada bulunan alkalen fosfataz), GCALP (germ hücrelerinde bulunan alkalen fosfataz) ve IALP (bağırsakta bulunan alkalen fosfataz) 'dir. Bir de herhangi bir dokuya spesifik olmayan TNALP izoenzimi bulunur. İnsan serumunda total ALP aktivitesinin %95 i kemik ve karaciğerden eksprese edilen TNALP ile gerçekleşir, sağlıklı kişilerde TNALP'nin kemik ve karaciğerden kaynağını alma oranı 1:1 dir (49). Dokuya spesifik olmayan alkalen fosfataz (TNALP) özellikle kemik ve karaciğer olmak üzere böbrek, dalak, akciğer, öd ve hamilelikte 8. haftaya kadar plasentanın da aralarında bulunduğu birçok dokuda bulunabilmektedir (50). Sağlıklı kişilerin kanında TNALP'nin altı tip izoformu bulunur. Bunların ilk üçü kemik alkalen fosfatazı (BALP) olan B/I, B1 ve B2; diğer üçü de karaciğer alkalen fosfatazı (LALP) olan L1, L2 ve L3'tür. Kemiğin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda trabeküler kemikte B1 ve B2 nin toplam aktivitesinin kortikal kemiktekinden daha fazla olduğu; kortikal kemikte B1 aktivitesinin, trabeküler kemikte ise B2 aktivitesinin daha fazla olduğu bulunmuştur (51).

Kemik dokusunda alkalen fosfataz osteoblastın hücre zarında yer alır. Kemiğin oluşumu sırasında kana salınan bu madde aynı zamanda kemik yapımı varlığının bir belirtecidir. Alkalen fosfataz hücre zarlarının hücre dışı yüzeyindeki glukozil-fosfatidilinozitol kalıntılarına kuvvetli şekilde bağlanan bir glukoproteindir. Hücre zarına bağlı iken bir tetramerken, dolaşımda diamer formdadır. Alkalen fosfatazın kemik dokusundaki osteoblastların hücre zarlarından dolaşıma nasıl salgılandığı ile ilgili mekanizma henüz net olarak açıklanamamıştır. Kemik yapımı göstergesi olarak total serum alkalen fosfataz değeri sıklıkla kullanılır. Kemik metabolizması bozukluklarından kaynaklanan Paget hastalığı, osteomalasi, raşitizm ve renal osteodistrofi gibi rahatsızlıkların tanı, tedavi ve iyileşme sürecinin takibinde enzim aktivitesindeki değişiklikler yararlı bir belirteçtir (52).

Kemik alkalen fosfataz enziminin işlevi tam olarak bilinmese de hipofosfataz defektleri incelendiğinde bu enzimin mineralizasyondaki önemi anlaşılmaktadır. Hücre zarındaki matriks keseciklerinin mineralizasyonun başlangıç odağı olduğu

düşünülmektedir ve bu kesecikler içlerinde bol miktarda alkalen fosfataz içermektedir. Kıkırdaktaki kalsiyumpirofosfatdihidrat kristallerinin rezorpsiyon sürecinde de etkisi olduğu düşünülmektedir.

Osteoblastlar kemik matriksini aktif olarak sentezledikleri sırada, bol miktarda alkalen fosfataz enzimi salgırlar. Bu enzimin inorganik fosfat yoğunluğunu arttırdığı ve kollajen lifleri, kalsiyum tuzlarının çökmesini sağlayacak şekilde uyardığı düşünülmektedir. Alkalen fosfatazın kemik metabolizmasındaki temel görevi kemik yapım sürecinin başlamasını sağlamaktır. Kandaki alkalen fosfataz seviyesi, genellikle kemik yapım hızı ile ilişkilendirilmektedir (53).

Serumda bulunan alkalen fosfataz enzimi miktarı test için örnek alınan anda vücutta süregelen kemik mineralizasyonu miktarının göstergelerinden biridir. Kemğin yapımı ve remodeling sürecinde, kalsiyum tuzları osteoid madde içerisine çökelir ve kemik dokusunun organik matriksi sertleşir. Sertleşen organik matriks kemiği mekanik güçlere karşı daha dirençli hale getirir. Kalsiyum tuzlarının organik matriks içine çökmesi osteoblastların sitoplazmaları içerisinde ürettikleri ALP enzimini sitoplazma dışına göndermesiyle gerçekleşir (54).

Alkalen fosfataz enzimi kalsiyum tuzlarının organik matriks içerisine çökmesini sağlamanın yanında kollajen fibrillerin oluşmasına da aracılık eder (55,56). Total ALP aktivitesi, osteoblastların fonksiyonel olarak aktif olduklarının bir kanıtı olarak düşünülmektedir (54).

Alkalen fosfataz aynı zamanda, ossifikasyon gösteren tümörlerin osteoblast aktivitelerinin takibinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır (57).

2.1.9.2. Osteokalsin

Osteokalsin, kemikte en fazla bulunan ve osteoblast hücrelerinden üretilen matriks proteindir. Kemiğe oldukça spesifik olması sayesinde kemik metabolizması ile ilgili bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Glutamik asitçe zengin, 49 aminoasitli nonkollajen yapıda bir matriks proteindir. Osteokalsin, gelişme evresindeki kemikte çok miktarda bulunur ve kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayarak kemik oluşumuna katkı sağlar (58).

2.1.9.3. Tip 1 prokollajen karboksiterminal propeptid (PCIP) ve tip 1 prokollajen aminoterminal propeptid (PNIP)

Kemikteki asıl protein olan tip 1 kolajenin başlangıç formudur. Tip 1 kollajenin üretimi esnasında osteoblastlar tarafından amino ve karboksi kısımlarından kopartılır. Kandaki PCIP ve PNIP seviyeleri osteoblastların ve fibroblastların sentezlediği yeni kollajen miktarlarındaki değişimler, kemik oluşumu ve çocukların büyüme hızları hakkında fikir vermektedir (59).

2.1.9.4. Kemik sialoproteini

Kemiğin kollajen yapıda olmayan organik matriksinin büyük bir kısmını oluşturur. Osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından üretilir. Tam olarak spesifik olmasa da kemik döngüsünün hassas bir belirteci olan kemik sialoproteini , preosteoblastları çoğalmaları yönünde uyarır ve osteoblastlara farklılaşmalarını sağlar. Kemik sialoproteini, kemik matriksinin farklılaşmasının geç döneminde açığa çıkan osteoblast kaynaklı komponentidir (60,61).

2.1.9.5. Osteopontin

Osteopontin, ilk defa 1979 yılında hücre dışı bir matriks proteini olarak belirtilmiştir. Bu ekstraselüler matriks proteini kemikte ve hasar görmüş veya iltihabi dokulardaki kalsifikasyonda (distrofik kalsifikasyon) kalsiyum birikimini düzenler. Ayrıca ateroskleroz, osteoporoz, tümör büyümesi vb. bir çok olayda da işlevi olabileceği iddia edilmektedir (62).

2.1.10. Kemiğin hücresel işlevlerini düzenleyen mekanizmalar

Kemik metabolizmasındaki hücrelerinin tüm fonksiyonları otokrin ve parakrin faktörler aracılığıyla düzenlenir. Parakrin faktörler aracılığıyla farklı hücreler arasındaki düzenlemeler yapılırken, otokrin faktörler aracılığıyla da aynı hücreler arasındaki etkileşim düzenlenir. Bu düzenlemeler için vücutta birçok hormon ve lokal faktör görev alır. Sistemik faktörler tüm vücuda etki ederken aynı zamanda etkilenen hücrelerden yerel düzenleyici faktörlerin de salınımını kontrol ederler (13,44,63).

2.1.10.1. Yerel düzenleyici faktörler

Prostaglandinler

Prostaglandinlerin işlevleri PTH işlevlerine benzer özellikler taşımaktadır. *In vitro* çalışmalarda osteoklastik aktivitede artış yönünde uyaran olarak etki göstermişlerdir (4).

Büyüme hormonu

Vücuttaki büyüme potansiyeline sahip dokuların tamamının büyümesinde görev alır. Hücrelerde mitoz bölünmeyi indükleyerek hücre proliferasyonuna sebep olur. Kemik yapımında görevli hücreler ile kas hücresine dönüşebilme potansiyeli olan hücrelerin farklılaşmasını sağlar. Büyüme hormonu iskelet sistemi üzerinde belirgin rol oynar. Büyüme hormonu, kemik büyümesinde görevli hücrelerde protein depolarının artırılmasını, kıkırdak ve kemik yapımında görevli hücrelerde proliferasyon hızının artırılmasını ve kondrositlerin osteojen hücrelere dönüşmesini sağlamaktadırlar. Büyüme hormonu vücutta salgılandığı zaman karaciğerde somatomedinler diye bilinen ve kemik büyümesinin bütün evrelerinde hızlandırıcı bir etkiye sahip olan çeşitli protein yapılar oluşturmalarını sağlar(4).

Kemik morfogenetik proteinler (BMP)

Kemik morfogenetik proteinler Transforming Growth Factor- β grubuna ait üyelerdir. TGF- β kültür ortamında fibroblastları dönüştürme özelliğine sahiptir (19,44,64).

Kemik morfogenetik proteinler (BMP) büyüme faktörleri arasında kabul edilirler. Bağ dokusu hücrelerinin proliferasyonunu uyarırlar. Birçok büyüme faktörü olmasına rağmen hepsinin arasında bağ dokusu hücrelerini potansiyel kemik dokusu hücrelerine dönüştürebilen tek morfojendir. Diğer büyüme faktörleri (TGF- β , IGF, FGF, PDGF ve VEGF vb.) hücre çoğalmasının uyarılması yeteneğine sahiptirler (19,44,64).

BMP'ler vücut sıvılarında çözünebilen moleküllerdir. Cerrahi işlem sırasında ortamda çözünmeden kalabilmeleri için uygun bir taşıyıcı aracılığı ile uygulanmaları gerekir (19,44,64).

2.1.10.2. Sistemik faktörler

Kalsitonin ve paratiroid hormon (PTH)

Kalsitonin, fizyolojik etkisini kemik rezorpsiyonunu geçici olarak baskılayarak gösterir. Olgunlaşmamış osteoklastların osteoklastik aktivitelerini engelleyici bir etkisi vardır (13,44,63).

PTH, kemiklere ve böbreklere etki ederek kandaki kalsiyum seviyesini düzenler. Osteoblastları etkilediği gibi potansiyel olarak osteoklastlara da kemik yıkımı uyarını olarak etki eder. PTH hücresel düzeyde ilik kültürlerinde osteoklast sayısını arttırmakta, metalloproteinaz sentezini uyarmakta, osteoblastik hücrelerden tip 1 kollajen sentezini önlemektedir. PTH'nın osteoblastlar üzerinde etkisi, osteoblast hücresinin farklılaşmanın hangi evresinde olduğu ile doğrudan ilgilidir (13,44,63).

Östrojen, androjen, steroid reseptörleri ve glukokortikoidler

Östrojenler kemik yoğunluğunun korunmasında rol almaktadırlar. Ayrıca TGF- β üretimini uyararak osteoklast ölümünde artışa yol açtığı düşünülmektedir. Androjenlerin de gelişim sırasında kemik büyümesi üzerine etkili olduğu açıklanmıştır (4,44).

Steroid ve retinoid reseptörler hücre çekirdeğine aittir. Reseptörlere ait moleküler uzantılar hücre zarından kolaylıkla geçebilecek yapıda olmalarına karşın hücreler ve hücre çekirdeğine taşıyıcı proteinler aracılığı ile getirilir (4,44).

Glukokortikoidler *in vivo* çalışmalarda kemik erimesini baskılamış, kemik oluşum ve yeniden şekillenme bölgelerinde işlevleri hızlandırmışlardır. Osteoblast ve mezenkimal hücreler üzerinde osteoblast öncül hücre farklılaşmasını sağlayıcı etki gösterirler (48). Glukokortikoidlerin, anabolik ve katabolik etkisi olan PTH ve IGF-1 gibi hormonların potansiyel etkilerini arttırdığı da gösterilmiştir (4,44).

- **Östrojen hormonunun temel etki mekanizmaları**

Östrojenin kemik dokusu üzerine etkilerinin daha anlaşılır olabilmesi için metabolizma üzerine etkilerinin genel bir bakış açısıyla değerlendirilmesi daha uygun olacaktır.

Steroid yapılı hormonlar olan östrojenler, genellikle kolesterolden, az miktarda da asetilkoenzim A'dan sentezlenirler. İlk olarak kolesterolden progesteron ve testosteron

sentezlenir. Ardından, sentezlenen testosteron granüloza hücrelerinde östrojene dönüştürülür. Hamile olmayan kadınlarda östrojenin büyük bir kısmı ovaryumda az bir miktar da adrenal bezde; hamile kadınlardaysa plasentada üretilmektedir. Östrojenler; β -östradiol, östron ve östriol olmak üzere üç ana formda bulunur. Bunların içinde en çok salgılanan β -östradiol'dür. Östron ise daha az salgılanan ve zayıf etkili östrojen formudur. Östriol, diğer formların özellikle karaciğerde oksidasyona uğramasıyla açığa çıkar. β -östradiol'ün östrojenik etkisi; östrondan 12 kat, östriolden ise 80 kat daha fazladır. Karaciğerde östrojenin güçlü formları olan östradiol ve östron daha az etkili olan östriole çevrilir. Östrojen çoğu memeli dokusunda; embriyolojik gelişim, hücre büyümesi ve yaşamın devamlılığı üzerinde önemli etkilere sahiptir (65–68).

Çeşitli araştırmalarda östrojen moleküllerinin östrojen reseptörleri (ERs) aracılığıyla etki ettikleri gösterilmiştir (69–72). Östrojen reseptörleri (ERs)'nin son yıllarda yapılan çalışmalarda ER α ve ER β olarak isimlendirilen iki ayrı alt grupta incelendiği görülmektedir (69–76). Bu iki ayrı reseptör alt tipinin doku veya organlara göre farklı dağılımlar gösterdikleri belirtilmiştir (77,78). Örneğin; ER α yoğunluğu meme bezleri ve uterusu fazlayken; ER β 'nin kardiyovasküler sistem, merkezi sinir sistemi, kemik, ürogenital yollar, immün sistem, böbrek ve akciğerlerde ER α dan daha yoğun olduğu bildirilmiştir (79,80). ER α ve ER β 'nin sitoplazmik ve nükleer formları bulunmaktadır ve bu formlar toplam reseptör sayısının yaklaşık %98'ini oluşturur. Geriye kalan %2 lik kısmın da hücre membranlarında bulunduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (81–83).

Östrojen molekülünün çalışma mekanizmaları moleküler düzeyde incelendiğinde iki şekilde etki ettiği gösterilmiştir. İlkinde hücre zarından geçen 17 α -östradiol, ER α ve ER β 'nin nükleer formuyla birleşir. Östrojenin etkisi ya DNA üzerinde bulunan östrojene duyarlı bölge (ERE) olarak bilinen (84) alana ya da DNA üzerindeki AF1 (activation function-1) bölgesine olan bu bağlanma ile görülür. Bu etkileme biçimi literatürde direkt genomik mekanizma olarak adlandırılmaktadır (85–89). İkincisi ise; 17 α -östradiolün, hücre zarında bulunan ER α ve ER β reseptörlerine bağlanması ile gerçekleşen indirekt genomik mekanizmadır (89).

- **Östrojen etkisinin hücre düzeyindeki yansımaları**

Östrojenler hücresel düzeyde birçok gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu gen ekspresyonlarının sonucu olarak üretilen proteinler hücre içi ya da hücre dışı birçok mekanizmanın işleyişinde yer almaktadır.

- EGF (Epidermal büyüme faktörü) sentezi ve salınım düzeyinin ayarlanması,
- IGF-1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü) sentezi ve salınım düzeyinin ayarlanması,
- Anti-apoptotik protein Bcl-xL proteinlerinin sentezi,
- NMDA reseptörlerinin oluşturulması ve aktivasyonu,
- GnRH (Gonadotropin-releasing hormon) sentezi ve salınımının ayarlanması,
- CD4+ T, Th1, Th2 ve CD8h T hücre maturasyon ve aktivasyonu,
- VEGF (Damar endoteli büyüme faktörü) oluşturulması ve aktivasyonu (90,91) ve
- Doğal öldürücü hücre (NK) familyasındaki sitokin ve hücre membran yüzey antijenlerinin (CD34 antijen, defensin 1, IL-13 reseptör 2, IL-8, fosfolipaz A2, selenoprotein P1 ve sialomucin/CD164) maturasyon ve aktivasyonu gibi yüzlerce fonksiyonu gerçekleştirdiği kaynaklara geçmiştir (92).

Östrojen, ilgili hücrelerde TGF- β ve IGF-1'in lokal üretimini artırarak, kemik formasyonuna da etki etmektedir. Östrojen miktarının menopoza sonrası dönemde azalmasıyla paratiroid hormon (PTH) daha az salgılanır. Bu durumun 1-alfa hidroksilasyonu düzeyini azalttığı ve kalsiyum emilimini engelleyerek kemik dokusunda rezorpsiyona neden olduğu ispatlanmıştır (93). Östrojenin kemik dokusu üzerine etkisi hem direkt, hem de indirekt olarak gerçekleşmektedir. D vitamini sentezi östrojenin 1-alfa hidroksilasyon aşamasındaki katkısıyla artmaktadır. Bu durum bağırsak epitelinde villus sayısında artışa sebep olmanın yanında kalsiyumun taşınmasında görev alan proteinlerin de sayısının artmasını sağlar. Bu iki koşulun sağlanmasıyla bağırsaklardan kalsiyum emilimi artar ve mineralizasyon için gereken önemli bir unsurun temini sağlanmış olur. Östrojenin bahsedilen direkt etkileri dışında kemik dokusunu paratiroid hormonuna karşı duyarsız bir hale getirdiği ve indirekt olarak paratiroid hormon seviyesini yükselttiği de bildirilmiştir. Sıralanan özelliklerinin yanında, östrojenin kemik oluşumu üzerinde, prostoglandin sentezini durdurması, sitokin sentezini azaltması ve büyüme faktörü sentezinde sağladığı artış ile de indirekt etkileri olduğu bildirilmiştir (94).

Bahsi geçen fonksiyonlardan hangisi incelenecek olursa olsun, östrojen hormonunun metabolizmaya etkisinin önemi daha iyi anlaşılacaktır.

2.2. FİTOÖSTROJENLER

Fitoöstrojenler, insan ve hayvan dokularında östrojen benzeri etki gösteren bitkilerden elde edilen bileşiklerdir. Son yıllarda yapılan bazı epidemiyoloji çalışmalarında, diyetlerinde bol miktarda fitoöstrojen tüketen toplumlarda kardiyovasküler hastalıklar ve osteoporoz gibi rahatsızlıklara daha az rastlandığı; göğüs, prostat ve bağırsak kanserlerinin görülme sıklığının daha az olduğu ve kadınlarda östrojenin postmenopozal dönemdeki yetersizliği sonucu gözlenen semptomların daha hafif seyrettiği bildirilmiştir (95).

Fitoöstrojenik bileşikler, memeli canlılarda östrojenik aktiviteyi arttıran ve yapı olarak memeli östrojeni 17β -östradiol'e benzer, bitkisel steroidal olmayan kimyasal yapılar olarak açıklanabilirler (96).

Loewe ve ark. 1927'de yayınladıkları çalışmada ilk kez bazı bitki ya da bitkisel özütlerin östrojen benzeri etki gösterdiklerini bildirmişlerdir (97).

1940'lı yıllarda Batı Avustralya'da belirli bir bölgedeki koyunlarda infertilite sorunu rapor edilmiştir. Bu infertilite sorununun bölgede bulunan bir yonca türünün içerdiği bitkisel kaynaklı bileşikler ve türevlerinin sindiriminden kaynaklandığı bildirilmiştir (98). 1960'lı yılların ortalarında bu yonca türü ile ilgili yapılan çalışmalarda yapısında yüksek oranda biochanin A, formononetin ve genistein bulunduğu bildirilmiştir (99,100). Ayrıca bu yonca türü ile beslenen koyunların plazmasında formononetin, daidzein, genistein ve biochanin A bulunduğu bildirilmiştir (101). İnfertilite sorununun sebebi olarak, koyunların bu zayıf östrojenik özellik gösteren steroid yapılı olmayan bileşiklerden zengin otlarla beslenmiş olmaları gösterilmiştir (102).

Bir bitkinin ya da bir gıdanın içerdiği fitoöstrojen miktarı, bitkinin genetik yapısı, mevsim özellikleri ve yetiştiği bölge, mantarlar ile enfekte olup olmadığı ve gıdanın işlenme şekilleri gibi değişkenlerden etkilenmektedir (95).

Besinlerle veya hazır gıda takviyeleri olarak alınan fitoöstrojenlerin sağlık üzerine etkilerini inceleyen çok sayıda epidemiyolojik ve klinik çalışma yapılmıştır. Çalışmalarda genellikle, fitoöstrojenlerin menopoz öncesi ve sonrası dönemlerde kadınlar üzerinde nasıl etkileri olduğu araştırılmıştır (103). Fitoöstrojenler dokularda, östrojenik ve antiöstrojenik, antioksidan, antianjiogenik, antiproliferatif ve antinflamatuar etkiler gösterebilir. Östrojenik ve antiöstrojenik özellikleri daha çok menopoz semptomları veya osteoporoz ile ilişkili iken, antioksidan özelliklerinin kanser ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (104).

2.2.1. Fitoöstrojenlerin biyolojik potansiyelleri ve etkileri

a. Östrojenik ve antiöstrojenik aktivite:

Metabolizma üzerine çok karmaşık etkilere sahip olan fitoöstrojenlerin aktivitelerinin ortamdaki endojen östrojen seviyesi ile ilişkili olabileceği; östrojen düzeyi yüksek olduğunda (premenopoz) antiöstrojenik etki gösterirken, östrojen düzeyi düşük olduğunda (postmenopoz gibi) östrojenik etki gösterebilecekleri düşünülmektedir (105,106). Özetle fitoöstrojenler hem östrojen agonisti hem de östrojen antagonisti etki gösterebilirler (107–109).

Yapılan çalışmalarda, fitoöstrojenlerin genel olarak ER- β 'ya olan bağlanma kapasitesinin ER- α 'ya olandan daha fazla olabileceği gösterilmiştir. Örneğin genistein ER- β 'ya ER- α 'dan 20 kat daha fazla bağlanabildiği bildirilmiştir (107,108,110). Canlılar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, fitoöstrojenlerin östrojenik etki gösterebilme kabiliyetleri canlının türüne ve fitoöstrojenlerin veriliş şekline göre değişiklik göstermektedir (111).

Fitoöstrojenlerin östrojenik ve antiöstrojenik özelliklerinin açıklanmasında, steroid metabolizmasını etkileyen enzimler üzerine etkilerinin olabileceği de ileri sürülmüştür. İzoflavonların plasenta ve overlerdeki mikrozomlarda aromataz enzimini baskılayarak androjenlerin östrojenlere dönüşümünü bloke ettiği çalışmalarla gösterilmiştir (112,113).

b. Antioksidan aktivite:

İzoflavonlar başta olmak üzere fitoöstrojenlerin antioksidan özellikleri laboratuvar ve klinik çalışmalar ile gösterilmiştir. İzoflavonların, oksidatif DNA hasarını, doğrudan serbest radikaller üzerine veya antioksidan-süpürücü enzimler üzerine etki ederek önleyebildiği bilinmektedir. Çalışmalardan elde edilen bilgilere göre, gıdalardan alınan izoflavonların LDL oksidasyonuna karşı oluşturulan direnci arttırdığı gösterilmektedir (114). En yüksek antioksidan aktiviteye sahip izoflavonun genistein olduğu bildirilmiştir (115).

c. Antikarsinojenik aktivite:

İzoflavonlar antianjiogenez ve hücre siklus sürecini engellemeyi de içine alan birçok potansiyel antikarsinojenik etkiler göstermektedir. Fitoöstrojenlerin tümör gelişimlerinde önemli rolleri olduğu bilinen birçok enzimin etkinliğini baskılayabildiği çalışmalarda gösterildikten sonra, antikarsinojen etkileri üzerine olan araştırmaların sayısı artmıştır (111,116–118). Fitoöstrojenlerin antianjiogenetik özellikleri sayesinde

tümöral dokuların metastazını önlemelerinin yanında, antiproliferatif özellikleri ile de tümöral hücrelerin sayıca artışını engelleyerek antikarsinojenik etki gösterdikleri düşünülmektedir. Ancak bu konudaki hayvan deneyleri ve hücre kültürü çalışmalarının sayıca yetersiz olmasından dolayı edinilen bilgiler yeni araştırmalarla desteklenmelidir (107,110,111,115,116).

2.2.2. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması

Fitoöstrojenler farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmaktadır. Bunlar; izoflavonlar, lignanlar, komestanlar ve stilbenler olmak üzere dört grup altında incelenebilmektedir (103,119,120).

○ İzoflavonlar

İzoflavonlar özellikle baklagillerde bulunur ve bitkiler aleminde oldukça fazla bulunan kimyasal bileşiklerdir (121,122). Çeşitli kurubaklagillerde bulunmasına rağmen esas kaynağı soya türevleri ve soya fasulyesidir. Bu kaynaklardaki fitoöstrojenik etkisi en fazla olan üç izoflavon daidzein, genistein ve glisteindir (123). Formononetin ve biochanin A; daidzein ve genisteinin metillenmiş türevleridir. Genistein, göğüs, ovaryum, endometrium, prostat, vasküler ve kemik dokularında östrojene benzer etkiler oluşturmaktadır (103,120).

Soyanın dışında kırmızı yonca bitkisi; başta formononetin, genistein ve biochanin A olmak üzere izoflavonlar açısından önemli bir kaynaktır. İnsan ve hayvan sağlığına olan etkilerinden dolayı en çok bilinen ve üzerinde en çok çalışılan fitoöstrojenler izoflavonlardır (107).

Dünya genelindeki çalışmalar, Asya toplumlarında kalp damar hastalıklarının, menopoz sonrası şikayetlerin ve bazı kanser türlerinin görülme oranının batılı toplumlara göre daha az olduğunu göstermektedir. Bu durum geleneksel Asya diyetinde genellikle bulunan, genistein ve daidzein gibi izoflavonları yüksek oranda içeren soya fasülyesi ve soya ürünlerinin tüketimi ile ilişkilendirilmektedir (124,125).

○ Lignanlar

Lignanlar, fitoöstrojenik bileşikler altında sınıflandırılan önemli bir kimyasal bileşik grubudur. Tanımlanan en önemli lignanlar enterolakton ve enterodiol olup (126), bu bileşikler enterolignanlar olarak adlandırılırlar. Bu maddeler, hayvanların ve

insanların serumlarında, idrarlarında, safralarında ve seminal sıvılarında bulunmalarından dolayı memeli lignanları olarak ta isimlendirilirler (127,128). Bitkisel lignanlar, bitkilerdeki formları ile östrojenik etki gösteremezler. Bitkilerde lignanların ön maddeleri bulunur ve bu maddeler sindirim sırasında bağırsaktaki mikrobiyal florada metabolize olarak östrojenik etki gösterebilen enterodiol ve enterolaktone dönüştürülür (129,130). Yüksek miktarda lignan ön maddesi içeren gıdalara örnek olarak keten tohumu, tam buğday tanesi, bazı sebze meyveler ve çay verilebilir (119).

Lignanlar bitkilerin hücre duvarlarındaki ligninleri oluşturan maddelerden biri olduğu için birçok bitkide düşük konsantrasyonda bulunurlar. Tek başına bir bitkinin içerdiği lignan miktarı az olsa da, yüksek oranda bitkisel gıdalar içeren diyetlerde fitoöstrojenlerin alınması yönünden önemlidirler. Batı kültüründe üzüm suyu gıdaların, tam tahıllı ürünlerin ve bunlardan üretilen gıda maddelerinin yaygın olmalarından dolayı dikkat çekicidirler. İzoflavon alımları düşük düzeyde olan batı toplumlarında lignanların, fitoöstrojen alımı açısından izoflavonlardan daha önemli bir kaynak haline gelebildiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (131,132).

Enterolignanlar endojen östrojenlerle yapısal olarak benzerlik gösterirler. Zayıf östrojenik ve antiöstrojenik etkiler, antitümörojenik ve antioksidan etkiler gösterme potansiyelleri vardır (133–135). Plazma ve idrarda bulunan enterolignan değerleri, lignan oranı yüksek olan diyetin etkisiyle belirgin düzeyde artmaktadır (136,137).

○ **Komestanlar**

Komestanlar, sayıca fazla olmalarına rağmen bunlardan çok azı östrojenik aktivite gösterir ve fitoöstrojenik bileşikler arasında yer alır. Bu grubun en önemli bileşiği komestroldür (108). Komestrol Bickoff ve arkadaşlarının 1957 yılında yaptıkları araştırmadan sonra yeni bir fitoöstrojen olarak tanımlanmıştır (138). Komestrolün östrojenik etkisi diğer tüm fitoöstrojenlerden daha fazladır. Endojen östradiolden 10-20 kat daha az etkili olan komestrol, izoflavonların 30-100 katı daha fazla östrojenik etkiye sahiptir. Komestroller genel olarak kurubaklagillerde bulunur. Bununla beraber düşük düzeylerde ıspanakta ve brüksel lahanasında da varlığı gösterilmiştir (122).

○ **Stilbenler**

Stilbenler genel olarak kırmızı şarapta ve yer fıstığında bulunur. Kırmızı şarapta bulunan stilben türü resveratroldür. Resveratrol üzümün kabuk kısmındandır ve sululu bölümünde bulunmaz. Uzun süre fermente edildiğinde son ürün daha çok trans-resveratrol içermektedir (103). Resveratrol, fizyolojik ve farmakolojik olarak yararlı

etkilere sahiptir. Vücutta antioksidan etki göstermesi, nitrik asit üretimini arttırması, trombosit kümelenmesini önlemesi ve yüksek densiteli lipoprotein (HDL) seviyelerini arttırması gibi özelliklerinden dolayı kalp sağlığı üzerine olumlu etkiler yarattığı düşünülmektedir (120).

2.2.3. Fitoöstrojenlerin doku ve sistemler üzerine etkileri

Fitoöstrojenlerin kemik dokusu üzerine etkileri

Östrojen hormonu, kemik dokusunun oluşumu ve mineralizasyonu ile ilgili süreçlerde önemli fonksiyonlar üstlenerek kemik yoğunluğunun korunmasında aktif olarak görev almaktadır. Postmenopozal dönemde vücuttaki östrojen seviyesinin düşmesi sonucu kemikteki kalsiyumun kana geçişinin artması ile osteoporoz görülür (103). Hormon replasman tedavisinin amaçlarından biri menopoz sonrasında karşılaşılan osteoporoz tablosunun görülmesini önlemek ya da etkilerini azaltmaktır. Ancak bazı çalışmalarda kemiğin mineral yoğunluğunun korunmasında fitoöstrojen kullanımının hormon tedavisinden daha etkili olabileceği ileri sürülmektedir (104,139). Fitoöstrojenlerin kemik dokusunda bulunan östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenin etkilerini taklit ettiği ve bu mekanizmanın postmenopozal dönemde görülen kemik yoğunluktaki azalmayı önlediği bildirilmiştir (140,141).

Postmenopozal dönemdeki kadınların femoral eklemlerindeki kemik mineral yoğunluğunun değerlendirildiği çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada soyadan elde edilen 54 mg genisteinin 12 ay süreyle verilmesini takiben yapılan ölçümlerde kemik yoğunluğunun arttığı bildirilmiştir (142).

Yine bir çift kör, plasebo kontrollü çalışmada 66 postmenopozal kadına 6 ay süreyle 90 mg izoflavon verilmiş ve omurilik kemik mineral yoğunluklarının başlangıçta ölçülen seviyelerden % 2.2 daha yüksek olduğu gösterilmiştir (103,122).

Yapılan randomize-prospektif bir çalışmada 66 kadın hastada günlük 88 mg izoflavonun iskelet sistemi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Uygulamanın koruyucu etkisi olduğu ve bel kemiğinde mineral yoğunluğunu artırdığı bildirilmiştir (143).

Hastalar üzerinde yapılan çalışmalar, başta izoflavonlar olmak üzere fitoöstrojenlerin östrojen reseptörleri aracılığı ile osteoblast ve osteoklastlar üzerine kemik yoğunluğunun korunması yönünde etkileri olduğunu göstermektedir. Ayrıca

ipriflavonun'un (sentetik izoflavon) kemik yoğunluğunun korunması amacıyla pratikte kullanılıyor olması, fitoöstrojenlerin de bu amaçla kullanılabilmesi yönünde beklenti oluşturmaktadır (109).

Başka bir çalışmada menopoz sonrası dönemde içerisinde 45 gr soya bulunan ekmek tüketen kadınların kemik mineral yoğunluğunun buğday ekmeği tüketen gruba göre önemli oranda arttığı gösterilmiştir (111).

Diğer yandan, 202 postmenopozal kadının dahil edildiği geniş çaplı bir araştırmada 12 gün boyunca günde 99 mg izoflavon takviyesi (52 mg genistein, 41 mg daidzein ve 6 mg glycitein) yapılmış ancak olumlu bir etki gözlenmemiştir (144). Bu çift kör randomize çalışmada, izoflavon takviyesinin sağlıklı 60 yaş ve üstü postmenopozal kadınlarda kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı yönündeki hipotez desteklenmemektedir. Bu verilerle izoflavonların klinik olarak kemik sağlığını olumlu yönde etkilediğini söylemek mümkün değildir. Yapılan randomize kontrollü çalışmada fitoöstrojenler osteoporoz veya kemik kırıklarının önlenmesinde kullanılabilir nitelikte bulunmamıştır (145).

Fitoöstrojenlerin kemik mineral yoğunluğuna olan etkileri birçok araştırmada değerlendirilmiş ve bazı araştırmacılar, yüksek oranda izoflavon ve komestrol içeren diyetin kemik sağlığını koruyucu yönde etkilediğini belirtmişlerdir (143,146–150).

Fitoöstrojenlerin diğer dokular ve sistemler üzerine etkileri

Fitoöstrojenlerin kalp ve damar sağlığı üzerine etkileri: Östrojenin damarsal dokular üzerinde östrojen reseptörleri aracılığı ile direkt etkisi, lipoprotein profilini değiştirmesiyle de dolaylı etkisi görülmektedir. Fitoöstrojenlerin de endojen östrojeni taklit ederek bu etkilere benzer etkiler gösterdiği bildirilmiştir (103). Yapılan çalışmalar, soya veya soya ürünlerinin, izoflavonların ve keten tohumunun total kolesterolü ve düşük densiteli lipoprotein (LDL) düzeylerini düşürdüğü, yüksek densiteli lipoproteini (HDL) ise yükselttiğini göstermiştir (103). Batı toplumunda, kalp damar hastalığı görülme sıklığının Asyalı toplumlara göre daha yüksek olması, Asyalıların batılılardan daha fazla soya tüketmesiyle ilişkilendirilmektedir. Amerikan ile Japon toplumlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada 40-69 yaş arası Japon erkek ve kadınlarda kalp damar hastalığı görülme oranının sırasıyla 6-8 kat daha düşük olduğu belirtilmiştir (120). Fitoöstrojenler lipid profilini düzenleyerek (151,152), LDL oksidasyonunu önleyerek (153) ve endotel fonksiyonlarını geliştirerek (154) kalp damar hastalıklarına karşı

koruyucu etki göstermektedir. Birleşmiş Milletler Besin ve İlaç Örgütü kolesterol ve doymuş yağ oranı düşürülmüş bir diyetle birlikte 25 gr/gün soya proteini tüketilmesinin kalp sağlığının korunmasında etkili olabileceğini kabul etmiştir (155). Endojen östrojen düzeyinin arterlerin elastikiyeti üzerine de etkisi olduğu düşünülmektedir ve kalp damar hastalıkları için bu durum önemli bir risk faktörüdür. Çünkü östrojenin, düz kas hücreleri ve endoteller üzerine olan etkileri arter elastikiyetini değiştirebilmektedir (156). ER- α ve ER- β 'nın da arter duvarlarındaki varlığı gösterilmiştir (157). Fitoöstrojenlerin de endojen östrojenlere benzer etkiler göstererek arter duvarlarındaki östrojen reseptörleri üzerinden arter elastikiyetinin ayarlanmasında etkisi olabileceği düşünülmektedir (153,158).

Fitoöstrojenlerin kanser üzerine etkileri: Yüksek oranda izoflavon içeren gıdalarla beslenen insanlarda meme, kolon ve prostat kanseri görülme sıklığının daha düşük olduğu bildirilmiştir (103). Tümöral hücrelerin proliferasyonunun baskılanmasında, dolayısıyla meme kanseri riskinin azalmasında genistein, daidzein ve metabolitlerinin etkili olduğu düşünülmektedir (103,159). Genisteinin kanserli dokuların damarlanmasını önleyerek tümör gelişimini baskıladığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Yüksek miktarda izoflavon içeren diyetle beslenen erkeklerde prostat kanserinin daha az görüldüğü ve izoflavonların prostat kanser hücrelerinin büyümesini büyük oranda engellediği bildirilmiştir (119).

Epidemiyolojik çalışmalarda, Batılı toplumlarda insidansı gün geçtikçe artan göğüs kanserinin, Asya toplumlarındaki görülme sıklığının BM ortalamasının dörtte biri kadar olduğu bildirilmiştir. Bu durumun beslenme şekillerinden kaynaklanabileceği ve fitoöstrojenlerin göğüs kanserine karşı koruyucu olabileceği düşünülmüştür (108,160–162).

Üzerinde fitoöstrojenlerin etkilerinin en çok araştırıldığı kanser türü göğüs kanseridir. Çalışmaların bir kısmında fitoöstrojenlerin göğüs kanseri oluşumunu azalttığı bildirilirken, bir kısmında ise bu bileşiklerin göğüs kanseri riskini arttırdığı bildirilmektedir (111).

Çalışmalarda fitoöstrojenlerin hormona bağlı göğüs, prostat, endometrium gibi kanser türlerinin yanında pankreas ve rektum gibi diğer kanser türlerine karşı da koruyucu olabileceği gösterilmektedir (107,163,164). Bazı çalışmalarda fitoöstrojenlerin mide ve kolon kanserlerine karşı da koruyucu etkileri olabileceğini gösteren sonuçlar elde edilmesine rağmen bu sınırlı sayıdaki veriler kesin bir sonuca ulaşmak için yeterli değildir (111,115).

Fitoöstrojenlerin menopozal semptomlar üzerine etkileri: Menopoz mensturasyonun bitişi olarak kabul edilir ve bu dönemde kadınlarda hormonal, fizyolojik ve psikolojik değişiklikler görülmektedir. Vücuttaki östrojen düzeyinin azalması menopoz dönemindeki birçok semptomatik durumdan sorumlu tutulmaktadır (104). Yapılan bir çalışmada fitoöstrojenlerin vazomotor semptomların (sıcak basması, uyku düzeninin bozulması, gece terlemesi, baygınlık, uykusuzluk, depresyon ve sinirlilik gibi) azaltılmasında etkili olabileceği yönünde sonuçlar alınmıştır (104). Epidemiyolojik çalışmalar, menopozun ilk dönemlerinde görülen bu semptomların Asya toplumlarında Batı toplumlarına göre çok daha nadir karşılaşıldığını göstermektedir. Bir çalışmada Batılı kadınlarda sıcak basması şikayeti görülme oranının %60 olduğu, Asyalı kadınlarda ise bu oranın sadece %10,5 olduğu bildirilmiştir (118). Başka bir çalışmada, menopoz sonrası dönemde soya protein izolatu alan kadınlarda sıcak basması şikayetlerinin %45 oranında azaldığı bildirilmiştir (165). Yapılan çalışmalardan, fitoöstrojen takviyelerinin bazı menopoz döneminde ya da postmenopozal dönemdeki kadınların semptomlarında hafifleme sağladığı anlaşılmaktadır; ancak hangi dozda ve formülasyonda kullanılması konusunda görüş birliğine ulaşmak henüz mümkün değildir (111).

Bunların dışında fitoöstrojenlerin; obezite, diyabet ve böbrek hastalıkları gibi rahatsızlıkların ve bilişsel yetenek kaybı durumlarının önlenmesinde de faydaları olabileceği düşünülmekte ve bu konularla ilgili yeni çalışmalar da yapılmaya devam etmektedir (107,163).

Yan etkiler:

Fitoöstrojenlerin ve fitoöstrojen içeren gıdaların tüketimi ile ilgili bazı tedirginlikler de bulunmaktadır. Bunların başında bu maddelerin kısırlık oluşturabileceği ve meme kanseri oluşumunu tetikleyebileceği gelmektedir. Ayrıca soyadan elde edilen yenidoğan mamaları da yine kaygıyla karşılanmaktadır (111,166). Bazı yayınlarda da izoflavonların tiroid hastalıklarına neden olabilecekleri ileri sürülmüştür. Ancak bu kaygıları destekler nitelikte spesifik kanıtların bulunmadığı ve düzenli olarak yoğun miktarda fitoöstrojen içeren diyetle beslenen toplumlarda da bu tereddütlerin bir karşılığı olmadığı görülmektedir. Hayvan çalışmalarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde, insanlarda fitoöstrojen içerikli gıdalarla beslenme sonucu hastalık yapabilecek toksik dozların aşılmasının mümkün olmadığı anlaşılmaktadır (111,166). Ayrıca bugüne kadar hiçbir ülkede fitoöstrojen toksisitesi vakası rapor edilmemiştir. Ancak, konsantre

fitoöstrojen içeren gıda takviyelerinin yüksek dozlarda ya da uzun dönem kullanımının nasıl sonuçlanabileceği henüz bilinmemektedir (111).

Fitoöstrojenlerin metabolizma üzerine etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir ve bu maddelerin genel kullanımının tavsiye edilebilmesi için verilerin daha çok çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir (104).

2.3. KEMİK GREFTLERİ

Genellikle defektlerin rekonstrüksiyonu amacıyla biyolojik ortamlara yerleştirilen ve uygulandığı dokuyla uyum içinde olacak şekilde hazırlanan gelişmiş materyallere biyomateryal denir. Biyomateryal denildiğinde çeşitli nedenlerle kaybedilmiş ya da deforme olmuş organ veya dokuların onarımında ve fonksiyonlarının yerine konmasında kullanılan doğal ve yapay tüm materyaller anlaşılır (167–172).

İskelet sisteminin diğer bölgelerinde olduğu gibi oral ve maksillofasiyal bölgenin kemiksel yapılarında da gerek atrofik maksilla ve mandibulanın rekonstrüksiyonunda gerekse konjenital, travmatik, dejeneratif, enflamatuvar, enfeksiyöz, kistik ve neoplastik orijinli deformitelerin giderilmesinde kemik greftlerine gereksinim duyulmaktadır. Günümüzde bu amaçla otojenik, allojenik ve alloplastik kemik greft materyalleri kullanılmaktadır (173–177).

2.3.1. Kemik greftlerinin işlevleri

2.3.1.1. Osteogenezis

Bir materyalin doğrudan osteoblastlar ile yeni kemik yapabilme yeteneğidir. Osteogeneziste kemik grefti olarak kullanılan materyaller, osteoblast hücrelerinden direkt olarak yeni kemik oluşturma potansiyeline sahip öncül hücreler ve organik materyaller içerir. Osteogenezisi gerçekleştiren kemik grefti materyalleri canlı kemik hücrelerinin bir birleşimidir. Bu sebeple osteogenetik olmayan ortamlarda bile, bu tür organik materyaller kemik oluşturma (osteogenez) yeteneğine sahiptir (170,178–180).

2.3.1.2. Osteoindüksiyon

Greft uygulanan dokuda kemik büyümesinin stimülasyonu farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerinin osteoblast veya kondroblastlara dönüşümü ile gerçekleşir. Kemik allogrefti değişik genetik yapıya sahip, farklı insanlardan alınan kemik dokularından elde edilir (170,180–182).

2.3.1.3. Osteokondüksiyon

Komşu kemik bölgesinden kemik apozisyonu ve hücre göçü ile kemik oluşumunun sağlanmasıdır. Osteokondüktif materyaller ektopik bölgelerde kemik oluşumunu gerçekleştiremezler. Bu nedenle; osteokondüksiyon, farklılaşmamış mezenkimal hücre veya doğrudan kemik varlığında gerçekleşebilir (170,180).

Greft materyallerinin içinde bulundukları doku ya da organ ile ilişkileri:

a) Biyokompatibilite: Kullanılan materyalin alıcı bölgede çevre dokularına uyum sağlayabilmesi gereklidir. Biokompatibilite greftin biyolojik olarak uygulandığı bölgedeki uyumluluğu ve ilgili dokuya ait kaybedilmiş fonksiyonları yeniden sağlayabilme özelliğidir (170,179,183,184).

b) Biyofonksiyonalite: Yerleştirildikleri ortamda fonksiyon sırasında, materyalin karşılaştığı kuvvetler karşısında değişime uğramamasıdır. Aksi takdirde materyalin biyofonksiyonalite yönünden yetersiz olduğu düşünülebilir (170,179,183,184).

2.3.2. Kemik greftlerinin sınıflandırılması

Günümüzde diş hekimliğinde kullanılan kemik grefti materyalleri insan kemik dokusu kaynaklı olan ve olmayan kemik greftleri olarak iki ana grup altında incelenebilir (185). İnsan kaynaklı olanlar otojen ve allojen greftler, insan kaynaklı olmayanlar da ksenojen ve alloplastik greftler olarak adlandırılır.

2.3.2.1. Otojen greftler

Otojen greft, kişinin kendi vücudundan alınan canlı kemik dokusunun yine kendi vücudunda gerekli bölgeye nakledilmesidir. Diğer bir anlatımla hem donörün hem de alıcının aynı birey olmasıdır (186). Osteojenik etkiye sahip tek greft çeşididir. Otojen greftler ogmentasyon uygulamalarında altın standart olarak kabul görmektedir ve çok uzun zamandır klinik uygulamalarda kullanılmaya devam edilmektedir. Otojen kemik kullanılarak yapılan bir ogmentasyon işleminde kemiğin iyileşmesi osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon yollarıyla gerçekleşir.

Diğer taraftan otojen greftlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır, bu dezavantajlar;

- Greftin elde edilebilmesi için hastaya ikinci bir cerrahi uygulama yapılması gerekliliği,
- Verici bölgede, morbidite ve enfeksiyon riski oluşturan başka bir kemik defekti oluşması,
- Genellikle iliak kemik vb. ağız dışı greftlerin ağız içi bölgeye taşındığında ileri derecede rezorpsiyonlarla karşılaşılma sıklığının fazla olması,
- Ağız içi verici bölgelerden elde edilebilecek greft materyalinin kısıtlı olması,
- Çene ucu bölgelerinden alınan greftlerde, kök ucu ve duyu sinirlerinin yaralanması risklerinin varlığı şeklinde örneklendirilebilir (187–189).

Otojen kemik greftleri kortikal, kansellöz ve kortiko-kansellöz olmak üzere 3 farklı yapıda elde edilebilir.

Kortikal greftler:

Kortikal greftler lameller kemiklerden alınan rijit yapıda kemik parçalarıdır. Kortikal greftler kullanıldığında transfer edilen ana hücre tipi osteositlerdir. Genellikle kranial bölge, kaburga ve iliak kemiğin ön bölgesinden temin edilirler. Bu greftler uygulandığı bölgede sert ve dayanıklı bir yapı oluşturabilmelerine rağmen osteogenezi artırma potansiyeli çok sınırlıdır. Defektin tamamının onarılmasını sağlayamazlar, canlı ve nekroze kemiğin birlikte bulunduğu bir yapı olarak kalırlar (190).

Kansellöz greftler:

İçerisinde trabeküler kemik ve kemik iliği bulunan otojen greft çeşididir. Kansellöz kemik greftlerinin kemik oluşumunu indüklemeye potansiyelinin yüksek olması yanında en önemli avantajı içerisinde bulunan kemik iliğinde osteoblastlara farklılaşabilecek canlı hücrelere sahip olmalarıdır. Bu greftlerin dezavantajı da yeterli mekanik sağlamlığa sahip olmamalarıdır (190).

Kortiko-kansellöz greftler:

Bu greftler hem lameller kemiği hem de iç kısmında bulunan spongiöz kemiği içerir. Son zamanlarda pratik kullanımda daha çok bu tip otojen greftler tercih edilmektedir. Ancak bu greft tipi her iki kemik tipinin avantaj sağlayan özelliklerini aynı düzeyde kombine edememektedir.

Bu greftler bir miktar osteogenezise katkı sağlamalarıyla kortikal greftlerden ayrılmaktadır. En önemli avantajları ise osteojeniteye katkıda bulunurken mekanik sağlamlıklarının da olmasıdır (191).

Ogmentasyon işlemleri için otojen kemik greftlerinin temin edilebileceği farklı ağız içi ve ağız dışı verici bölgeler mevcuttur. Graftın alınacağı bölge seçilirken; alıcı bölgenin lokalizasyonunun, hangi hacimde ve kalitede kemiğe ihtiyaç olduğunun ve meydana gelebilecek cerrahi komplikasyonların değerlendirilmesi gerekmektedir (192).

Ağız içindeki verici bölgeler; maksillada tüber bölgesi, mandibulada ise çene ucu ve ramus bölgeleridir. Egzostozlar ve kemik çıkıntıları da greft materyali almak için uygun bölgelerdir. Bu kaynaklardan elde edilen yoğun yapıdaki kemik greftleri ufalanarak ve parçalanarak partiküllü grefte dönüştürülerek kullanılmaktadır. Kemik toplamak için özel olarak tasarlanmış cihazlarla da otojen kemik elde edilebilir (193). Bazı durumlarda ağız içi bölgelerden elde edilen otojen greftler hacmen yetersiz kalabilmektedir.

Ağız dışı verici bölgelere ağız içinden elde edilebilecek hacimden daha fazlasına ihtiyaç duyulduğunda en sık tercih edilen iliak kemik örnek verilebilir, ayrıca kaburga ve tibia da kullanılabilir. Ekstraoral bölgeden otojen greft alınması; ağız dışında ikinci bir cerrahi operasyona ihtiyaç duyulması, genel anestezi ihtiyacı, verici bölge morbiditesi, fonksiyon kaybı, uzun iyileşme süresi ve tedavi maliyetinin artması gibi bir çok dezavantajı beraberinde getirmektedir (194).

Sonuç olarak otojen greftler ogmentasyon işlemlerinde genellikle tercih edilen greftlerdir. Fakat, oluşacak rezorpsiyonun süresinin ve miktarının belirsizliği, greft alınabilecek uygun bir bölgenin her zaman bulunamaması otojen greftlerin tek başına kullanılmasını sınırlandırmaktadır (195).

2.3.2.2. Allogreftler

Aynı türden olan ancak genetik olarak alıcıyla benzerlik göstermeyen greft materyalleri allogreftler olarak adlandırılmaktadır. Farklı kadavralardan bir takım işlemler sonucu elde edilen kemik allogreftleri daha sonra kemik bankalarında saklanır (196).

Allogreftler, ikinci dünya savaşı dönemine kadar immünolojik reaksiyon potansiyellerinden dolayı çok kullanılmamıştır. Savaş şartlarının ihtiyacı arttırmasıyla kemik bankalarında saklanabilmesi için çeşitli teknikler üzerinde çalışılmıştır (170). Bu greftlerin immünolojik komplikasyon potansiyellerini ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilen son teknikler greftlerin dondurulması, dondurulması ve kurutulması gibi metodlar ya da radyasyona tabi tutulmasıdır. Kemik kaynaklı biyomateryallerin vericiden alıcıya nakli sırasında alıcıya geçebilecek CJD (Creutzfeldt-Jakob hastalığı), AIDS (Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu), ve hepatit gibi önemli virütik hastalıklar vardır (170,197).

Taze dondurulmuş kemik allogreftleri

Taze dondurulmuş kemik greftinin maksillofasiyal bölgede kullanım alanları sınırlıdır. Bu greftler genellikle ortopedik onarım için kullanılır. Steril ortamda vericinin ölümünü takip eden 12 saat içerisinde alınan allogreftler bir takım mikrobiyal çalışmalar yapılarak kemik iliği kültüründe bekletilir. Allogreftin hazırlanmasında ilk aşama, greftin üzerini kaplayan yumuşak dokunun kaldırılarak yapışık dokuların ayrılmasıdır. Yapışık olan kapsüller kesilerek birbirinden ayrılır. Bu proses kapsül içi yolların donmasına sebep olur. Dondurma işlemi sırasında fizyolojik olarak gerçekleşen kanama dokuların hasar görmesine ve hücre ölümüne neden olur. Dokuların soğutma ajanlarına maruziyeti ve donma oranının takibi kontrollü bir şekilde gerçekleştirilir (170).

Dondurulmuş-kurutulmuş kemik allogreftleri

Çene yüz bölgesinin onarımında 1950'lerden beri kullanılmakta olan allogreftlerdir. Kemik dokusu -76°C 'de dondurulur. Dondurma işlemi yapıldıktan sonra kurutma işlemleri yapılır ve ısı arttırılır. Böylece su molekülleri ortamdan uzaklaştırılmış olur. Daha sonra iki hafta süreyle dehidrasyon işlemi için beklenir. Mikrobiyolojik örnekler alınır ve iki aşamada toplanır. Dondurma prosesinden önce ve sonra alınan örnekler, steril koşullarda saklanır. Bu işlemlerle elde edilen allogreftin

revaskularizasyonu yavaştır ve rezorpsiyon görülme ihtimali otojen greftlere göre daha fazladır. Revaskularizasyon süreci uzun süren akut inflamasyon cevabı ile başlar, daha sonra alıcı sahada kronik inflamasyon görülür. Bu inflamasyonlu durum birkaç ay sürer. Bu sırada ortamda fibröz doku gelişim gösterebilir ve greft bu doku tarafından kapsülle çevrilebilir. Bu inflamasyon süreci değişkenlik gösterebilir, aylarca sürebileceği gibi erkenden de son bulabilir. Bazı durumlarda revaskularizasyon 8 ayda tamamlanamaz ve revaskularize olamayan kemik cepleriyle karşılaşılabilir. Periferde osteodepozisyon sonucu oluşan mineralizasyon, kortikal kemikten elde edilen otojen greftler ile benzer mekanizmada olmakla birlikte daha az ve yavaş ilerlemektedir. Dondurulmuş kemik grefti işlemlerinde hücrel immunolojik yanıtla karşılaşılır (170,197). Dondurulmuş homojen kuru kemik grefti osteokondüktif özellik gösterir (198). Çene cerrahisi uygulamalarında sadece kronik fistüllerin tedavisinde ve oluşan alveoler defektlerde endikedir ve hastalık geçişi riski oldukça azdır (170,198).

Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleri

İnorganik kemik matikisi içerisindeki kemik oluşumunu uyaran proteinler kemiğin hidroklorik asit ile demineralizasyonu ile açığa çıkartılır. Bu proteinlerin tamamı “kemik morfogenetik protein” (Bone Morphogenetic Protein - BMP) olarak isimlendirilebilir (10,198). Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftlerinin (DDKKA) mineralizasyon ve vaskularizasyon süreçleri ile ilgili tartışmalar mevcuttur. Bazı yazarlara göre bu tür greftlerin iyileşme süreçlerinde osteoindüksiyonun ön plandadır. Bu süreç, DDKKA’lerin yerleştirildiği alandaki kemik dokusundan kaynağını alan pluripotent hücreleri kapsar. Çevre kemikten greft içerisine gelen bu hücreler osteoblastlara diferansiye olurlar. Zaman içinde greft alıcı kemikten gelen hücrelerce rezorbe edilir ve burada gerçekleşen yıkım olaylarının BMP ve büyük olasılıkla DDKKA içinde bulunan diğer büyüme faktörlerinin etkisiyle uyarıldığı yönünde görüşler vardır. Diğer taraftan bazı yazarlar DDKKA’in iyileşme sürecinin osteoindüksiyonla gerçekleştiği görüşüne katılmamaktadır. DDKKA’ler kolay elde edilebilirliği, güvenilir olmaları ve varlığı tartışmalı olsa da sahip oldukları iddia edilen osteoindüksiyon özelliği sebebiyle en fazla kullanılan allogreftlerdir. Kortikal kemiklerden elde edilen allogreftler kansellöz kısımdan elde edilenlere oranla çok daha az antijenik özellik gösterirler. Aynı zamanda içerdikleri BMP oranı kansellöz kemikten elde edilenlerden daha yüksektir. Bu bilgilere dayanarak DDKKA’lerden elde edilecek greftlerin kortikal kemiklerden

sağlanması daha uygun olduğu sonucuna varılabilir. Allogreft kullanımı hastalık geçişi açısından risk teşkil etmektedir. Doku bankalarında kullanılacak kadavralar HIV antikor ve antijeni varlığı bakımından incelenmekte ve lenf bezlerinden biyopsi alınmaktadır. Hidroklorik asit ile yapılan demineralizasyon işlemi kemik matriksindeki tüm mikroorganizmalarla birlikte HIV’i de yok etmekte etkilidir ancak yine de 8 milyonda 1 ihtimalle allogreft içerisinde HIV bulunma ihtimali vardır.

DDKKA’ lerinin standardizasyonu zordur. Bu nedenle greftlerin kullanımından alınan sonuçlar farklılık gösterebilir. Ticari amaçla üretilen her bir greftin içerdiği BMP miktarı veya greftin osteoindüksiyon kapasitesi belirlenmemektedir. Greftin kalitesi; üretiminde kullanılan kadavranın cinsiyeti, yaşı, genetik özellikleri, geçirdiği hastalıklar, kullandığı ilaçlar, ölümünün üzerinden geçen zaman, hangi koşullarda bekletildiği ve doku bankasının allogreft üretim protokolleri gibi bir çok faktörden etkilenmektedir. Alınan greftler minimum 2µg/40mg yaş kemik ağırlığı BMP içermelidir. Optimum 10µg/40 mg yaş kemik ağırlığı olması istenmektedir (197).

Oral cerrahi girişimlerde kullanılmak üzere farklı boyutlarda ve şekillerde allogreftler üretilmiştir. İliak kemikten elde edilen kansellöz allogreftler, 2 ila 10 mm çapında parçacıklara ayrılarak kemik içi defektlerde kullanılacak hale getirilirler. Küçük kansellöz allogreft parçacıkları; alveol defekti düzeltmeleri, periapikal bölgelerdeki lezyonların çıkartılmasıyla oluşan kaviterlerin doldurulması ve küretaj sonrasında açılal defektlerin tedavisinde kullanılmaktadır (196).

2.3.2.3. Ksenogreftler

Ksenogreftler alıcıdan farklı tür canlılardan elde edilen greft türleridir. Bu greftlerin elde edilmesinde genellikle memeli hayvan kemikleri kullanılmaktadır. Ayrıca mercan kabukları da ksenogreft üretimi için kullanılabilir. Domuz, at veya sığır kemikleri de tercih edilebilir ancak en çok sığır kemikleri kullanılmaktadır (199).

Ksenogreftler, genellikle sığır kemiklerine uygulanan deproteinizasyon işlemi ile elde edilirler. Greft üretiminde kullanılacak olan kemik tüm organik bileşenlerinden arındırılır. Geriye poröz yapıda inorganik hidroksiapatit kalır ve yapısı insan spongiöz kemiği ile benzerlik gösterir. Alıcı doku tarafından tolere edilebilirlikleri iyidir. Osteokondüksiyon özelliği iyileşmeye katkı gösterir (185).

Allogreft ve ksenogreftlerin en önemli avantajlarından biri, otojen kemik ile birlikte ogmentasyonda kullanılabilmeleridir, böylece kemik arttırımı için ihtiyaç duyulan otojen kemik greft miktarı azaltılabilir (199).

Yapılan çalışmalarda, ksenogreftlerin yapısının sentetik hidroksiapatitlerden daha karmaşık olmasına rağmen, alloplastlara oranla biyouyumluluklarının daha iyi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda ksenogreftlerin sahip oldukları yüzey özellikleri ve materyalin poröz yapısı osteointegrasyon açısından alloplastlardan daha başarılı olmalarını sağlamaktadır. Mekanik özellikleri hem kortikal hem de spongiöz kemikle benzerlik gösterir. Ayrıca rezorpsiyon paternleri süre ve kalan greft materyali açısından sentetik hidroksiapatitlerden daha iyidir (185,200–202).

2.3.2.4. Alloplastlar

Alloplastik kemik greftleri, sentetik olarak üretilen kemik rejenerasyon materyalleridir (203). Yeni oluşacak kemik için iskelet görevi görmektedirler. Defekti tamamen dolduracak şekilde yönlendirilerek kullanılırlar. Biyouyumluluğu yüksek olan bu materyaller aynı zamanda belli oranda osteokondüksiyon özelliğine sahiptir (5).

Allogreftlerin oluşturabileceği yan etkilerden kaçınmak amacıyla yaklaşık 20-25 yıldan bu yana alloplastlar sıklıkla kullanılmaktadır. Rezorbe olan, rezorbe olmayan, mikropöröz (<350 µm), makropöröz (>350 µm) veya pöröz olmayan yapıda olabilirler. Alloplastların avantajları; kolay elde edilebilir olmaları, steril edilebilir ve saklanabilir olmaları, enfeksiyon riski taşımamaları ve biyouyumlu olmaları olarak sıralanabilir.

Alloplastlar; kompozit polimerler, biyoseramikler, kalsiyum karbonat ve kalsiyum sülfat olmak üzere dört grup altında incelenebilir (5).

- **Kompozit polimerler**

Rezorbe olan kompozit polimerler: Polilaktik veya poliglikolik asitten oluşan ürünler fiksasyon vidaları, kemik vidaları ve sütür materyalleri olarak uzun zamandır kullanımdadır. Yüksek molekül ağırlığına sahip bu materyallerin biyolojik degradasyonu yaklaşık 3 yıl sürmektedir. Polimerlerin yıkım süreci hastanın yaşı, bağışıklık sisteminin durumu, defektin lokalizasyonu, dokunun toleransı gibi bir çok faktörden etkilenmektedir (203).

Son yıllarda düşük dansiteli polilaktik ve poliglikolik asit kopolimerlerinin üretilmesiyle degradasyon zamanı 3-4 ay ile 6-8 ay arasında olan greftler üretilmiştir. Bu greftlerin toz formunda olanları üç duvarlı kemik defektleri için, sünger formunda olanları ise iki duvarlı veya üç duvarlı kemik defektleri için kullanılabilir. Jel formu, enjeksiyon yoluyla büyük defektlerde kullanılmaktadır (5,203).

Rezorbe olmayan kompozit polimerler: Polimetil metakrilat ve polihidroksietil metakrilat moleküllerinin karıştırılması ile meydana gelen polimerlerdir. İçeriğine baryum sülfat ilave edilerek radyoopak olması sağlanır. Greftin uygulanmasından sonra yönlendirilmiş kemik rejenrasyonu membranları kullanılarak daha olumlu sonuçlar elde edilebilir ancak bu materyal yapısı gereği membran kullanılmadığında da membran işlevi görmektedir (203).

- **Biyoseramikler**

Sentetik hidroksiapatit: Hidroksiapatitler $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, kemiklerin inorganik doğal komponentleridir. Mine'nin %98'i, kortikal kemiğin %65'e yakın bir kısmı hidroksiapatitten meydana gelir. Biyouyumluluğu yüksek bir materyaldir. Hem yumuşak hem de sert dokulara adezyonu iyidir. Geniş partikül yapısına sahip olanlarının rezorpsiyon süresi uzun olduğu için rezorbe olmayan greftler arasında yer almaktadır. Materyalin kristal yapısı rezorpsiyon sürecine etki eder. Küçük boyutlu kristal hidroksiapatit ve amorf hidroksiapatitlerin yıkımı çok hızlı gerçekleşir. Ayrıca greftin porözitesi, grefte olan kan geçişini ve damar infiltrasyonu etkiler. Greftin yapısında bulunan 250-350 μm 'lik porlar kemiğin oluşumu için ideal olarak kabul edilir. Ancak porözitenin artmasıyla dayanıklılığın azalması önemli bir dezavantajdır (204).

Trikalsiyum fosfat (TCP): TCP, hidroksiapatitin kimyasal yapısına benzerlik gösterse de doğal kemiğe kimyasal olarak benzememektedir. Ca/P oranı 3'e 2'dir. Materyalin kimyasal yapısına göre rezorpsiyon hızı farklılık gösterir (205). Trikalsiyum fosfatın sinterizasyon sıcaklığındaki değişiklikler materyalin α ve β olarak isimlendirilen farklı kristal fazlarının oluşumuna sebep olur. Sinterleme 900°C'lik sıcaklıkta yapıldığında β -TCP oluşurken daha yüksek (1180°C'den fazla) sıcaklıkta yapıldığında α -TCP oluşur. α veya β terimleri, trikalsiyum fosfat kristallerinin farklı partikül yönlerini ifade eder. β -TCP doku içerisinde tamamen rezorpsiyona uğrar ve ortalama 10 ay sonra yerini tamamen doğal kemik doldurur. α -TCP'nin ise rezorpsiyonu çok yavaştır ve yıllar sonra hala dokuda gözlenebilir.

Trikalsiyum fosfat, uygulanan bölgede yeni kemik oluşumu için destek bir yapı oluşturur. β -TCP'nin rezorpsiyonu kemiğin remodelasyonu ile eş zamanlı gerçekleştiği için defekt alanında kemik rejenerasyonunun tamamlanması beklenebilir. Otojen kemik greftleri veya allogreftler ile birlikte kullanılarak osteoindüktif etki artırılabilir, bunun yanında bu şekilde kombine kullanımının manipülasyonu kolaylaştırdığı bildirilmiştir (205).

Bioaktif cam: İlk kez 1970 yılında Dr. Larry Hach tarafından geliştirilen bioaktif cam greft materyalleri yapısında kalsiyum tuzları, sodyum tuzları, fosfat ve silikon bulundurmaktadır. Granülleri ortalama 300-355 μ m boyutundadır. Bioaktif cam zengin bir hidroksiapatit yüzey tabakasından oluşmaktadır. Bu apatit tabaka materyalin kemik ve yumuşak dokuya bağlanmasını sağlamaktadır (170). Yapılan bir çalışmada, bioaktif camların manipülasyonunun hidroksiapatit greft materyalinden daha kolay olduğu ve cam parçacıklarının komşu dokulara dağılma eğilimi göstermediği bildirilmiştir. Ayrıca cam parçacıklarının kana temas etmesiyle birbirine bağlı dağılmayan bir kitle oluşur (206,207).

- **Kalsiyum sülfat**

Kalsiyum sülfat biyokompatibil ve gözenekli bir sentetik greft materyalidir, aynı zamanda '*paris alçısı*' olarak da isimlendirilmektedir. Kalsiyum sülfat tuzu sıvı ile karıştığında alçı formuna ulaşır ve uygulaması kolay bir yapı elde edilir. Rezorpsiyonu 30 gün içerisinde oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşir. Defekt bölgesinde matriks görevini üstlenerek ve osteokondüksiyon etkisi ile kemik yapımına katkıda bulunur (5,208).

- **Kalsiyum karbonat**

Hızlı bir kemikleşme süreci sağlayan rezorpsiyonu yavaş alloplastik bir greft materyalidir. Hemostatik özellikleri iyidir ve tedavi bölgesinde pıhtının stabilizasyonunu sağlar. Uygulandığı alandan uzaklaştırılması zordur. Hassas yapıda olan bu greft materyali, iyileşme sürecinde üzerine yük geldiğinde hareket etme eğilimindedir (208).

2.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürü tanımı, canlı hücresel yapıların canlı organizma dışında yaşatılması, üretilmesi ve hücresel gelişimlerinin devam ettirilmesini tarif etmek için kullanılmaktadır. Canlı dokulardan elde edilen hücreler, vücut sıcaklıklarında ve vücuda özgü fizyolojik ortamın taklit edildiği besleyici sıvılarda kültüre edilerek çoğaltılmaktadır (209,210).

Hücre kültürü çalışmalarının olmazsa olmazı, ortamların steril halinin korunmasıdır. Yaşayan organizmadan alınmış hücre ya da organ örneklerinin enfeksiyonlardan korunma kabiliyetleri olmadığı için, hücre kültürü çalışmalarında kontaminasyonun önlenmesi son derece önemlidir. Çalışmalarda kullanılan özel ekipman ve malzemeler tecrübeli personeller tarafından kullanılmalıdır (209,210).

Hayvan ve insan hakları ile ilgili hassasiyetin son yıllardaki artışına paralel olarak hücre kültürü çalışmalarının önemi de artmıştır. Diş hekimliğinde ve bilimin birçok alanında hücre kültürü çalışmalarından faydalanılmaktadır (209,210).

2.4.1. Hücre kültürünün tarihçesi

Tarihte ilk hücre kültürü çalışmalarına 1800’lerde rastlanmaktadır. 1866 tarihinde ilk defa kan hücrelerinin *in vitro* doku kültür ortamında 35 gün boyunca canlı kalabilmesi sağlanmıştır. Wilhelm Roux 1885’te tarihte ilk eksplantasyon uygulaması olarak kabul edilen ılık tuz içerisinde tavuk embriyosunun medüller tabakasını elde etme deneyini yapmıştır. Yine aynı tarihlerde, Arnold kurbağalar üzerinde yaptığı çalışmalarda kemik iliği fragmanlarını başarılı bir şekilde implante etmiştir (211,212).

Yapıldığı dönemlere göre bu çalışmalar çok ileri düzeyde çalışmalardır. Ancak kesilerek çıkarılmış hayvan dokularının organizma dışında uygun şartlar sağlandığında yaşatılabileceği düşüncesi ancak Ljungren’in 1898 yılında insan derisinin düşük pH değerindeki sıvılarda *in vitro* ortamda yaşatılabileceğini ispat etmesiyle geçerlilik kazanabilmiştir (211,212).

Hücre bölünmesi ve yaşamı ile ilgili *in vitro* koşullardaki ilk detaylı incelemeler 1903 yılında Jolly tarafından yapılmıştır. Semenderden aşılı damlalar halinde bir ay boyunca lökosit elde etmeyi başarmıştır. Bu çalışmanın devamı olarak 1906’da Ewing ve Beebe’nin yaptığı çalışmalar ilk gerçek doku kültürü teşebbüsü olarak görülmektedir.

Günümüzde 30- 40 yıldır halen kullanılmakta olan tekniklerin temelini bu tür çalışmalar oluşturmaktadır (213).

1910-1914 tarihleri arasında organ, doku ve temel hücre kültürleri ile ilgili önemli aşamalar kaydedilmiştir. Bu tarihlerde aseptik ortamlarda çalışmalar yürütülmüş ve ilk kez 1914'te yapay doku kültürü yapılmıştır (211,212).

1920'lerde araştırmacılar hücre üretmek için kültür ortamları hazırlamaya çalışmışlardır. Fisher, bu dönemde standart hücre kültür ortamları hazırlamıştır (211,212).

1952 yılında ilk devamlı hücre kültürü insanın serviks karsinomasından elde edilmiştir (211,212).

1955-1960 yılları arasında Eagle bugün kullandığımız anlamda temel hücre kültürü vasatlarını hazırlamıştır ki bu hücre kültürü çalışmalarında önemli adımlardan birisi daha olmuştur (211,212).

1960'lı yıllarda hücre fizyonu deneyleri ile monoklonal antikor üretimine öncülük edilmiştir. Bunu takiben 1961 yılında somatik hücre hibridleri Barskib ve arkadaşları tarafından ilk kez *in vitro* koşullarda elde edilmiştir (211,212).

Green ve arkadaşları 1979 yılında epidermal hücre kültürleri hazırlamışlardır, 1980'li yıllarda endotelial hücrelerden kapiller damarların oluşturulmasına ve 1989 yılında hücre kültürü teknolojisi, homograft yapımında ve rekonstrüktif cerrahide kullanılmaya başlanmıştır. 1992'de Rosenfield ve Morgan ile ark. genetik olarak modifiye hücreleri hastalıkların tedavisinde kullanmaya başlamışlardır ki bu hücre kültürü teknolojisinin kullanıldığı en önemli uygulamalardan biri olmuştur (211,212).

2.4.2. Kültür tipleri

Canlı organizmadan alınan ve *in vitro* koşullarda yaşamını bir süre daha devam ettirebilme potansiyeli olan örneklerin kültüre edilme şekilleri üç grup altında incelenebilir.

1. Organ kültürü: Vücut dışına çıkartılmış organların *in vitro* şartlarda bir süre daha canlılığının devam ettirilmesidir.
2. Doku kültürü: Dokulardan alınmış örneklerin *in vitro* şartlarda canlılığının bir süre daha korunmasıdır.

3. Hücre kültürü: Enzimatik ya da mekanik yolla parçalanma veya spontan migrasyon ile ait olduğu dokudan ayrılan hücrelerin çoğaltılmasıdır (214). Primer, devamlı ve diploid hücre kültürleri olarak sınıflandırılabilir.
- Primer hücre kültürleri; köken aldığı dokudan ilk defa izole edilen ve ilk defa kültür ortamına alınmış hücrelerden elde edilir. Bu hücreler dokudan henüz alındığı için kaynağı olan dokunun fizyolojik özelliklerini tamamı ile yansıtır (215). Primer kültürün pasajlama yapıldıktan sonra elde edilen yeni kültür ortamı subkültür olarak adlandırılır.
 - Devamlı hücre kültürleri; karyotipleri alındıkları dokulardan farklılaştırılmış ve pasajlanarak sonsuz subkültür elde edilebilen kültürlerdir. Bir hücre kültürünün devamlı kültür olarak nitelendirilebilmesi için en az 70 kez subkültür elde edilebilmesi gerekir. Çok sayıda subkültür elde edildiğinde hücreler transformasyona uğrar ve bu sebeple alındığı dokunun fizyolojik özelliklerini koruyamazlar (213). Buna rağmen test sonuçlarının daha standardize bir şekilde alınabilmesi sebebi ile devamlı hücre kültürü çalışmaları tercih edilmektedir (216,217).
 - Diploid hücre kültürleri; primer hücre kültürlerinin sürekli olarak subkültüre edilmesi ile oluşturulan kültür tipidir. Kaynağı olan dokuların özelliğini %85 oranında koruyabilir (218).

2.4.3. Hücre kültürünün avantajları

Hücre kültürü çalışmalarının avantajları;

- Canlı organizmada çevre koşullarını standardize etmenin zorluğuna karşın hücre kültürü çalışmalarında kültür ortamının sıcaklık, pH, kısmi O₂ ve CO₂ basınçları gibi fizikokimyasal şartların kontrol edilmesi daha kolaydır.
- Hücre kültürlerinin homojenitesi iyidir.
- Genellikle ekonomiktir.

2.4.4. Hücre kültürünün dezavantajları

Hücre kültür çalışmalarının dezavantajları;

- Başlangıçta primer kültür kullanıldığında, takip eden pasajlarda hücrelerin farklılaşması sonucu bir miktar hücre ölümü gerçekleşir.
- *In vitro* deneyler hassas ve tecrübe gerektiren çalışmalardır. Hücre kültürü çalışmalarında sterilizasyonun korunması, kültürlerin hatasız hazırlanması ve mikroskopik incelemelerin doğru değerlendirilmesi uzmanlık gerektirir.
- Bazı durumlarda hücre üretiminde kullanılan ekipmanlar oldukça pahalı olabilmektedir. Hücre kültürü çalışmaları genellikle ekonomik olmasına rağmen bu gibi bazı durumlar dezavantaj olabilmektedir (211,213).

2.4.5. Hücre kültürü aşamaları

Planlanan çalışmalar için ihtiyacı karşılayacak sayıda hücre üretilmelidir. Kaynak hücrelerden istenilen sayıda hücre elde edilmesine kadar olan süreç hücre ekimi ve pasajlama olacak şekilde iki kısımda incelenebilir.

2.4.5.1. Hücre ekimi

Hücre ekimi; değişik kaynaklardan ayrıştırılan ya da bir kültür bankasından ticari olarak elde edilen hücrelerin deneysel kullanım için çoğaltılması amacıyla steril bir kültür ortamına aktarılmasıdır. Hücre tipine göre yaklaşık 10^4 - 10^5 adet/ml olacak şekilde hücre ekimi yapıldığında hücre proliferasyonu için ideal bir ortam elde edilmiş olur. Bu konsantrasyondaki hücre ekimi ile, ortalama 3-4 gün içinde kültür kabında 10^6 adet/ml hücre elde edilebilir. Adherent hücreler (ör: osteoblastlar) ekimin ardından 3- 4 saat içinde kültür kabına yapışırlar. Burada yapışmadan kastedilen adherent hücrelerin kültür kabında karakteristik özelliklerine göre yassılaşması ve yayılması sürecidir. Adherent hücrelerde büyüme süreci, ortamdaki besinin yetersiz kalması, kültürde süreçle biriken toksik metabolitler ve kap yüzeyinde büyüme için yeterli yer kalmaması gibi nedenlerle devam edememektedir. Bu durumun önlenmesi ve büyümenin devam ettirilebilmesi için besiyerinin 2-3 günde bir tamamını ya da bir kısmını yenilemek, büyüme için yer kalmadığında ise pasajlama ile hücreleri seyreltmek gerekmektedir (209,219).

2.4.5.2. Pasajlama

Kültür kabı büyüyen hücrelerle tam olarak dolduğunda hücrelerin çoğalması durur. Bu aşamadan sonra kabı dolduran ve kaba yapışmış olan hücreler kaldırılıp yeni ortamlara aktararak yeni hücre kültürleri oluşturulur. Hücreleri çoğaltmak ve birbirine benzeyen hücrelerin karakterizasyonunu arttırmak için gerçekleştirilen bu işleme pasajlama denir ve kültürün sürekliliğini sağlamaya yarar. İlk pasajın ardından gelen subkültürler hücre hattı olarak isimlendirilir. Her subkültür elde edilirken pasajlama yapılır. Yeni oluşturulan kültürlerde hücrelerin yaşayabilmesi için ekilen hücrelerin maksimum yoğunlukta olması gerekir. Yapılan çalışmalarda osteoblastların ve dişeti fibroblastlarının en fazla 40 kez pasajlanabileceği bildirilmektedir. Adherent hücrelerle yapılan çalışmalarda pasajlamaya hücreleri kaplayan medyumun dökülmesiyle başlanır, kalan medyumun etkisinin azaltılması için kültür kabına az miktarda taze medyum eklenip dökülerek hücreleri yıkama işlemi yapılır. Yıkama işlemini takiben hücreler üzerlerine az miktarda tripsin eklenerek etüvde bekletilirler. Tripsin hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalkmasını sağlar. Bu aşamadan sonra kültür kabına taze medyum ilave edilerek tripsin etkisiz hale getirilir, ardından elde edilen hücreli medyum santrifüj edilerek tripsinden ayrıştırılır. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan sıvı atılır, çöken hücreler taze medyum ilave edilip inkübe edilmek üzere yeni kültür kabına alınır. İstenilen hücre sayısına ulaşıncaya kadar pasajlama işlemi tekrarlanabilir (220).

2.4.6. Hücre kültürü laboratuvarı

Hücrelerin tek başlarına enfeksiyonla mücadele edebilme yeteneği yoktur. Bu nedenle herhangi bir kontaminasyon gerçekleştiğinde yapılan deneyden sağlıklı sonuç alınamaz ve deneyin tekrarlanması gerekir. Hücre kültürü laboratuvarlarının olmazsa olmazı oluşabilecek bu kontaminasyonun engellenebilmesi için gerekli tüm aseptik şartların sağlanmasıdır. Deneylerin yapıldığı oda, kullanılan ekipmanlar ve personelin deneyleri yaparken kullandığı eldivene kadar her şeyin temizliği ve sterilizasyonu büyük önem taşır. Diğer araştırma laboratuvarlarıyla genel olarak benzerlik gösterse de hücre kültürü laboratuvarları sterilizasyon kurallarına azami dikkat gerektirmektedir.

Bir hücre kültürü laboratuvarında başlıca bulunması gereken cihazlar; Laminer Akım Kabini, sterilizasyon ünitesi, CO₂ inkübatörü, derin dondurucu, buzdolabı, sıvı azot tankı, yıkama düzenekleri, mikroskoplar, masa üstü santrifüj cihazı, pH metre, ve hücre sayaçlarıdır (221,222).

Laminer Akım Kabini, sahip olduğu hepafiltre sayesinde kabin içinden geçen havayı temizleyerek hücre kültürü deneylerinin gerçekleştirileceği steril ortamın sağlanmasında kullanılan en önemli ekipmanlar arasında yer almaktadır.



Şekil 1: Laminer akım kabini

2.4.7. MTT test yöntemi

MTT testi, çeşitli deney protokolleri uygulanan hücrelerin bu süreçlerin ardından canlılığının ya da proliferasyonunun ölçülmesinde ve bazı materyallerin hücreler üzerine olan sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan bir test yöntemidir (223).

Sarı renkli tetrazolium tuzları yaşayan hücreler tarafından hücre içine alınır ve bu hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrojenaz enzimi etkisi ile suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşür (222,224-227). Bu kristaller izopropil alkol ya da başka bir organik çözücü ile suda çözünür hale getirilir. Çözünmüş formazan kristallerinin koyu mavi renkte boyadığı örnekler spektrofotometrik cihazlarda 570-690 nm dalga boyunda ölçülerek kantitatif bir değer elde edilir. Elde edilen bu değer kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (228).

Bazı materyaller hücre metabolizmalarını etkileyecek toksik özellikler göstermektedir. Özellikle bazı kimyasal maddelerin ortamdaki varlığı hücre ölümlerine sebep olur. Ölen hücreler mitokondrial aktivite gösteremeyeceğinden mor renkli formazan kristali oluşturamaz. Sonuç olarak metabolizmaları aktif olan canlı hücreler mor renge boyanırken mitokondrial faaliyet gösteremeyen ölü hücreler boyanmamaktadır. MTT testi yoğunluğa bağlı renk farkından kantitatif bir değer elde edilmesi esasına dayanan güvenilir, kolay ve hızlı enzimatik bir test yöntemidir (216).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ VE YÖNTEM

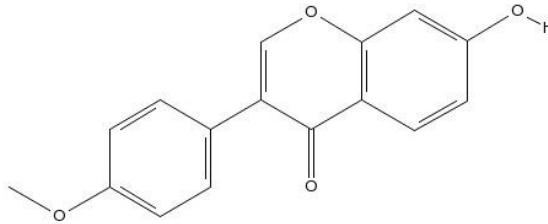
Bu araştırma İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı ile İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nın ortak çalışması ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda partiküllü greft materyali olarak Geistlich Bio-Oss® Spongiosa Granulat kullanılmıştır. Granül büyüklüğü 1-2 mm arasındadır.



Şekil 2: Deneyde kullanılan greft materyali

Çalışmamızda kullanılan formononetin molekülü ($C_{16}H_{12}O_4$) 98.0% (HPLC,T) özelliğindedir ve TCI America firmasından temin edilmiştir.



Şekil 3: Formononetin

Çalışmamızda kullanılan insan kaynaklı sürekli osteoblast hücre kültürleri American Type Culture Collection (ATCC), (Rockville, MD, USA) (hFOB 1.19) firmasından temin edilmiştir.

3.1.1. Deney grupları

Araştırmamızda 8 ana grup ve 1., 6. ve 9. günde *in vitro* incelemelerine göre düzenlenmiş 24 alt grup bulunmaktadır.

- **1. Grup (Kontrol grubu)**

Kontrol grubunu oluşturmak için formononetin veya partiküllü kemik grefti eklenmemiş osteoblast hücre kültürü hazırlandı.

- a) Formononetin veya partiküllü kemik grefti eklenmemiş osteoblast hücre kültürü 1. günde incelendi.
- b) Formononetin veya partiküllü kemik grefti eklenmemiş osteoblast hücre kültürü 6. günde incelendi.
- c) Formononetin veya partiküllü kemik grefti eklenmemiş osteoblast hücre kültürü 9. günde incelendi.

- **2. Grup (1 µg/ml formononetin grubu; F1)**

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne sadece 1 µg/ml formononetin eklendi.

- a) 1 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 1. günde incelendi.
- b) 1 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 6. günde incelendi.
- c) 1 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 9. günde incelendi.

- **3. Grup (10 µg/ml formononetin grubu; F10)**

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne sadece 10 µg/ml formononetin eklendi.

- a) 10 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 1. günde incelendi.
- b) 10 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 6. günde incelendi.
- c) 10 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 9. günde incelendi.

- **4. Grup (100 µg/ml formononetin grubu; F100)**

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne sadece 100 µg/ml formononetin eklendi.

- a) 100 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 1. günde incelendi.
- b) 100 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 6. günde incelendi.
- c) 100 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 9. günde incelendi.

- **5. Grup (Partiküllü kemik grefti grubu; G)**

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne partiküllü kemik grefti eklendi.

- a) Partiküllü kemik grefti eklenmiş osteoblast hücre kültürü 1. günde incelendi.
- b) Partiküllü kemik grefti eklenmiş osteoblast hücre kültürü 6. günde incelendi.
- c) Partiküllü kemik grefti eklenmiş osteoblast hücre kültürü 9. günde incelendi.

- **6. Grup (Graft + 1 µg/ml formononetin grubu; G+F1)**

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne, partiküllü kemik grefti ve 1 µg/ml formononetin eklendi.

- a) Partiküllü kemik grefti ve 1 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 1. günde incelendi.
- b) Partiküllü kemik grefti ve 1 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 6. günde incelendi.
- c) Partiküllü kemik grefti ve 1 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 9. günde incelendi.

- **7. Grup (Graft + 10 µg/ml formononetin grubu; G+F10)**

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne, partiküllü kemik grefti ve 10 µg/ml formononetin eklendi.

- a) Partiküllü kemik grefti ve 10 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 1. günde incelendi.
- b) Partiküllü kemik grefti ve 10 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 6. günde incelendi.
- c) Partiküllü kemik grefti ve 10 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 9. günde incelendi.

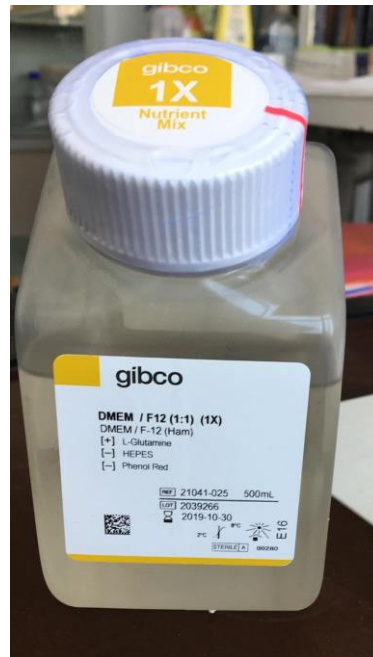
- **8. Grup (Graft + 100 µg/ml formononetin grubu; G+F100)**

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne, partiküllü kemik grefti ve 100 µg/ml formononetin eklendi.

- a) Partiküllü kemik grefti ve 100 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 1. günde incelendi.
- b) Partiküllü kemik grefti ve 100 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 6. günde incelendi.
- c) Partiküllü kemik grefti ve 100 µg/ml formononetin eklenen osteoblast hücre kültürü 9. günde incelendi.

3.1.2. Hücre kültürü medyumunun hazırlanması

Çalışmamızda American Type Culture Collection (ATCC) firmasından satın alınan insan osteoblast hücrelerinin (hFOB 1.19) ekilebilmesi için gerekli kültür ortamı firmanın önerilerine göre, fenol kırmızısı içermeyen L-Glutamine'li DMEM-F12 (Gibco) içerisinde %10 Fetal Bovine Serum (Gibco) ve %1 Penisilin-streptomisin (GrenemarkBio) içerecek şekilde hazırlandı. Oluşan hücre kültür ortamı, +4°C sıcaklığındaki soğutucu içerisinde deney süresince hazır halde bekletildi.



Şekil 4: Deneyde kullanılan DMEM/F12 medyum

3.1.3. Hücre kültürü

Daha önce hazırlanan besi yeri soğutucudan çıkartıldı ve ortam sıcaklığına gelmesi beklendi. 2 ml'lik vial içinde sıvı azot tankında saklanan hücreler, tanktan çıkartıldıktan sonra 2 dakika boyunca çözünmeleri için +37°C sıvı banyosunda kapak kısmından tutularak bekletildi. Kontaminasyon olmaması için özen gösterildi.

Ortam sıcaklığına getirilmiş hücre besi yerinden 5 ml alınarak santrifüj tüpüne kondu. Tamamen çözünen stok hücre vialı alkol ile silindikten sonra laminar akım kabini içerisine alındı. Vial içindeki 2 ml'lik hücre solüsyonu 5 ml'lik hücre besi yerinin üzerine eklendi. Pipetaj yapılarak besi yeri ve hücrelerin karışması sağlandı. Oluşturulan yeni karışım, 3000 devirde 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, dibe çöken insan osteoblast hücrelerinin üzerindeki süpernatant kısım atılarak üzerine yeni besi yeri eklendi ve 25 cm²'lik hücre flaskına ekildi. Oluşturulan 25 cm²'lik hücre flaskı, %5 CO₂ ve %95 atmosferik hava içeren, 37°C buhara doymuş CO₂ inkübatörüne kondu.

3.1.4. Hücrelerin pasajlanması

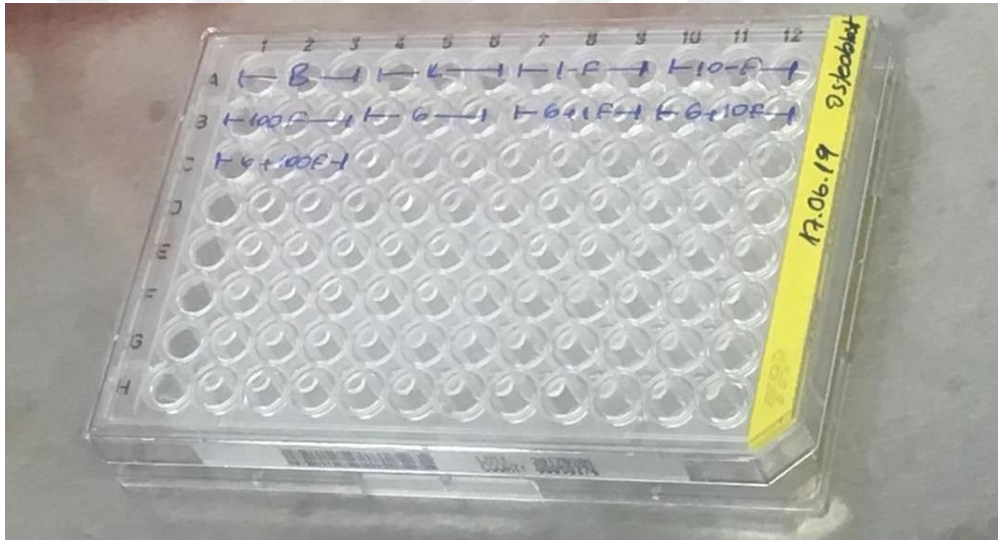
İnkübatörden çıkartılan hücre flaskı invert mikroskop altında incelendi. Hücrelerin yeterli yoğunlukta olup olmadığı, flask yüzeyine yapışıp yapışmadığı, mantar veya bakteri kontaminasyonu olup olmadığı gözlemlendi. Olumsuz bir durum görülmedi ve pasajlama işlemine geçildi. İnkübatörden çıkarılan flask yüzeyine yapışan insan osteoblast hücreleri hücre kazıyıcısı aracılığı ile yüzeyden kaldırıldı. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı görüldükten sonra, hücreler 10 ml medyumla beraber 15 ml'lik bir falkona konuldu. Bu falkon 3000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilip hücrelerin çökmesi sağlandıktan sonra üstteki sıvı uzaklaştırıldı. Santrifüjle birbirine yapışarak çöken hücrelerin üzerine 1 ml taze medyum eklenerek tekrar süspansiyon haline getirildi. Hücreli medyuma pipetaj yapıldı ve çözelti içerisinde 10 µl örnek alınarak Thoma lamı üzerinde hücre sayımı yapıldı. Sayımdan sonra çözelti 10 ml olacak şekilde taze medyum ilave edildi ve hücreler uygun miktarlara bölünerek flasklara konulup, haftada iki kez olacak şekilde aynı prosedürle, deney için gerekli hücre sayısına ulaşıncaya dek, pasajlanmaya devam edildi.

3.1.6. MTT test kitinin uygulanması

1, 6 ve 9 gün inkübe edilen deney düzenekleri belirlenen zaman dilimine uyularak inkübatörde bekletildi.

Hücre içeren her bir kuyucuğa MTT solüsyonu tekrarlayan pipetaj işlemleriyle 10'ar μL ilave edildi. Hücre kabı 1 dk boyunca orbital karıştırıcıda yavaşça karıştırıldı. Daha sonra hücre kabı firmanın önerdiği şekilde 4 saat CO_2 inkübatöründe bırakıldı.

İnkübatörde 4 saatlik beklemenin ardından hücre plaklarında her kuyucuğa çözücü solüsyon'dan 100 μL eklendi. Çözücü solüsyon eklenmiş hücre plakları tekrar CO_2 inkübatörüne konuldu ve 1 saat bekletildi. Daha sonra inkübatörden çıkarılan hücre plaklarının 570 nm dalga boyundaki mikropate okuyucuda ölçümü yapıldı.



Şekil 6: MTT testi için hazırlanan 96 kuyucuklu hücre plağı

Tablo 2: MTT kiti malzeme listesi ve saklama koşulları

	Ürün	Adet	Saklama Koşulu
1	MTT labeling reagent (MTT Solüsyonu)	5 şişe/5 ml	2°C-8°C
2	Solubilization Solution (Çözücü solüsyon)	3 şişe/90 ml	2°C-8°C

3.1.7. Alkalen fosfataz (ALP) test kitinin uygulanması

1, 6 ve 9 gün inkübe edilen deney düzenekleri belirlenen sürede inkübatörden çıkarıldı.

Çalışma solüsyonunun hazırlanması: 1. ve 2. bileşenler (*buffer and substrate solution*) 1:1 oranda tam olarak karıştırıldı.

Örnek hazırlanması: Firmanın önerilerine göre her örnek için 1×10^6 hücre ekilip hazırlandı. Deney sonunda her kuyucuktan toplanan hücrelerin üzerine ayrı ayrı 2'şer ml PBS ilave edildi. Her biri 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilen hücrelerin santrifüj sonrası dibe çökmesi ile üstte kalan süpernatant sıvı atıldı. Kalan hücrelerin üzerine 0.3-0.5 ml soğuk PBS ilave edildi.

Uygulama basamakları:

Standart'ın hazırlanması: Hazır halde bulunan 0.5 mg/ml fenol standart 2 kez distile edilmiş su ile firma önerisi doğrultusunda yoğunlukları sırasıyla 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0 mg/ml olacak şekilde seyreltildi.

Standart solüsyon içeren kuyucuk hazırlanması: 96 kuyucuklu hücre plaklarına farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 5'er μL standart solüsyon ilave edildi.

Deney örneği içeren kuyucuk hazırlanması: 96 kuyucuklu hücre plaklarına her bir deney örneğinden 5'er μL ilave edildi.

Her kuyucuğa 50'şer μL çalışma solüsyonu ilave edildi ve okuyucuda 30 sn boyunca tamamen karışması sağlandı.

37°C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi, ardından her kuyucuğa 150 μL kromojenik ajan ilave edildi ve karıştırıldı.

Optik yoğunluk değerleri 520 nm dalga boyunda plak okuyucuda ölçüldü.

Tablo 3: ALP kiti malzeme listesi ve saklama koşulları

	Ürün	Miktar	Saklama Koşulu
1	Buffer Solution (Tamponlama Solüsyonu)	1.5 mL×2 vial	2-8°C, 6 ay, ışıksız ortam
2	Substrate Solution (Substrat Solüsyonu)	1.5 mL×2 vial	2-8°C, 6 ay, ışıksız ortam
3	Chromogenic Agent (Kromojenik Ajan)	9 mL × 2 vials	2-8°C, 6 ay, ışıksız ortam
4	0.5 mg/mL Phenol Standard (0.5 mg/mL Fenol Standart)	1.5 mL×1 vial	2-8°C, 6 ay, ışıksız ortam

3.1.8. Osteokalsin ve VEGF miktarının tayini

Osteokalsin ve VEGF proteinlerinin analizi SDS-PAGE sonrası Western-Blot yöntemi ile gerçekleştirildi. Çalışma için 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara hücre ekimi yapıldı. Formononetin ve greft uygulaması ile beraber 9 gün inkübasyon sonrası lizat hazırlanıp total protein miktarları analiz edilip, Western-Blot işlemi gerçekleştirildi.

3.1.8.1. Hücre lizatlarının hazırlanması

Greft ve formononetin uygulanan hücreler 1 ml'lik ependorf tüplere alındıktan sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Pelletler PBS (10 mM K-fosfat, pH: 7.2, 150 mM NaCl) içerisinde 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Pelletlerin üzerine hücre patlatma tamponu (*lysis buffer*) (10 mM Tris-HCl, pH: 7.4, 1 mM Na-EDTA, %0.5 Triton X-100, 1 mM PMSF, 0.5 µl/ml Proteaz inhibitör kokteyli) eklendikten sonra hücreler buz içerisinde insülin enjektörü yardımıyla patlatıldı. Hazırlanan lizatlar 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek pellet ayrıştırıldı. Süpernatantlar analiz edilmek üzere kısa süre -20°C 'de, uzun dönemde -80°C 'de saklandı.

3.1.8.2. Lizatlardaki protein miktar tayini

Lizatlardaki total protein miktarlarını ölçmek amacıyla florometrik yöntem (Qubit protein miktar analiz kiti) kullanıldı. Reaksiyon karışımı, örnek başına 200 µl olacak şekilde içerisinde 1 µl florofor karıştırılarak hazırlandı. Aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde (Tablo:4) kitin kendisine ait 3 standartla beraber örnekler reaksiyon ortamına ilave edilip, 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası örnek ve standartların florometrik ölçümleri yapıldı.

Tablo 4: Protein miktar analizi için hazırlanan reaksiyon ortamı.

Hacim	Standartlar	Örnekler
Reaksiyon Karışımı	190 µl	195 µl
Standart	10 µl	-
Örnek	-	5 µl
Her bir tüpteki reaksiyon hacmi	200 µl	200 µl

3.1.8.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western-Blot analizi

Çalışmada kullanılan protein örneklerinin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid gel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli yöntemine göre yapıldı (229). Analizler için %5'lik yükleme ve %12'lik ayırma jeli aşağıdaki tabloya göre (Tablo:5) hazırlandı. Moleküler ağırlık standartları (BlueRey Prestained Protein Marker) moleküler ağırlık belirteci olarak kullanıldı.

Tablo 5: Yükleme ve ayırma jelinin içeriği.

%5'lik yükleme jeli içeriği		%12'lik ayırma jeli içeriği	
dH ₂ O	1.46 ml	dH ₂ O	2.72 ml
1 M Tris-HCl, (pH:6.8)	625 µl	1.5 M Tris-HCl, (pH:8.8)	2 ml
AA/BA (30:0.8)	420 µl	AA/BA (30:0.8)	3.22 ml
% 10 SDS	25 µl	% 10 SDS	75 µl
% 10 APS	20 µl	% 10 APS	60 µl
TEMED	10 µl	TEMED	30 µl

Elektroforez sonrası, protein örneklerini içeren jel transfer tamponu içinde ıslatılan nitroselüloz membran ve 3MM Whatman filtre kâğıtları arasına yerleştirildi ve tank sistemine özel süngerlerin arasına konuldu. Bu şekilde oluşturulan sandviç modeli aktarım kasetlerinin içine sıkıştırıldı. Kasetler, soğuk aktarım tamponu ile dolu olan tank içine yerleştirildi. Oluşturulan düzenekte 4°C’de 90V, 90 dakika süreyle aktarım işlemi gerçekleştirildi. Aktarımdan sonra nitroselüloz membran, özgün olmayan bağlanmaları önlemek için %5 BSA içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi (TBST) ile oda sıcaklığında 2 saat çalkalanarak doyuruldu. TBST çözeltisi ile üç kez yıkanan membran uygun olan birincil (primer) antikorla (VEGF-1:500, osteokalsin-1:500 ve aktin-1:1000) 4°C’de gece boyunca çalkalayıcı yardımıyla inkübe edildi. Ertesi gün, membran TBST çözeltisi ile üç kez yıkanarak ikincil antikor (alkalen fosfataz bağlı) ortama eklendi ve bir saat oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. Membran tekrar TBST çözeltisi ile üç kez yıkandıktan sonra kromojenik alkalen fosfataz substratı (NBT/BCIP) uygulanarak, karanlıkta membran üzerinde bantların oluşması sağlandı. Yeterli renklenme sonrası dH₂O içine alınarak tepkime durduruldu. Membranlardaki proteinlerin kantitatif tayini için ImageJ programı kullanıldı.

3.1.9. Verilerin istatistiksel analizi

Yapılan çalışmaların istatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi, grup içi ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. MTT BULGULARI

Tablo 6: Gün gruplarında ayrı ayrı gruplara göre MTT parametrelerinin değerlendirilmesi

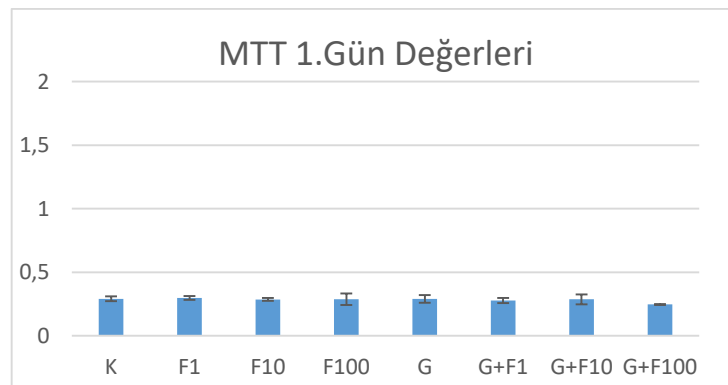
Gün	Grup	MTT
		Ort±SS (medyan)
1 gün	Kontrol	0,291±0,019 (0,293)
	1 µg/ml formononetin	0,298±0,015 (0,301)
	10 µg/ml formononetin	0,286±0,011 (0,281)
	100 µg/ml formononetin	0,287±0,045 (0,311)
	Partiküllü kemik grefti	0,290±0,029 (0,295)
	Graft + 1 µg/ml formononetin	0,278±0,020 (0,286)
	Graft + 10 µg/ml formononetin	0,287±0,039 (0,303)
	Graft + 100 µg/ml formononetin	0,247±0,002 (0,246)
	p	p=0,431
6 gün	Kontrol	1,259±0,050 (1,243)
	1 µg/ml formononetin	1,306±0,037 (1,286)
	10 µg/ml formononetin	1,409±0,029 (1,397)
	100 µg/ml formononetin	1,358±0,038 (1,356)
	Partiküllü kemik grefti	0,680±0,040 (0,678)
	Graft + 1 µg/ml formononetin	1,753±0,051 (1,764)
	Graft + 10 µg/ml formononetin	1,774±0,061 (1,795)
	Graft + 100 µg/ml formononetin	1,781±0,020 (1,771)
	p	p=0,003
9 gün	Kontrol	1,959±0,077 (1,927)
	1 µg/ml formononetin	2,010±0,065 (2,016)
	10 µg/ml formononetin	2,290±0,078 (2,294)
	100 µg/ml formononetin	2,491±0,070 (2,460)
	Partiküllü kemik grefti	2,328±0,082 (2,305)
	Graft + 1 µg/ml formononetin	2,403±0,083 (2,362)
	Graft + 10 µg/ml formononetin	2,859±0,061 (2,868)
	Graft + 100 µg/ml formononetin	2,664±0,109 (2,697)
	p	p=0,003

*Kruskal Wallis ($p<0,05$)

Tablo 7: MTT 1. gün bulguları

	1	2	3
Kontrol	0,271	0,308	0,293
1 µg/ml formononetin	0,282	0,311	0,301
10 µg/ml formononetin	0,281	0,279	0,299
100 µg/ml formononetin	0,235	0,311	0,315
Partiküllü kemik grefti	0,259	0,317	0,295
Greft + 1 µg/ml formononetin	0,255	0,286	0,292
Greft + 10 µg/ml formononetin	0,242	0,303	0,315
Greft + 100 µg/ml formononetin	0,246	0,246	0,249

Gruplar arasında 1. gün MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,431$; $p>0,05$)

Tablo 8: MTT 1. gün deney sonuçlarının grafik üzerinde gösterimi

Tablo 9: MTT 6. gün bulguları

	1	2	3
Kontrol	1,243	1,22	1,315
1 µg/ml formononetin	1,286	1,284	1,349
10 µg/ml formononetin	1,388	1,442	1,397
100 µg/ml formononetin	1,397	1,356	1,321
Partiküllü kemik grefti	0,641	0,72	0,678
Greft + 1 µg/ml formononetin	1,698	1,798	1,764
Greft + 10 µg/ml formononetin	1,706	1,822	1,795
Greft + 100 µg/ml formononetin	1,771	1,767	1,804

Gruplar arasında 6. gün MTT değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,003$, $p<0,05$). Anlamlılığın değerlendirilmesi için gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

Kontrol grubu 6. gün MTT değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında F1 ($p:0,967$) ve F100 ($p:0,838$) grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış olup; F10 ($p:0,039$), G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0,001$), G grubunun değerleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

F1 grubunun 6. gün MTT değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında F10 ($p:0,677$) ve F100 ($p:0,865$) grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark

gözlenmezken ($p>0,05$); G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerleri F1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0,001$), G grubunun değerleri F1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

F10 grubunun 6. gün MTT değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında F100 ($p:0,944$) grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış olup; G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerleri F10 grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0,001$), G grubunun değerleri F10 grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

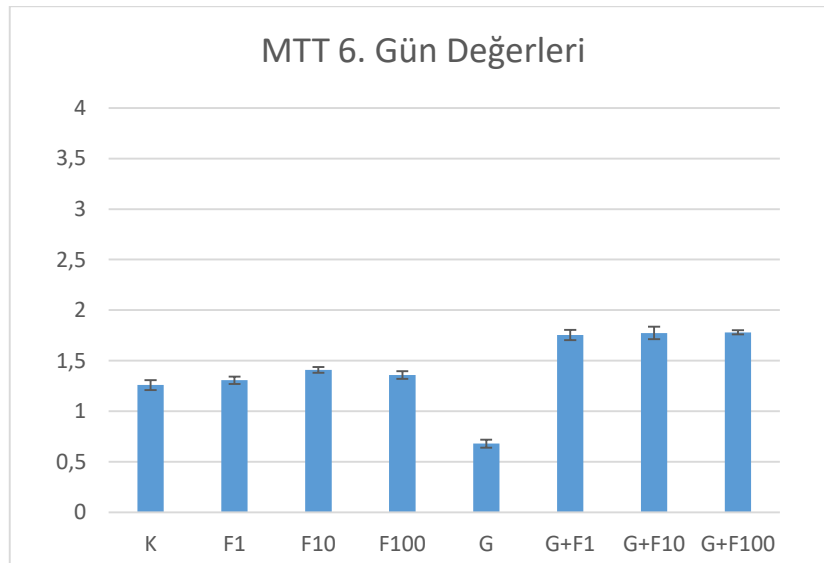
F100 grubunun 6. gün MTT değerleri G+F1 G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuşken ($p<0,001$), G grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

G grubunun 6. gün MTT değerleri G+F1 G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

G+F1 grubunun 6. gün MTT değerleri ile G+F10 ve G+F100 gruplarının değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

G+F10 grubunun 6. gün MTT değerleri ile G+F100 grubunun değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 10: MTT 6. gün deney sonuçlarının grafik üzerinde gösterimi



Tablo 11: MTT 9. gün bulguları

	1	2	3
Kontrol	2,046	1,927	1,903
1 µg/ml formononetin	2,072	1,943	2,016
10 µg/ml formononetin	2,21	2,365	2,294
100 µg/ml formononetin	2,572	2,442	2,46
Partiküllü kemik grefti	2,419	2,261	2,305
Greft + 1 µg/ml formononetin	2,498	2,362	2,348
Greft + 10 µg/ml formononetin	2,794	2,868	2,916
Greft + 100 µg/ml formononetin	2,543	2,753	2,697

Gruplar arasında 9. gün MTT değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,003$, $p<0,05$). Anlamlılığın değerlendirilmesi için gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

Kontrol grubunun 9. gün MTT değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında F1 grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış olup ($p:0,932$); diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,01$).

F1 grubunun 9. gün MTT değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında F10, F100, G, G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,01$).

F10 grubunun 9. gün MTT değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında G ($p:0,963$) ve G+F1 ($p:0,380$) grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış olup; F100, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerleri F10 grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$),

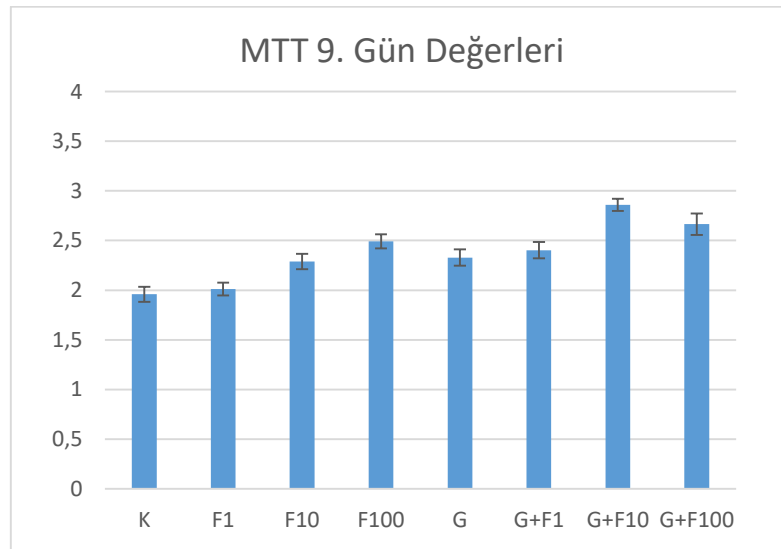
F100 grubunun 9. gün MTT değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında G+F1 grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamışken ($p>0,05$), G+F10 ve G+F100 gruplarının değerleri F100 grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0,01$), G grubunun değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük gözlenmiştir ($p:0,047$).

G grubunun 9. gün MTT değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında G+F1 grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış olup ($p:0,935$), G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

G+F1 grubunun 9. gün MTT değerleri, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

G+F10 grubunun 9. gün MTT değerleri, G+F100 grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0,027$).

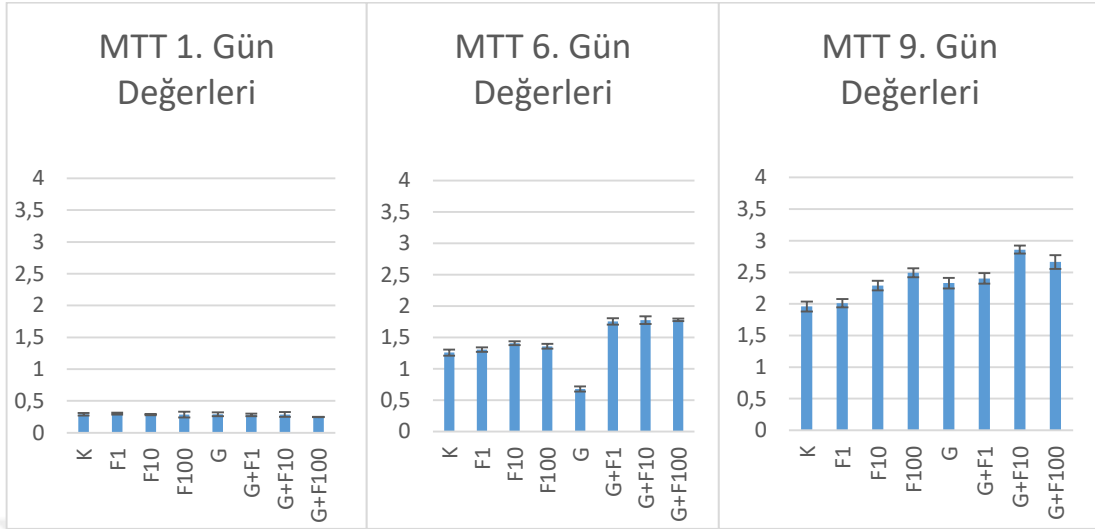
Tablo 12: MTT 9. gün deney sonuçlarının grafik üzerinde gösterimi



Tablo 13: Grupların kendi içlerinde gün gruplarına göre MTT parametrelerinin değerlendirilmesi

Grup	Gün	MTT
		Ort±SS (medyan)
Kontrol	1 gün	0,291±0,019 (0,293)
	6 gün	1,259±0,050 (1,243)
	9 gün	1,959±0,077 (1,927)
	p	<0,001
1 µg/ml formononetin	1 gün	0,298±0,015 (0,301)
	6 gün	1,306±0,037 (1,286)
	9 gün	2,010±0,065 (2,016)
	p	<0,001
10 µg/ml formononetin	1 gün	0,286±0,011 (0,281)
	6 gün	1,409±0,029 (1,397)
	9 gün	2,290±0,078 (2,294)
	p	<0,001
100 µg/ml formononetin	1 gün	0,287±0,045 (0,311)
	6 gün	1,358±0,038 (1,356)
	9 gün	2,491±0,070 (2,460)
	p	<0,001
Partiküllü kemik grefti	1 gün	0,290±0,029 (0,295)
	6 gün	0,680±0,040 (0,678)
	9 gün	2,328±0,082 (2,305)
	p	<0,001
Greft + 1 µg/ml formononetin	1 gün	0,278±0,020 (0,286)
	6 gün	1,753±0,051 (1,764)
	9 gün	2,403±0,083 (2,362)
	p	<0,001
Greft + 10 µg/ml formononetin	1 gün	0,287±0,039 (0,303)
	6 gün	1,774±0,061 (1,795)
	9 gün	2,859±0,061 (2,868)
	p	<0,001
Greft + 100 µg/ml formononetin	1 gün	0,247±0,002 (0,246)
	6 gün	1,781±0,020 (1,771)
	9 gün	2,664±0,109 (2,697)
	p	<0,001

*Kruskal Wallis ($p<0,05$)

Tablo 14: Gün gruplarına göre MTT değerleri

Tüm deney gruplarının gün grupları arasında MTT değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Yapılan ikili karşılaştırmalar incelendiğinde, 6. gün gruplarının MTT değerleri 1. gün gruplarının değerlerinden, 9. gün gruplarının MTT değerleri de 6. gün gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

4.2. ALP BULGULARI

Tablo 15: Gün gruplarında ayrı ayrı gruplara göre ALP parametrelerinin değerlendirilmesi

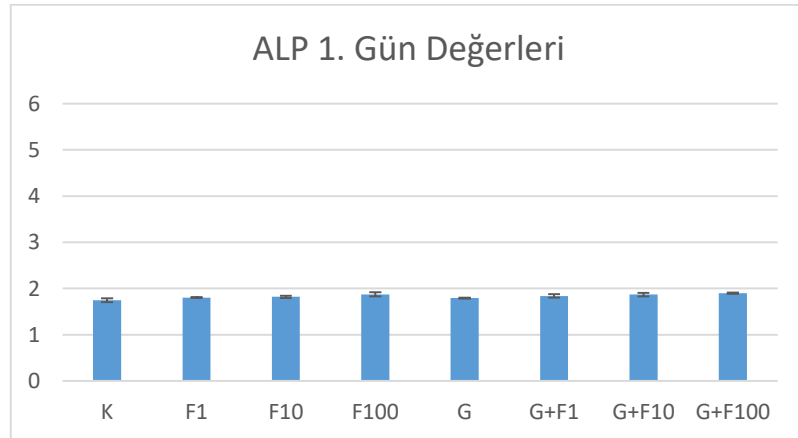
Gün	Grup	ALP
		Ort±SS (medyan)
1 gün	Kontrol	1,75±0,044 (1,76)
	1 µg/ml formononetin	1,81±0,002 (1,81)
	10 µg/ml formononetin	1,82±0,024 (1,81)
	100 µg/ml formononetin	1,87±0,046 (1,89)
	Partiküllü kemik grefti	1,79±0,008 (1,79)
	Greft + 1 µg/ml formononetin	1,84±0,037 (1,86)
	Greft + 10 µg/ml formononetin	1,87±0,038 (1,87)
	Greft + 100 µg/ml formononetin	1,90±0,015 (1,90)
	p	p=0,430
6 gün	Kontrol	1,74±0,043 (1,73)
	1 µg/ml formononetin	2,15±0,104 (2,14)
	10 µg/ml formononetin	2,56±0,216 (2,64)
	100 µg/ml formononetin	2,87±0,204 (2,80)
	Partiküllü kemik grefti	2,35±0,181 (2,46)
	Greft + 1 µg/ml formononetin	3,47±0,209 (3,45)
	Greft + 10 µg/ml formononetin	3,97±0,163 (3,96)
	Greft + 100 µg/ml formononetin	4,60±0,132 (4,60)
	p	p=0,002
9 gün	Kontrol	1,79±0,015 (1,78)
	1 µg/ml formononetin	2,91±0,114 (2,93)
	10 µg/ml formononetin	2,64±0,063 (2,61)
	100 µg/ml formononetin	3,26±0,093 (3,30)
	Partiküllü kemik grefti	2,38±0,315 (2,50)
	Greft + 1 µg/ml formononetin	4,08±0,111 (4,12)
	Greft + 10 µg/ml formononetin	4,81±0,101 (4,81)
	Greft + 100 µg/ml formononetin	4,94±0,075 (4,94)
	p	p=0,002

*Kruskal Wallis ($p<0,05$)

Tablo 16: ALP 1. gün bulguları

	1	2	3
Kontrol	1,784937	1,698353	1,759363
1 µg/ml formononetin	1,803535	1,807365	1,806453
10 µg/ml formononetin	1,850353	1,810362	1,805342
100 µg/ml formononetin	1,896352	1,906543	1,820573
Partiküllü kemik grefti	1,792348	1,801732	1,784321
Graft + 1 µg/ml formononetin	1,855329	1,795349	1,864356
Graft + 10 µg/ml formononetin	1,829934	1,872207	1,90632
Graft + 100 µg/ml formononetin	1,885372	1,916324	1,897829

Gruplar arasında 1. gün ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,430$; $p>0,05$).

Tablo 17: 1. gün ALP düzeylerinin grafik üzerinde gösterimi

Tablo 18: ALP 6. gün bulguları

	1	2	3
Kontrol	1,785327	1,734913	1,699155
1 µg/ml formononetin	2,046428	2,136673	2,254318
10 µg/ml formononetin	2,638761	2,73471	2,321054
100 µg/ml formononetin	3,101239	2,801851	2,710349
Partiküllü kemik grefti	2,14372	2,456183	2,460921
Greft + 1 µg/ml formononetin	3,682343	3,452943	3,264193
Greft + 10 µg/ml formononetin	4,132936	3,963821	3,805252
Greft + 100 µg/ml formononetin	4,602534	4,47243	4,73735

Gruplar arasında 6. gün ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$, $p<0,05$). Anlamlılığın değerlendirilmesi için gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

Kontrol grubunun ALP değerleri diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

F1 grubunun 6. gün ALP değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında G grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmezken ($p:0,161$), kontrol grubu dışındaki diğer tüm grupların (F10, F100, G+F1, G+F10, G+F100) değerleri F1 grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

F10 grubunun 6. gün ALP değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında F100 ($p:0,149$) ve G ($p:0,265$) grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış

olup; G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerleri F10 grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

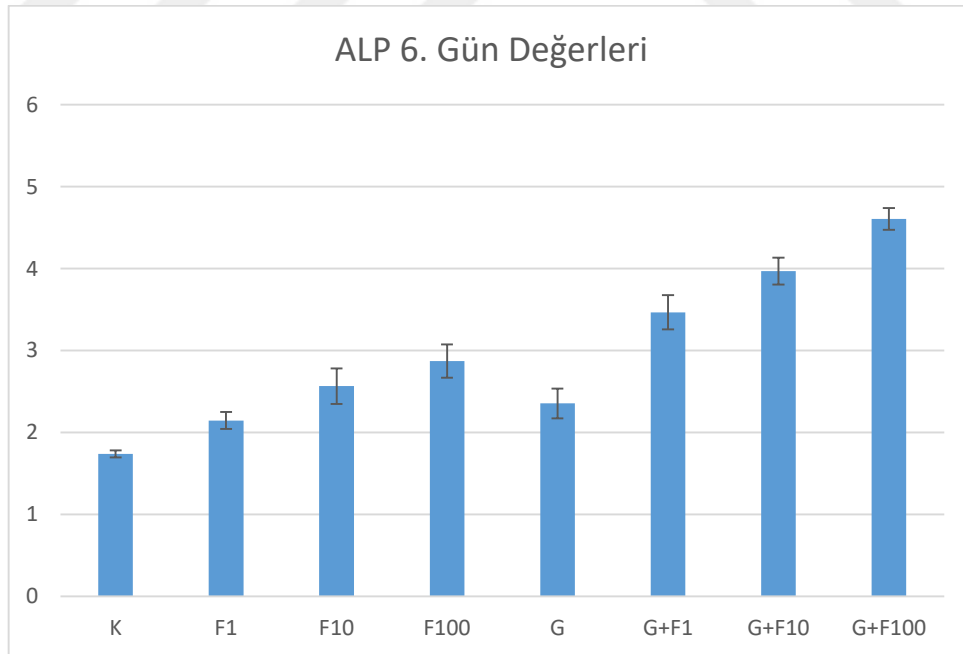
F100 grubunun 6. gün ALP değerleri G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuşken ($p<0,05$), G grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,04$).

G grubunun 6. gün ALP değerleri G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,0001$).

G+F1 grubunun 6. gün ALP değerleri G+F10 ($p<0,04$) ve G+F100 ($p<0,001$) gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

G+F100 grubunun 6. gün ALP değerleri G+F10 grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,007$).

Tablo 19: 6. gün ALP seviyelerinin grafik üzerinde gösterimi



Tablo 20: ALP 9. gün bulguları

	1	2	3
Kontrol	1,807294	1,781639	1,779123
1 µg/ml formononetin	2,931526	3,016342	2,790143
10 µg/ml formononetin	2,61382	2,591322	2,710534
100 µg/ml formononetin	3,14923	3,317932	3,303412
Partiküllü kemik grefti	2,019373	2,502816	2,6125
Greft + 1 µg/ml formononetin	3,951834	4,162842	4,115247
Greft + 10 µg/ml formononetin	4,813281	4,903427	4,702426
Greft + 100 µg/ml formononetin	4,862414	5,014283	4,942731

Gruplar arasında 9. gün ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$, $p<0,05$). Anlamlılığın değerlendirilmesi için gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

Kontrol grubunun ALP değerleri diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

F1 grubunun 9. gün ALP değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında F10 grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p:0,376$). Aynı grubun kontrol grubu ve G grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0,01$), F100, G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

F10 grubunun 9. gün ALP değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında F1 ($p:0,376$) ve G ($p:0,488$) grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiş

olup; kontrol grubu dışındaki diğer grupların (F100, G+F1, G+F10, G+F100) değerleri F10 grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. ($p<0,01$).

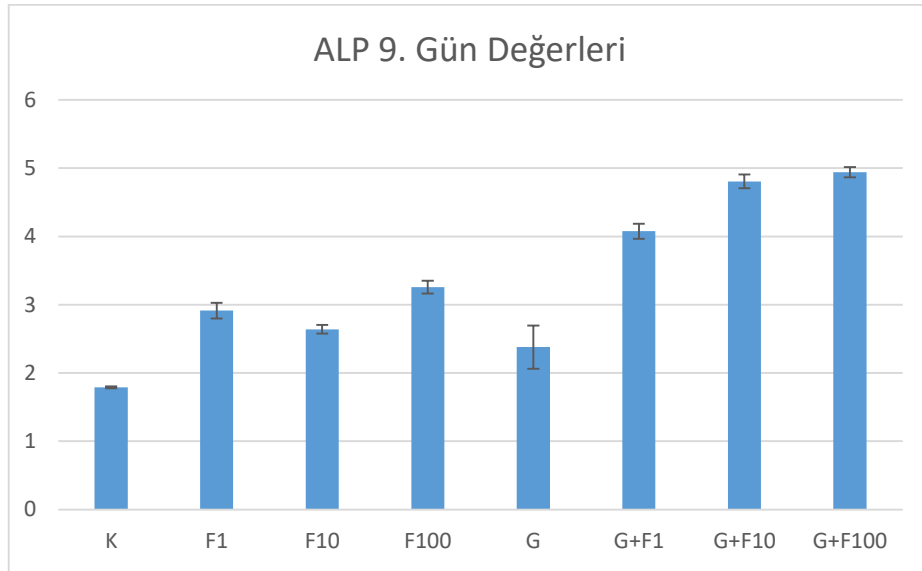
F100 grubunun 9. gün ALP değerleri G+F1 G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuşken ($p<0,05$), G grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

G grubunun 9. gün ALP değerleri G+F1, G+F10 ve G+F100 gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,0001$).

G+F1 grubunun 9. gün ALP değerleri G+F10 ($p<0,001$) ve G+F100 ($p<0,001$) gruplarının değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

G+F100 grubunun 9. gün ALP değerleri ile G+F10 grubunun değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark gözlenmemiştir ($p:0,986$).

Tablo 21: 9. gün ALP değerlerinin grafikte gösterimi



Tablo 22: Grupların kendi içlerinde gün gruplarına göre ALP parametrelerinin değerlendirilmesi

Grup	Gün	ALP
		Ort±SS (medyan)
Kontrol	1. gün	1,75±0,044 (1,76)
	6. gün	1,74±0,043 (1,73)
	9. gün	1,79±0,015 (1,78)
	p	0,43
1 µg/ml formononetin	1. gün	1,81±0,002 (1,81)
	6. gün	2,15±0,104 (2,14)
	9. gün	2,91±0,114 (2,93)
	p	0,007
10 µg/ml formononetin	1. gün	1,82±0,024 (1,81)
	6. gün	2,56±0,216 (2,64)
	9. gün	2,64±0,063 (2,61)
	p	0,036
100 µg/ml formononetin	1. gün	1,87±0,046 (1,89)
	6. gün	2,87±0,204 (2,80)
	9. gün	3,26±0,093 (3,30)
	p	0,02
Partiküllü kemik grefti	1. gün	1,79±0,008 (1,79)
	6. gün	2,35±0,181 (2,46)
	9. gün	2,38±0,315 (2,50)
	p	0,061
Graft + 1 µg/ml formononetin	1. gün	1,84±0,037 (1,86)
	6. gün	3,47±0,209 (3,45)
	9. gün	4,08±0,111 (4,12)
	p	0,005
Graft + 10 µg/ml formononetin	1. gün	1,87±0,038 (1,87)
	6. gün	3,97±0,163 (3,96)
	9. gün	4,81±0,101 (4,81)
	p	0,001
Graft + 100 µg/ml formononetin	1. gün	1,90±0,015 (1,90)
	6. gün	4,60±0,132 (4,60)
	9. gün	4,94±0,075 (4,94)
	p	0,01

*Kruskal Wallis ($p<0,05$)

Kontrol grubunun gün grupları arasında ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p:0,43$).

F1 grubunun gün grupları arasında ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p:0,007$). Yapılan ikili karşılaştırmalar incelendiğinde, 6. gün grubunun ALP değerleri 1.gün grubunun değerlerinden ($p:0,01$), 9. gün grubunun ALP değerleri 6. gün değerlerinden ($p:0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

F10 grubunun gün grupları arasında ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p:0,036$). Yapılan ikili karşılaştırmalar incelendiğinde, 6. gün ALP değerleri 1. gün değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuşken ($p:0,001$), 9. gün ve 6. gün değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p:0,876, p>0,05$).

F100 grubunun gün grupları arasında ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p:0,02$). Yapılan ikili karşılaştırmalar incelendiğinde, 6. gün grubunun ALP değerleri 1. gün grubunun değerlerinden ($p:0,01$), 9. gün grubunun ALP değerleri de 6. gün değerlerinden ($p:0,036$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

G grubunun gün grupları arasında ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p:0,061$).

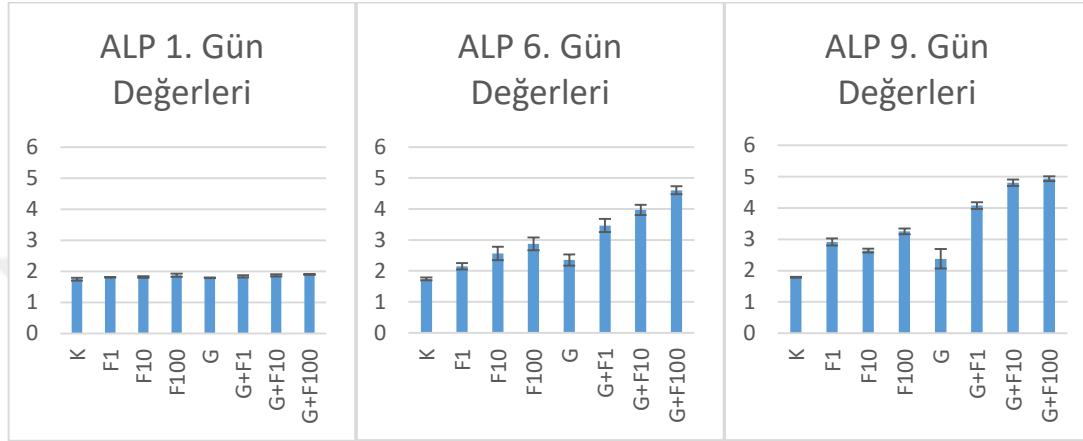
G+F1 grubunun gün grupları arasında ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p:0,005$). Yapılan ikili karşılaştırmalar incelendiğinde, 6. gün grubunun ALP değerleri 1. gün grubunun değerlerinden ($p:0,001$), 9. gün grubunun ALP değerleri de 6. gün değerlerinden ($p:0,006$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

G+F10 grubunun gün grupları arasında ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p:0,001$). Yapılan ikili karşılaştırmalar incelendiğinde, 6. gün grubunun ALP değerleri 1. gün grubunun değerlerinden ($p:0,001$), 9. gün grubunun ALP değerleri de 6. gün değerlerinden ($p:0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

G+F100 grubunun gün grupları arasında ALP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p:0,01$). Yapılan ikili karşılaştırmalar incelendiğinde, 6.

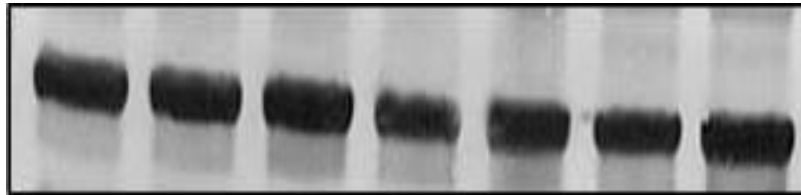
gün grubunun ALP değerleri 1. gün grubunun değerlerinden ($p:0,001$), 9. gün grubunun ALP değerleri de 6. gün değerlerinden ($p:0,011$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Tablo 23: Gün gruplarına göre ALP değerleri



4.3. PROTEİN ANALİZLERİ

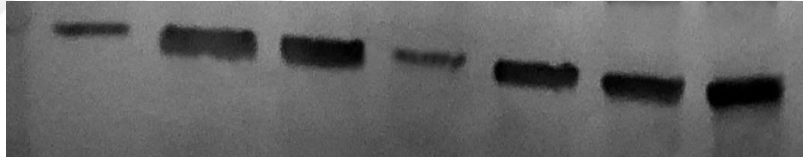
VEGF ve osteokalsinin 9. günde gruplara göre rölatif yoğunlukları Western-Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Veriler beta-aktin normalizasyonu yapılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 7: Beta-aktin Western-Blot görüntüsü

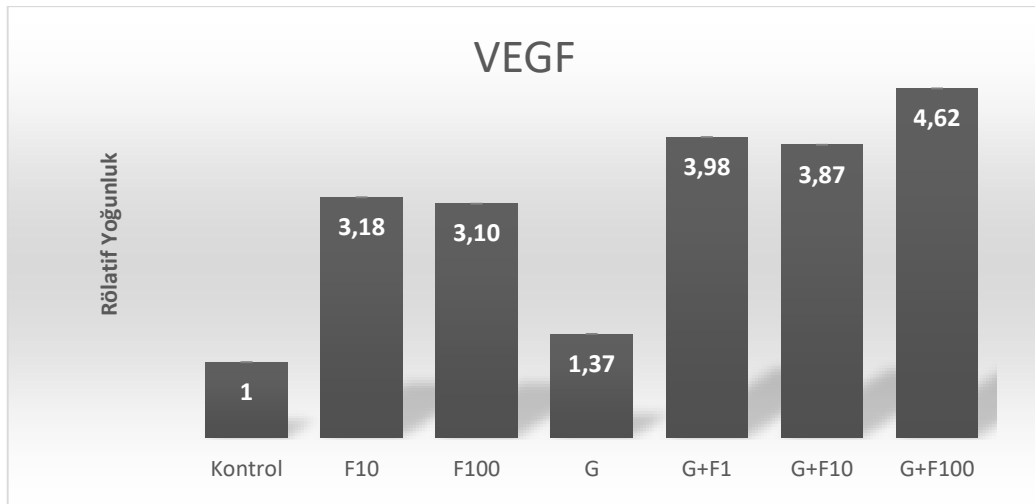
Tablo 24: VEGF bulguları

	WB-VEGF Değerleri	WB-Aktin Değerleri	Protein Normalizasyonu	Aktin Normalizasyonu	P/A Oranı
Kontrol	9975,66	17056,652	1,00	1,00	1,00
F10	29437,59	15831,238	2,95	0,93	3,18
F100	28518,84	15746,238	2,86	0,92	3,10
G	8443,43	10508,167	0,85	0,62	1,37
G+F1	24947,51	10722,51	2,50	0,63	3,98
G+F10	24533,97	10830,903	2,46	0,64	3,87
G+F100	30901,80	11433,167	3,10	0,67	4,62



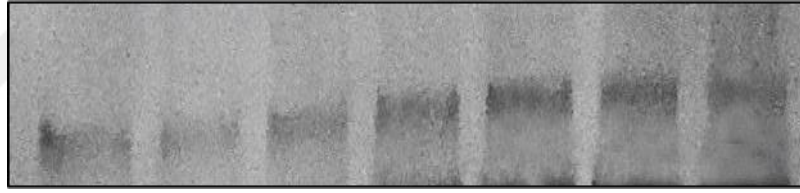
Şekil 8: VEGF Western-Blot görüntüsü

Tablo 25: 9. gün VEGF rölatif yoğunluk grafiği



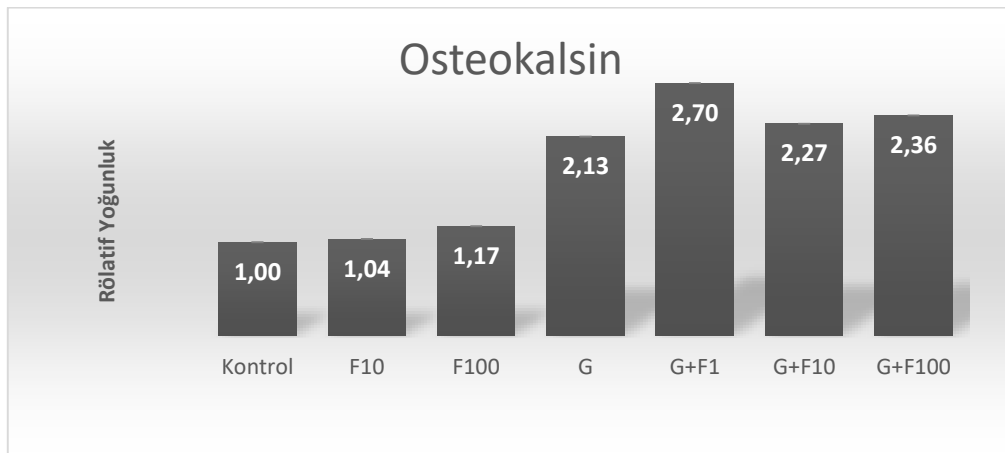
Tablo 26: Osteokalsin bulguları

	W-B Osteokalsin Değerleri	W-B Aktin Değerleri	Protein Normalizasyonu	Aktin Normalizasyonu	P/A Oranı
Kontrol	6060,46	17056,652	1,00	1,00	1,00
F10	5826,41	15831,238	0,96	0,93	1,04
F100	6560,58	15746,238	1,08	0,92	1,17
G	7955,02	10508,167	1,31	0,62	2,13
G+F1	10299,69	10722,51	1,70	0,63	2,70
G+F10	8729,26	10830,903	1,44	0,64	2,27
G+F100	9577,23	11433,167	1,58	0,67	2,36



Şekil 9: Osteokalsin Western-Blot görüntüsü

Tablo 27: 9. gün osteokalsin rölatif yoğunluk grafiği



5. TARTIŞMA

Kemik dokusunun oluşumu, sağlığının korunması ve gerektiğinde onarımında vücutta birçok karmaşık metabolizmal faaliyet gerçekleşmektedir. Hormon dengelerinin bozulması, yetersiz mineral alımı ya da bazı hastalıklar sonucu kemiğin mineral yoğunluğunun azaldığı ve bu nedenle osteoporoz tablosunun görüldüğü uzun yıllardır bilinmektedir. Osteoporoz, genellikle menopoz sonrası yumurtalık fonksiyonlarının kaybı ve östrojen hormonunun azalması ile ortaya çıkan bir tablodur. Hormon replasman tedavisi ve antirezorptif ilaçlarla bu durum tedavi edilmeye çalışılsa da bu tedavilerin ciddi yan etkilerinin varlığı araştırmacıları alternatif tedavi yöntemleri bulmaya yöneltmiştir.

Son yıllarda hormon replasman tedavisinin yerini alabilecek, bitkilerden kaynağını alan ve insan vücudunda östrojen benzeri etkiler gösterebilen bileşikler üzerine çalışmalar artış göstermektedir. Fitoöstrojenler olarak adlandırılan bu bileşiklerin kimyasal yapılarının insan vücudunda bulunan 17β östradiol ile olan benzerliği nedeniyle vücutta hem kemik dokusunda hem de diğer dokulardaki varlıkları çeşitli araştırmalarla kanıtlanan östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik aktivite göstereceği düşüncesi birçok araştırmacı tarafından benimsenmiştir.

Fitoöstrojenlerle ilgili çok sayıda insan, hayvan ve hücre kültürü çalışması yapılmıştır. Formononetinin insan çalışmalarında genellikle postmenopozal semptomların ortadan kaldırılması yönündeki etkileri incelenirken, hayvan çalışmalarında çoğunlukla deneysel olarak oluşturulan osteoporoz tablosunun tedavisi üzerine etkileri incelenmiştir. Çeşitli çalışmalarda osteojenik olduğu, angiogenezi arttırdığı, yara iyileşmesini hızlandırdığı birçok kez gösterilen bu bileşiklerin genellikle diyetle alımı sonucu görülen sistemik etkileri araştırılmıştır. Bu bilgilerden yola çıkıldığında sistemik yolla alındığındaki yararlı etkilerinin lokal kullanımda da görülebileceği ve lokal kemik iyileşmesine katkı sağlayabileceği fikri ortaya çıkmıştır.

Maksillofasiyal cerrahide travmatik diş çekimi, kist ve tümör operasyonları gibi uygulamaların ardından meydana gelen kemik dokusu kayıplarının uygun greft materyalleri ile onarılacak eski kemik hacminin geri kazandırılması amacıyla ogmentasyon işlemleri sıklıkla uygulanmaktadır. Ogmentasyon işlemlerinde kullanılan greft materyalleri iyileşme sürecinin sonunda ilk yerleştirildikleri hacimde kalamamakta, ilgili bölgede az ya da çok bir rezorpsiyon görülmektedir. Başarılı bir ogmentasyonda,

iyileşme süresinin ardından elde edilen kemiğin alıcı sahadaki kemiğe benzer özelliklerde olması ve ilk uygulandığı andaki hacmini olabildiğince koruması beklenmektedir. Bu beklentilerin sağlanabilmesi için öncelikle greft materyalinin alıcı sahadan greftin içine hücre migrasyonuna izin verecek yapıda olması ve mekanik olarak istenen kemik hacmini oluşturabilecek bir çatı görevi görebilmesi gerekmektedir. Bu yapının sağlanmasının ardından ogmentasyon alanında ilk damarsal yapıların oluşması ve hücrel aktivitelerle yeni kemik oluşumu gerçekleşecektir. Bu safhada ortamda anabolik etkiler yaratacak bir ajanın bulunması ogmentasyonun başarısına katkı sağlayacaktır.

Fitoöstrojenlerle ilgili yaptığımız literatür taramasında kemik dokular üzerine olumlu etkileri olan birçok bileşik ile karşılaşmıştır. Bu bileşiklerin bazılarının osteoklastik aktiviteyi engelleyerek kemik metabolizmasına katkı sağladığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Huh ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada formononetinin osteoklast aktivasyonunu engelleyerek antirezorptif etki gösterdiğini bildirmişlerdir (230). Bu antirezorptif etki sayesinde formononetinin kemik yapımını desteklemesinin yanında iyileşme sürecinde fizyolojik olarak gerçekleşmesi beklenen yıkımı azaltarak ogmentasyonla elde edilecek olan kemik hacminin korunmasında da etkili olacağı düşünülmüş olup çalışmamızda bu bileşiğin kullanılmasına karar verilmiştir.

Liu ve ark. (2014) postmenopozal osteoporoz modeli oluşturdukları sıçanlarda sol üst 1. molar diş çekimi yapmışlar ve 8 hafta süreyle oral yolla Astragalus bitki ekstratı takviyesi uygulamışlardır. Bu çalışmada 4. ve 8. haftalarda yapılan sakrifikasyonlar ve testlerden elde edilen verilerle overektomi uygulamasının diş çekimi yaralarının iyileşme sürecinde yeni kemik oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Menopozal dönemde görülen östrojen eksikliği nedeniyle; yeterli miktarda sentezlenemeyen TGF β 1'in Astragalus ekstratı uygulanan grupta sentezinin arttığı, aynı nedenle sekresyonu artan TNF- α nın da sekresyonunun azaldığı ve kemik hacminin korunmasında Astragalus ekstratının etkili olduğu bildirilmiştir (231).

Astragalus membranaceus (Çin geveni), içerisinde çok miktarda formononetin ile birlikte diğer bazı izoflavonları da içeren geleneksel Çin tıbbında kullanılan önemli bir bitki olarak karşımıza çıkmaktadır. Formononetine karar verilmeden önce çalışmamızı bitkisel ekstrat üzerinden yapmayı düşünsek de, firmalardan elde edeceğimiz ekstratın içerisinde hangi etken maddeden ne kadar olduğunun kesin olarak bilinemeyecek olması

sebebiyle çalışmamıza kemik metabolizmasına olumlu etkileri ile karşımıza çıkan formononetin molekülü ile devam edilmiştir.

Tyagi ve ark. (2012) overektomi sonrasında 90 gün beklenerek osteopeni gelişmesi sağlanan sıçanlar üzerinde formononetinin osteopeni tablosunu tedavi edici etkisi olup olmadığını incelemişlerdir. 90 günden sonra 12 hafta boyunca 10 mg/kg/gün dozda oral yolla verilen formononetinin kaybedilen trabeküler yapıyı önemli miktarda onardığını μ CT yöntemi ile göstermiş, tibia ve femurlarda trabeküler kemik kalınlığının arttığını ve trabeküller arasında kalan mesafenin azaldığını bildirmişlerdir (232).

Kaczmarczyk-Sedlak ve ark. (2013) overektomi ile osteoporoz yaratılan sıçanlara 4 hafta boyunca uygulanan formononetinin kemiğin mekanik özelliklerine ve kimyasal yapısına ne şekilde etki ettiğini incelemişlerdir. Formononetinin kemiğin su içeriğini önemli miktarda azalttığını ve mekanik özelliklerinde hafif bir artış sağladığını bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda formononetin takviyesinin osteoporozun önlenmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir (233).

Formononetinin sistemik etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmalarda özellikle kemik dokusu üzerine olan anabolik etkilerinin sıklıkla vurgulanması, bu bileşiğin lokal olarak da etkili olabileceği düşüncesi ile çalışmamızın ortaya çıkmasına öncülük etmiştir.

Yapılan çalışmalarda, ksenogreftlerin yapısının sentetik hidroksiapatitlerden daha karmaşık olmasına rağmen, alloplastlara oranla biyouyumluluklarının daha iyi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda ksenogreftlerin sahip oldukları yüzey özellikleri ve materyalin poröz yapısı osteointegrasyon açısından alloplastlardan daha başarılı olmalarını sağlamaktadır. Mekanik özellikleri hem kortikal hem de spongiöz kemikle benzerlik gösterir. Ayrıca rezorpsiyon paternleri, süresi ve kalan greft materyali açısından ksenogreftlerin sentetik hidroksiapatitlerden daha iyi olduğu bildirilmiştir (185,200–202).

Bu bilgiler eşliğinde çalışmamızda biyouyumluluğu kanıtlanmış olan sıgır kaynaklı greft materyali Geistlich Bio-Oss® Spongiosa Granulat kullanılmıştır.

Günümüzde moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişmelerin sonucu olarak *in vitro* çalışmalardan ileri düzeyde yararlanılabilmektedir. Bir materyalin ya da bir yöntemin *in vivo* denemelerinden önce hücre kültürü çalışmalarıyla etkinliğinin araştırılması, deneyler için kullanılan hayvan sayısını büyük ölçüde azaltmaktadır. Standardizasyonun daha iyi sağlanabilmesi, deney sonuçlarını etkileyebilecek insan

hatalarının en aza indirgenmesi, gereksiz hayvan ölümlerinin ve yine hayvanların beslenme ve bakımları ile ilgili zorlukların önüne geçilmesine olanak sağlamaları nedeniyle hücre kültürü çalışmaları son derece avantajlıdır.

Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda formononetinin osteoblastlar üzerine etkisini *in vitro* olarak incelemeyi hedefledik.

Czekanska ve ark. 2012 yılında yaptıkları derleme çalışmasında kemik formasyonu ve osteojenik aktivitenin değerlendirildiği hücre kültürü çalışmalarında kullanılan birçok farklı osteoblastik hücre modelini incelemişlerdir. Bu hücreler primer olarak insan kemik dokusundan elde edilebildiği gibi sıçan, fare, sığır, koyun ve tavşan kemik dokularından da elde edilebilmektedir. Ayrıca ölümsüzleştirilmiş hücre hatları da çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. En sık kullanılan hücre hatları MC3T3-E1, hFOB, MG-63, SaOs-2 ve U2OS'dir. Çalışmada primer olarak elde edilen hücrelerin osteojenik özelliklerinin yaş, cinsiyet ve hücrenin alındığı yer gibi farklılıklardan etkilendiği bildirilmiştir. Her hücre hattının ya da farklı canlı türlerine ait primer osteoblastik hücrenin özellikleri birbirinden farklı olduğundan çalışma planlanırken bu özelliklerin doğru değerlendirilmesi ve hedeflenen sonuçlara uygun hücre modelinin seçilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır. Osteoblast hücre hatlarının homojen hücre popülasyonu gösterdiği ve istenilen fazlarda çalışma fırsatı verdiği belirtilmiştir. Tedavi edici ajanların erken dönem hücresel uyumluluğunun test edilmesinde kullanışlı oldukları bildirilmiştir (234).

Davis ve ark. hücre hatlarının çok sayıda subkültüre edilmesinin hücrelerde transformasyon meydana getirdiğini, bu sebeple alındığı dokunun fizyolojik özelliklerini kaybettiklerini bildirmişlerdir (213). Schmalz ve ark. hücre hatlarının fizyolojik olarak alındığı dokunun özelliklerini kaybetmiş olmalarına rağmen testlerden daha standardize sonuçlar alınmasını sağladıklarını bildirmişlerdir (216). Liang ve ark. (2012), genenekselsel Çin tıbbında kullanılan Epimedium bitkisinin aktif bileşeni olan Icariin'in osteoporoz üzerine tedavi edici etkisi olup olmadığını inceledikleri çalışmada insan fetal osteoblast hücre hattı kullanmışlardır (235).

Biz de araştırmamızda homojen hücre popülasyonu sağlama, kolay temin edilmesi ve standardize sonuçların alınabilmesi gibi avantajlarından dolayı insan kaynaklı sürekli osteoblast hücreleri (hFOB 1.19) üzerinde çalışmayı tercih ettik.

In vitro çalışmalarda kullanılan materyalin ya da yöntemin, sitotoksitesinin değerlendirilmesi ve hücre canlılığına olan etkisinin sayısal olarak tespit edilmesi gerekmektedir. Canlı hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesinden faydalanılarak uygulanan MTT testi birçok çalışmada canlılık tayini amacıyla kullanılmıştır (236–239).

Wataha ve ark. (1992), ağız içinde kullanılan metal alaşımların sitotoksitesilerini farklı canlılık testleri ile değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, MTT test yönteminin kısa sürede sonuç vermesinin, tekrarlanabilir olmasının ve farklı zamanlarda yapılan testlerin sonuçlarının karşılaştırılabilir olmasının MTT testini diğer testlere göre daha avantajlı kıldığını bildirmişlerdir (240). Tolosa ve ark. (2015) MTT testinin tüm dünyada bilinen, uygulama yöntemi iyi tanımlanmış, ulaşılabilir ve kolay çalışılabilen bir test olduğunu vurgulamışlardır (241).

Bizim çalışmamızda da formononetinin osteoblast hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkisinin incelenmesinde, güvenilirliği, kolay ve hızlı uygulanabilirliği nedeniyle yoğunluğa bağlı renk farkından kantitatif bir değer elde edilmesi esasına dayanan MTT testi tercih edilmiştir.

Palermo ve ark. (2014)'nın insülin benzeri büyüme faktörü ile uyarılmış osteoblastlar üzerinde yaptıkları hücre kültürü çalışmasında, canlı dokudaki osteogeneze karşılık gelen üç ayrı zaman dilimindeki ALP aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bunlardan S1 fazı ALP ekspresyonunun başladığı zaman aralığına (0-3 gün), S2 fazı ALP ekspresyonunun en üst seviyeye ulaştığı zaman aralığına (4-6 gün), S3 fazı da ekstraselüler matrikste mineral depolanmasının görüldüğü zaman aralığına (7-9 gün) karşılık geldiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar tarafından bu zaman aralıklarında gerçekleşen ALP aktiviteleri 0., 3., 6. ve 9. günlerde yapılan deneylerle değerlendirilmiş ve en yüksek ALP değerlerine 6. günde ulaşıldığı belirtilmiştir (242).

Bizim çalışmamızda da formononetinin ALP aktivitesi üzerine olası erken dönem etkisini değerlendirmek amacıyla 1. gün grubu, ALP'nin en yüksek seviyesine ulaştığı gösterilen çalışma nedeniyle 6. gün grubu ve bu seviyede kalıp kalmadığının değerlendirilmesi amacıyla 9. gün grubu olmak üzere 3 ayrı zaman grubu oluşturulmuştur.

Huh ve ark. (2010)'nın osteoartrit hastalarından izole edilen osteoartritik ve normal osteoblast hücreleri ile yaptıkları *in vitro* çalışmada formononetinin bu hücreler

üzerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla 0 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 100 µg/ml formononetin konsantrasyonlarında osteoblast hücrelerinin proliferasyonu değerlendirilmiştir. Formononetin 10 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunun anlamlı derecede arttığını gözlemlemişlerdir. Bu araştırma iyi planlanmış olması ve kemik dokusu ile ilgili parametreleri içermesi nedeniyle referans çalışma olarak seçilmiştir. Araştırmacılar osteoartritik osteoblastların normal osteoblastlardan daha fazla ALP, VEGF, IL-6, BMP-2, osteokalsin ve tip 1 kolajen sentezlediklerini gösterdikleri bu çalışmada, formononetin osteoartritik hücrelerin fazla olan protein sentezini azaltıp normal osteoblastların protein sentezini artırarak hastalığı tedavi edici etkisi olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmanın 3., 7. ve 14. günlerinde kemik yapımı parametreleri incelenmiş ve normal osteoblastlarda 3. ve 7. günde osteokalsin miktarında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Ayrıca VEGF değerlerinin 3. ve 7. gün ölçümünde 1 µg/ml formononetin konsantrasyonunda anlamlı bir farklılık görülmezken 10 µg/ml formononetin varlığında anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (243).

Bu çalışma baz alınarak formononetin konsantrasyonları bizim çalışmamız için 1 – 10 – 100 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen bilgiler doğrultusunda 1 µg/ml formononetin konsantrasyonunun VEGF ekspresyonuna etki etmeyeceği düşünülerek Western Blot analizlerinden çıkartılmıştır.

Nakamura ve ark. (2009) doku mühendisliği araştırmaları için yaptıkları hücre kültürü çalışmalarında sıçanlardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma süreçlerini 16 gün boyunca kültür ortamında incelemişler ve osteokalsinin kemikleşmenin henüz mineralizasyon gerçekleşmeden önceki güvenilir bir kemikleşme belirteci olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada osteoindüktif ortamda mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını göstermek amacıyla yapılan osteokalsin ölçümlerinin ilk olarak 8. günde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını ve bu artışın deneyin son günü olan 16. güne kadar devam ettiğini bildirmişlerdir (244).

Biz de çalışmamızda formononetin ve partiküllü kemik grefti varlığının osteoblastlardan osteokalsin salınımına olan etkisini incelemek amacıyla osteokalsinin rölatif yoğunluğunu değerlendirdik.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) 'nın yumuşak doku ve kemik iyileşmesine önemli katkıları olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Street ve ark. 2002 yılında primer insan osteoblast hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada kültür

ortamına eklenen VEGF'nin doza bağılı olarak pozitif otokrin etki başlattıklarını ve bu etkinin ALP aktivitesinde artış sağladığını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada araştırmacılar tarafından tavşanların radius kemiklerinde kritik boyutta segmental defekt modeli, farelerin femur kemiklerinde kırık ve tibia kemiklerinde fokal kortikal defekt modeli oluşturulmuştur. Farelerde yapılan deneylerde VEGF'yi nötralize etmek için Flt-IgG kullanılmış ve endojen VEGF inhibisyonu altında kırık ve kortikal defekt iyileşmesi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda VEGF nin inhibe edilmesinin farelerde kortikal kemik defekti ve femur kırığının iyileşmesini bozduğu, kemik hasarına cevaben düzgün yapıda kallus oluşumunun ve mineralizasyonun gerçekleşebilmesi için VEGF aktivitesinin kritik önem taşıdığı bildirilmiştir. Tavşan radiuslarında segmentler arası 10 mm'lik kemik boşluğu kalacak şekilde oluşturulan segmental defektin tedavisi için osmotik pompa yardımıyla defekt bölgesine VEGF enjeksiyonu yapılmış ve 28 günlük iyileşme üç boyutlu incelendiğinde plasebo grubunda kemik köprüsü oluşmazken VEGF grubunda %95 oranında kalsifiye kallus oluştuğu gösterilmiştir (245).

Bizim çalışmamızda da kemik defekti bölgesindeki ilk damarsal yapıların oluşumuna ve defektin iyileşmesi üzerine olan etkileri nedeniyle VEGF ekspresyonu Western-Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Huh ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada sıçanlarda kırık modeli oluşturmuşlar ve formononetinin erken dönem kemik iyileşmesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Endokondral kemikleşmede avasküler kırık dokusunun vaskülerize kemik dokusuna dönüşümünde anjiogenezisin büyük önem taşıdığını, burada VEGF'nin çok önemli rolü olduğunu bildirmişlerdir. Formononetinin kırık iyileşmesinin erken döneminde VEGF ekspresyonunu arttırarak anjiogenezisi uyarma işlevi gördüğünü vurgulamışlardır. Çalışmada kemik metabolizmasında görev alan birçok proteinin sentezi ile birlikte osteokalsin ve VEGF ekspresyonu değerlendirmeye alınmıştır. Kontrol, 20 µg/kg ve 200 µg/kg formononetin uygulanan 3 grupta 3 ayrı günde deney yapılmıştır. 7., 14. ve 21. günlerde yapılan ölçümlerde sıçanlara 20 µg/kg ve 200 µg/kg olarak verilen formononetinin osteokalsin ekspresyonunda 7. günde kontrol grubu ile bir farklılık yaratmadığı, 14. günde ise kontrol grubundan yaklaşık 5 kat daha fazla osteokalsin ekspresyonu sağladığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada 3., 7., 14. ve 21. günlerde VEGF ekspresyonu incelenmiş ve 7. günde VEGF ekspresyonu deney gruplarında kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Devam eden gün gruplarında ise 20

$\mu\text{g/kg}$ ve $200 \mu\text{g/kg}$ formononetin gruplarının VEGF değerleri azalma göstermiş olup kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark gözlenmemiştir. Ayrıca formononetinin kırık bölgesinde VEGF ve VEGFR-2 artışı sağlarken defekt olmayan bölgede bir değişim olmadığı gösterilmiştir (246).

Osteokalsin seviyesinin ilk 7 günde değişmeyip sonrasında artış gösterdiği ve VEGF ekspresyonunun ilk 7 gün artarak en st seviyeye ulaşıp sonraki günlerde azalma gösterdiğini bildiren bu çalışma nedeniyle Western Blot yöntemi ile osteokalsin ve VEGF değerlerini çalışmamızın en uzun gün grubu olan 9. günde incelemeyi tercih ettik.

Osteokalsin, kemikte en fazla bulunan ve osteoblast hücrelerinden üretilen matriks proteindir. Kemik dokusuna özgü bir protein olması nedeniyle kemik metabolizması ile ilgili bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Osteokalsin, gelişme evresindeki kemikte çok miktarda bulunur ve kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayarak kemik oluşumuna katkı sağlar (58).

Bizim alışmamızda osteokalsin ekspresyonu 9. günde rölatif olarak değerlendirildi. 10 ve $100 \mu\text{g/ml}$ formononetin gruplarında kontrol grubu ile benzer miktarda osteokalsin sentezlendiği, partiküllü kemik grefti ve greft ile formononetinin birlikte bulunduğu gruplarda osteokalsin ekspresyonunun kontrol grubuna oranla yaklaşık olarak 2 kat fazla olduğu gözlenmiştir. Huh ve ark. (2010)'nın normal osteoblastlarla yaptıkları çalışmada $10 \mu\text{g/ml}$ formononetin grubunda bu artışın 14. günde gerçekleştiği bildirilmiştir. Ortamda greft materyali varlığının osteokalsin ekspresyonunu daha erkene çektiğini, formononetinin tek başına osteokalsin ekspresyonunu arttırması için daha uzun süre enkübe edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz (243).

Çalışmamızın MTT ve ALP bulguları incelendiğinde; 1. gün değerlerinin gruplar arası karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunmamıştır. Formononetinin osteoblast proliferasyonuna ya da ALP aktivitesine olası erken dönem etkilerinin tespit edilmesi amacıyla yapılan 1. gün testlerinde, bu parametrelerde ilk 24 saatte bir değişiklik yaratmadığını gözlemledik.

Ha ve ark. (2010) MG-63 ve SaOs-2 osteoblast benzeri hücreler üzerine formononetinin etkisini araştırdıkları çalışmada 3 günlük inkübasyon sonrası yaptıkları MTT testinde formononetin varlığının proliferasyona etki etmediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızın 1. gün MTT değerleri bu araştırma ile benzerlik göstermektedir (247).

Çalışmamızın 6. gün MTT bulguları gruplar arası karşılaştırıldığında partiküllü kemik grefti grubunun hücre canlılığı kontrol grubu dahil tüm gruplardan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ortamda ksenojen greft materyali varlığının, osteoblast hücrelerinin 6. güne kadarki olağan proliferasyon hızını düşürdüğü gözlenmiştir.

Bono ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada Bio-Oss ile inkübe edilmiş osteoblast benzeri MG-63 ve SaOs-2 hücrelerinin 3. ve 7. günde canlılıklarını gösterdikleri çalışmada iki hücre tipinin de hem 3. hem 7. gün gruplarında hücre canlılıklarını kontrol gruplarından anlamlı derecede düşük bulduklarını bildirmişlerdir (248). Bu çalışmanın sonuçları formononetin içermeyen deney gruplarımızdaki sonuçlara uygunluk göstermektedir.

Formononetinin farklı konsantrasyonlarda olmasının 6. günde hücre canlılığını etkilemediği ancak ortamda formononetin ile birlikte partiküllü kemik grefti varlığının proliferasyonu arttırdığı görülmüştür. 6. günde en yüksek MTT değerlerine formononetin ve partiküllü kemik greftinin birlikte bulunduğu gruplarda ulaşılmıştır. Formononetinin greft ile birlikte kullanılmasının 6. güne kadarki hücre proliferasyonunda sinerjik etki yarattığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın 9. gün MTT bulguları gruplar arası değerlendirildiğinde kontrol grubu ile 1 µg/ml formononetin grubu arasında ve partiküllü kemik grefti ile Greft + 1 µg/ml formononetin grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. 1 µg/ml'lik formononetin konsantrasyonunun 9. güne kadar olan hücre proliferasyonuna etki etmediği görülmüştür. 10 ve 100 µg/ml formononetin gruplarında doza bağlı olarak hücre canlılığının arttığı gözlenirken Greft + 10 µg/ml formononetin ve Greft + 100 µg/ml formononetin gruplarında durum tersi yönde gerçekleşmiş ve doz artışı hücre canlılığını negatif yönde etkilemiştir. Çalışmamızdaki en uzun gün grubunda en yüksek hücre canlılığına ulaşabilen grup Greft + 10 µg/ml formononetin grubu olmuştur.

Peng ve ark. (2002) farelerde yaptıkları kök hücre çalışmasında parietal kemiklerde 6 mm çapında kritik boyutlu defekt oluşturmuşlar ve bu defekti kök hücre emdirilmiş jel yapıları ile doldurup iyileşmeyi gözlemlemişlerdir. Çalışma için VEGF ve BMP-4 sentezleyecek şekilde 2 ayrı kök hücre tipi üretilmiş ve jel yapılar 1:5, 1:1, 5:1 ve sadece VEGF içerecek şekilde hazırlanarak defekt bölgesine yerleştirilmiştir. VEGF/BMP-4 oranının 1:5 ve 1:1 olduğu gruplarda tam kemik oluşumu gözlenirken, 5:1 olan grupta kısmi kemik oluşumu gözlemlendiği, sadece VEGF içeren grupta ise defektin

fibröz doku ile dolduğu ve kemik oluşumunun gözlenmediği bildirilmiştir. Çalışmada kemik defektinin iyileşmesinde uygun VEGF/BMP-4 oranının önemli olduğu, ortamda bulunan VEGF miktarının gerekenden fazla olmasının mineralizasyonu azalttığı vurgulanmıştır (249).

Biz de çalışmamızda Greft + 100 µg/ml formononetin grubunda 9. gün MTT değerlerindeki azalmayı bu grupta tespit ettiğimiz yüksek VEGF değeri ile ilişkilendirmekteyiz.

MTT bulguları gün grupları arasında değerlendirildiğinde deney süresi boyunca tüm gruplarda hücre canlılığında artış görülmüştür. Sadece partiküllü kemik grefti grubu 6. günde diğer gruplardan daha az artış göstermiştir. Ancak 9. günde partiküllü kemik grefti grubundaki bu fark kapanmış olup hücre sayısı kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızın 6. gün ALP bulguları gruplar arası karşılaştırıldığında formononetinin hem tek başına hem de partiküllü kemik grefti ile birlikte kullanıldığında ALP aktivitesinde doza bağlı bir artış sağladığı gözlenmiştir. Tek başına partiküllü kemik grefti varlığı da kontrol grubuna göre ALP aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Partiküllü kemik grefti grubunda 6. gün hücre canlılığının diğer tüm gruplardan düşük bulunmuş olmasına rağmen ALP aktivitesinin kontrol grubundan yüksek olması bu grupta yer alan sayıca az olan hücrelerin ALP sentezleme potansiyelinin fazla olduğunu göstermektedir. Greft materyalinin osteoblastlarda yarattığı bu ALP sentezleme potansiyelinin formononetin varlığında doza bağlı olarak daha da arttığı görülmektedir.

Çalışmamızın 9. gün ALP bulguları 1µg/ml formononetin grubu haricinde MTT bulgularımızla örtüşmektedir. Greft + 100 µg/ml formononetin grubundaki ALP aktivitesi artış hızının azalmasını hücre canlılığında olduğu gibi ortamdaki yüksek VEGF oranına bağlamaktayız. Ayrıca partiküllü kemik grefti grubunda 6. günden 9. güne hücre canlılığındaki artış miktarı fazla olmasına rağmen bu artışın ALP aktivitesine yansımadağı görülmektedir. ALP aktivitesinin hücre proliferasyonundan ziyade VEGF ekspresyonundan etkilendiğini düşünmekteyiz.

Street ve ark. (2002) osteoblast hücrelerinden VEGF salınımının osteoblastlar üzerinde pozitif otokrin etki gösterdiğini ve artan VEGF sekresyonunun ALP aktivitesini de arttırdığını bildirmişlerdir (245).

Çalışmamızın 1 µg/ml formononetin grubundaki 9. gün ALP aktivitesi artışını, Huh ve ark. (2010) 'nın yaptığı çalışmada gösterilen 1 µg/ml formononetinin normal osteoblastlardan BMP-2 ekspresyonunu 3. ve 7. günde arttırmış olduğu bilgisi ile ilişkilendirmektedir. Başlangıçta VEGF salınımını sağlamaya yeterli olmayan dozun 7. günden sonra VEGF sekresyonuna ve gecikmiş ALP aktivitesine neden olabileceğini düşünmekteyiz (243).

Singh ve ark. (2017) overektomi uygulanan fareler üzerinde yaptıkları çalışmada formononetinin kortikal kemik defektinin iyileşmesine ve yeni kemik yapımına olan etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar tarafından overektomi uygulanan farelerin osteopeni gelişmesi için 30 gün beklenmesinin ardından femur kemiklerine 0,6 mm çapında frezle delik açılmıştır. Fareler formononetin ve pozitif kontrol olarak da paratiroid hormonu ile defekt bölgesinin etrafına lokal enjeksiyon yoluyla tedavi edilerek iyileşmeleri 10. ve 21. günlerde değerlendirilmiştir. Her ikisinin de 21. günde benzer bir kemik iyileşmesi sağladığı µCT yöntemi ile gösterilmiştir. Araştırmacılar sakrifikasyondan sonra defekt bölgesinden alınan örneklerde BMP-2 mRNA ekspresyonunu incelemiş ve formononetin grubunda pozitif kontrol grubu dahil olmak üzere tüm gruplardan daha fazla BMP-2 ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir (250).

Deckers ve ark. (2002) preosteoblast benzeri hücrelerle yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlardaki BMP-4'ün VEGF salınımını doza bağlı olarak arttırdığını göstermişlerdir. Çalışmada BMP-2, -4 ve -6'nın osteoblast benzeri hücrelerde farklılaşmaya paralel olarak VEGF üretimini arttırdığı ve angiogenezi uyardığı bildirilmiştir (251).

Literatür taramamızdan elde ettiğimiz bilgilere dayanarak formononetinin öncelikle kemik morfogenetik proteinlerin (BMP) üretimini arttırdığını, buna bağlı olarak VEGF sentezini arttırdığını ve VEGF'nin osteoblastlarda otokrin etki göstererek ALP aktivitesini arttırdığını düşünmekteyiz.

Ha ve ark. (2010) overektomi uygulanan sıçanlar ve osteoblast benzeri MG-63 ve SaOs-2 hücre hatları ile yaptıkları çalışmada formononetinin kemik kaybını önlediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada formononetinin SaOs-2 hücrelerinde ALP aktivitesini inkübasyonun 3. gününde yaklaşık %30 oranında arttırdığı (33.0 ± 5.8) ve hücre proliferasyonunu artırma potansiyeli olduğu bildirilmiştir (247).

Huh ve ark. (2011) kordon bağı endotel hücreleri (HUVEC) ve fareler üzerinde yaptıkları çalışmada formononetinin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 1 - 10 ve 50 μ M konsantrasyonda formononetinin ve 50 ng/ml konsantrasyonda VEGF'nin hücrelerin proliferasyonuna ve damar oluşumunda görevli büyüme faktörlerinin mRNA ekspresyonlarına olan etkileri değerlendirilmiş ve formononetinin kontrol grubuna oranla PDGF, TGF- β , VEGF ve bFGF seviyelerini doza bağlı olarak önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Formononetinin 50 μ M dozda PDGF ve VEGF ekspresyonunda sağladığı artış VEGF grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada farelerde 0,5 cm çapında standart cilt biyopsi pançı ile oluşturulan yaranın iyileşmesi değerlendirilmiş, formononetin ve VEGF gruplarının yara kapanma yüzdelerinin kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Formononetin=%92.9 $\pm$ %2.8, VEGF=%94.2 $\pm$ %3.6, Kontrol=%77.7 $\pm$ %4.1)(252).

Formononetinin molekül ağırlığı 268,27 g/mol dır. Bizim çalışmamızda kullandığımız 1 - 10 ve 100 μ g/ml lik formononetin konsantrasyonları molarite olarak 3,7 μ M, 37 μ M ve 370 μ M'a denk gelmektedir. Çalışmamızda kullandığımız formononetin konsantrasyonları bu çalışmada kullanılanlarla yakın değerlerdedir.

Çalışmamızda VEGF değerleri formononetin içeren gruplarda rölatif olarak yüksek bulunmuştur. Erken dönemde yara bölgesinde yüksek VEGF salınımının ağız içi mukozal iyileşmeyi öne çekerek yaranın erken kapanmasına, bu sayede oluşan mukoza bariyeri ile kontaminasyonun daha erken dönemde engellenmesine ve kemik iyileşmesi için ideal ortamın oluşmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. VEGF artışının yeni damar oluşumu üzerine olan olumlu etkisi düşünüldüğünde, formononetinin ogmentasyon bölgesindeki iyileşmeyi erken dönemde destekleyebileceğini ve ogmentasyon alanı ne kadar erken canlılığını kazanırsa rezorpsiyonun o kadar az olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bilgilerin formononetinin kemik dokusu üzerine olan etkilerinin anlaşılabilmesi için bir baz oluşturacağı düşüncesindeyiz. Bu etkilerin daha iyi anlaşılabilmesi için formononetinin farklı dozlarda ve sürelerde etkilerinin incelendiği hücre kültürü ve hayvan deneyi çalışmaları ile desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Sonuçlar;

1. Gruplar arasında 1. gün MTT ve ALP değerlerinde fark gözlenmemiştir. Bu sonuca bağlı olarak, formononetinin veya partiküllü kemik greftinin ilk 24 saatte hücre canlılığına ya da ALP aktivitesine bir etkisinin olmadığı görülmüştür.
2. MTT bulgularında 1 µg/ml formononetin konsantrasyonunun proliferasyon hızını değiştirmek için yeterli olmadığı gözlenmiştir.
3. MTT bulgularının 6. gün değerlerine göre, partiküllü kemik grefti grubunun hücre canlılığının diğer gruplardan düşük olduğu gözlenmiştir. Tek başına greft materyalinin osteoblastlarla temas halinde olması 6. güne kadar olan hücre proliferasyonunu yavaşlatırken formononetin ile birlikte kullanılmasının proliferasyon hızını arttırdığı görülmüştür. Bulduğumuz bu sonuç greft materyali ile birlikte formononetin kullanımının ogmentasyon uygulamalarında başarıyı arttıracakı görüşümüzü kuvvetlendirmiştir.
4. MTT bulgularının 6. gün değerleri incelendiğinde, partiküllü kemik grefti grubunun kontrol grubuna oranla daha az sayıda hücre içermesine rağmen benzer miktarda ALP sentezleyebilmesi, tek başına greft materyalinin osteoblastlardan ALP salınımını arttıran bir etkisi olabileceğini göstermektedir. Buna göre artan ALP aktivitesinde sadece formononetinin değil aynı zamanda greft materyalinin de etkili olduğunu söyleyebiliriz.
5. ALP aktivitesinin 6. gün bulgularında formononetin içeren tüm gruplarda doza bağlı olarak arttığı gözlenirken, aynı gün MTT değerlerinin konsantrasyon farklarından anlamlı derecede etkilenmediği görülmüştür. Canlı hücre sayısında görülen artışın az olmasına rağmen ALP aktivitesinin anlamlı derecede artması formononetinin her bir osteoblast hücresinin ALP sentezleme kapasitesini arttırmada etkili olabileceğini göstermektedir.
6. 6. günde kültür ortamında sadece partiküllü kemik grefti ya da sadece formononetin varlığının ALP aktivitesini arttırdığı, bu artışın formononetin içeren gruplarda formononetinin dozu ile doğru orantılı olduğu ve her ikisinin birlikte kullanıldığı gruplarda sinerjik etki yaratarak en yüksek ALP değerine Graft + 100 µg/ml formononetin grubunda ulaşıldığı görülmüştür.

7. 9. günde Graft + 100 µg/ml formononetin grubunda hücre proliferasyonunun Graft + 10 µg/ml formononetin grubundan daha düşük olduğu görülmüştür. Yine 9. günde, Graft + 100 µg/ml formononetin grubunda beklenen doza bağlı ALP aktivitesi artışı gerçekleşmemiştir. Bu durumun greft materyali ve formononetinin sinerjik etki göstererek osteoblastlardan fazla VEGF salgılatmaları nedeni ile artan VEGF/BMP-4 oranının proliferasyon üzerine olan negatif etkisi sebebiyle olduğu kanaatindeyiz.
8. Kemik defektinin iyileşme sürecinde ortamda formononetin varlığının VEGF salınımını arttırarak yeni damar oluşumunda görevli endotel hücrelerini uyarma ve osteoblastlardan ALP sentezini arttırarak yeni kemik yapımını hızlandırma potansiyeli olabileceğini düşünmekteyiz. Formononetinin sistemik kullanımının ileri derecede osteoporozu olan hastaların kemik kalitelerini arttırarak patolojik ya da iyatrojenik kırıkların oluşmasının engellenmesinde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz. Formononetinin greft materyali ile birlikte lokal kullanımının ise sinerjik etki yaratarak iyileşme süresini kısaltabileceği ve greftin rezorpsiyonunun önlenmesinde etkili olabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;**11**(1): E47-51.
2. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008; **61**(5): 577-87.
3. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1092**: 385-96.
4. Akay T. *Genel Histoloji*. 6. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001. pp. 317.
5. Garg AK. *Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants: Rationale and Clinical Applications*. ABD: Quintessence Publishing Company; 2004.
6. J LC, C J. *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.; 2006. pp. 141-59.
7. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2003. pp. 144-6.
8. Kierszenbaum A. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. ABD: Elsevier Mosby Inc.; 2002. pp. 131.
9. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1996.
10. Fonseca RJ. *Oral and Maxillofacial Trauma*. 3rd ed. ABD: Elsevier Saunders; 2005.
11. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 9.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.; 1996. pp. 901-2.
12. Thibodeau GA, Patton KT. *Anatomy and Physiology*. ABD: Elsevier Mosby; 2006.
13. Gehron-Robey P, Boskey AL. *The Biochemistry of Bone*. 1996. pp. 95-184.
14. Hollinger JO, Buck CD, Bruder PS. *Biology of Bone Healing: It's Impact on Clinical Therapy*. ABD: Quintessence Publishing; 1999.

15. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; **11**(3): 279-303.
16. Bloom W, Fawcett D. *Textbook of Histology*. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1975.
17. Jee W. *Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology*. Florida: CRC Press; 2001.
18. Young B, Heath J. *Wheater's Functional Histology*. 4th ed. UK: Churchill Livingstone; 2000.
19. Parfitt A. *The Physiologic and Clinical Significance of Bone Histomorphometric Data. Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretations*. Florida: CRC Press; 1983. pp. 143-223.
20. Erkoçak A. *Genel Histoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 1980. pp. 236-57.
21. Puzas F, Lewis G. Biology of osteoclasts and osteoblasts. İçinde Bronner F, Worrell RV editörler. *Orthopedics: Principles of Basic and Clinical Science Orthopaedics*. Florida: CRC Press; 1999.
22. Rose FRAJ, Oreffo ROC. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **292**(1): 1-7.
23. Becker KL. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Philadelphia: J.B. Lippincott Co; 1990.
24. Rothman RH, Simeone FA. *The Spine*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1975.
25. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998;**102**(2):274-82.
26. Garant PR. *Oral Cells and Tissues*. ABD: Quintessence Publishing Company; 2003.

27. Doblaré M, García JM, Gómez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng Fract Mech* 2004; **71**(13–14): 1809-40.
28. Gürsoy N. *Ortodontinin Biyolojik Temelleri: Kafa, Yüz, Çene Büyüme ve Gelişimi*. İstanbul: Doyuran Matbaası; 1978.
29. Paker S. *Histoloji*. 2. baskı. Bursa: Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı; 1993.
30. Rubin E, Farber JL. *Pathology*. Philadelphia: JB Lippincott Comp.; 1988.
31. Martin RB, Burr DB. *Structure, Function, and Adaptation of Compact Bone*. New York: Raven Press; 1989.
32. Gartner LP. *Color Textbook of Histology*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2001.
33. Ross MH, Gordon IK, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. pp. 180-213.
34. Cibicková L, Palicka V, Cibicek N, Cermáková E, Micuda S, Bartosová L ve ark. Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. *Physiol Res* 2007; **56**(6): 765-70.
35. Tunçay ÖE. Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans tezi, Ankara; 2013.
36. Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh JL. Bone and joint healing. İçinde Bucholz RW, Heckman JD, Court-Brown C, editörler. *Rockwood and Green's Fractures in Adults*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
37. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 2001; **10**(4): 1-4.
38. Parfitt AM. Problems in the application of in vitro systems to the study of human bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 1995; **56**(1): S5-7.
39. Peterson MC, Riggs MM. A physiologically based mathematical model of integrated calcium homeostasis and bone remodeling. *Bone* 2010; **46**(1): 49-63.
40. Henriksen K, Neutsky-Wulff A V, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* 2009; **44**(6): 1026-33.

41. Meade JB, Cowin SC, Klawitter JJ, Van Buskirk WC, Skinner HB. Bone remodeling due to continuously applied loads. *Calcif Tissue Int* 1984; **36**(1): S25-30.
42. Soydan N. *Genel Histoloji*. İstanbul: İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi; 1992.
43. Cruess RL. Healing of bone, tendon, and ligament. İçinde Rockwood CA Jr, Green DP, editörler. *Fracture in Adults vol 1*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Co; 1984. pp. 147-67.
44. Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel Histoloji*. 10. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi Ltd. Şti.; 2003. pp. 213-20.
45. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 1993; **53**(1): S102-7.
46. Leeson T, Leeson C. *Histology*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1976. pp. 144-64.
47. Alturfan A, Akalın Y. *Ortopodik Travmatoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.; 2002. pp. 10-4.
48. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. *İnsan Biyokimyası*, Ankara: Palme Yayıncılık; 2002. pp. 711.
49. Magnusson P, Degerblad M, Sääf M, Larsson L, Thorén M. Different responses of bone alkaline phosphatase isoforms during recombinant insulin-like growth factor-I (IGF-I) and during growth hormone therapy in adults with growth hormone deficiency. *J Bone Miner Res* 1997; **12**(2): 210-20.
50. Uzunoğlu N. Alkalen fosfataz enziminin fizikokimyasal özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1998; **18**(2): 69-76.
51. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MW, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res* 1999; **14**(11): 1926-33.
52. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006; **235**(1): 176-90.

53. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J, Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000; **11**: S2-17.
54. Fedde KN. Human osteosarcoma cells spontaneously release matrix-vesicle-like structures with the capacity to mineralize. *Bone Miner* 1992; **17**(2): 145-51.
55. Millett PJ. Investigations into the activity of osteoblasts in vitro and in vivo. University of Cambridge Yüksek Lisans Tezi; 1994.
56. Skjodt H, Russell G. Bone cell biology and the regulation of bone turnover. İçinde Gowen M, editör. *Cytokines and Bone*. Londra: CRC Press; 1992. pp. 1-70.
57. Delmas PD. What do we know about biochemical bone markers? *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1991; **5**(4): 817-30.
58. Kayaalp O. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: Pelikan Yayınevi; 1998. pp. 1026-57.
59. Çay HF, Sezer N. Kemik yapısı ve kemik döngüsü üzerine bir derleme. *Fiz Tıp* 2002; **5**(3): 177-84.
60. Haspolat K, Soker M. Kemiğe ait biyokimyasal değerler ve onkoloji. *Dicle Tıp Derg Journal Med Sch* 2002; **29**(3): 83-90.
61. Seibel MJ, Woitge HW, Pecherstorfer M, Karmatschek M, Horn E, Ludwig H ve ark. Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**(9): 3289-94.
62. Yoon K, Buenaga R, Rodan GA. Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **148**(3): 1129-36.
63. Gehron RP. The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; **18**(4): 858.
64. Murakami N, Saito N, Takahashi J, Ota H, Horiuchi H, Nawata M ve ark. Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier. *Biomaterials* 2003; **24**(13): 2153-9.

65. Parborell F, Irusta G, Vitale A, Gonzalez O, Pecci A, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone antagonist antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Reprod* 2005; **72**(3): 659-66.
66. Kumar DM, Simpkins JW, Agarwal N. Estrogens and neuroprotection in retinal diseases. *Mol Vis* 2008; **14**: 1480-6.
67. Fadini GP, Albiero M, Cignarella A, Bolego C, Pinna C, Boscaro E ve ark. Effects of androgens on endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Clin Sci (Lond)* 2009; **117**(10): 355-64.
68. Tomikawa J, Homma T, Tajima S, Shibata T, Inamoto Y, Takase K ve ark. Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KISS1 gene in the pig. *Biol Reprod* 2010; **82**(2): 313-9.
69. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 1998; **19**(4): 253-86.
70. Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M ve ark. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; **74**(5): 279-85.
71. Matthews J, Gustafsson J-A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 2003; **3**(5): 281-92.
72. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* 2008; **6**: e003.
73. Cheung E, Schwabish MA, Kraus WL. Chromatin exposes intrinsic differences in the transcriptional activities of estrogen receptors alpha and beta. *EMBO J* 2003; **22**(3): 600-11.
74. Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA ve ark. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a ying yang relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 2003; **17**(2): 203-8.
75. Monroe DG, Getz BJ, Johnsen SA, Riggs BL, Khosla S, Spelsberg TC. Estrogen receptor isoform-specific regulation of endogenous gene expression in human

osteoblastic cell lines expressing either ERalpha or ERbeta. *J Cell Biochem* 2003; **90**(2): 315-26.

76. Chang EC, Charn TH, Park S-H, Helferich WG, Komm B, Katzenellenbogen JA. Estrogen Receptors alpha and beta as determinants of gene expression: influence of ligand, dose, and chromatin binding. *Mol Endocrinol* 2008; **22**(5): 1032-43.

77. Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2009; **308**(1-2): 9-16.

78. Sica M, Martini M, Viglietti-Panzica C, Panzica G. Estrous cycle influences the expression of neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamus and limbic system of female mice. *BMC Neurosci* 2009; **10**: 78.

79. He Z, He YJ, Day AL, Simpkins JW. Proestrus levels of estradiol during transient global cerebral ischemia improves the histological outcome of the hippocampal CA1 region: perfusion-dependent and-independent mechanisms. *J Neurol Sci* 2002; **193**(2): 79-87.

80. Vasudevan N, Pfaff DW. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol* 2008; **29**(2): 238-57.

81. Boulware MI, Mermelstein PG. Membrane estrogen receptors activate metabotropic glutamate receptors to influence nervous system physiology. *Steroids* 2009; **74**(7): 608-13.

82. Hirahara Y, Matsuda K-I, Gao W, Arvanitis DN, Kawata M, Boggs JM. The localization and non-genomic function of the membrane-associated estrogen receptor in oligodendrocytes. *Glia* 2009; **57**(2): 153-65.

83. Mermelstein PG. Membrane-localised oestrogen receptor alpha and beta influence neuronal activity through activation of metabotropic glutamate receptors. *J Neuroendocrinol* 2009; **21**(4): 257-62.

84. Sieck GC. Genome and hormones: an integrated approach to gender differences in physiology. *J Appl Physiol (1985)*. 2001; **91**(4): 1485-6.

85. Choudhry MA, McEwan IJ. In vitro regulation of reporter gene transcription by the androgen receptor AF1 domain. *Biochem Soc Trans* 2004; **32**(Pt 6): 1103-6.

86. Lavery DN, McEwan IJ. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J* 2005; **391**(Pt 3): 449-64.
87. Choudhry MA, Ball A, McEwan IJ. The role of the general transcription factor IIF in androgen receptor-dependent transcription. *Mol Endocrinol* 2006; **20**(9): 2052-61.
88. Lavery DN, McEwan IJ. The human androgen receptor AF1 transactivation domain: interactions with transcription factor IIF and molten-globule-like structural characteristics. *Biochem Soc Trans* 2006; **34**(Pt 6): 1054-7.
89. Teng J, Wang ZY, Jarrard DF, Bjorling DE. Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. *Endocr Relat Cancer* 2008; **15**(1): 351-64.
90. Ahmed SA, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, Karpuzoglu-Sahin E. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 1999; **107**(Suppl 5): 681-6.
91. Wen L, Chen LH, Li HY, Chang SP, Liao CY, Tsui KH ve ark. Roles of estrogen and progesterone in endometrial hemodynamics and vascular endothelial growth factor production. *J Chin Med Assoc* 2009; **72**(4): 188-93.
92. Altunkaynak B zuha., Ünal D, Aksak S, Ünal B. Östrojen hormonu ve menopoz. *J Exp Clin Med* 2012; **29**: 252-6.
93. Pernow Y, Hauge EM, Linder K, Dahl E, Sääf M. Bone histomorphometry in male idiopathic osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2009; **84**(6): 430-8.
94. Hansen M, Koskinen SO, Petersen SG, Doessing S, Frystyk J, Flyvbjerg A ve ark. Ethinyl oestradiol administration in women suppresses synthesis of collagen in tendon in response to exercise. *J Physiol* 2008; **586**(12): 3005-16.
95. Büyüktuncer Z, Başaran AA. Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczac Fakültesi Derg* 2005; **2**: 79-94.
96. Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* 2003; **17**(8): 845-69.
97. Loewe S, Lange F, Spohr E. Über weibliche sexual hormone (Thelytropine). *Biochem Zeitschr* 1927; **180**: 1-26.

98. Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust Vet J* 1946; **22**(1): 2-12.
99. Rossiter R.C., Beck A.B. Physiological and ecological studies on the estrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) I. Effects of temperature. *Aust J Agric Res* 1966; **17**: 29-37.
100. Morley FHW, Francis CM. Varietal and environmental variations in isoflavone concentrations in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Aust J Agric Res* 1968; **19**(1): 15-26.
101. Shutt DA, Axelsen A, Lindner HR. Free and conjugated isoflavones in the plasma of sheep following ingestion of oestrogenic clover. *Aust J Agric Res* 1967; **18**(4): 647-55.
102. Shutt DA. The effects of plant oestrogens on animal reproduction. *Endeavour* 1976; **35**(126): 110-3.
103. Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 2004; **65**(8): 995-1016.
104. Büyüktuncer Z. Fitoöstrojenlerin menopoz üzerine etkileri. İçinde *IV Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi Bildiriler Kitabı*; 2000. pp. 67.
105. Martini MC, Dancisak BB, Haggans CJ, Thomas W, Slavin JL. Effects of soy intake on sex hormone metabolism in premenopausal women. *Nutr Cancer* 1999; **34**(2): 133-9.
106. Vincent A, Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: are they useful in menopause? *Mayo Clin Proc* 2000; **75**(11): 1174-84.
107. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric* 2000; **80**(7): 1044-62.
108. Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A. Phyto-oestrogens: where are we now? *Br J Nutr* 1998; **79**(5): 393-406.
109. Messina M, Gugger ET, Alekel DL. Soy protein, soybean isoflavones, and bone health: a review of the animal and human data. İçinde Wildman RE, editor. *Nutraceuticals and Functional Foods*. ABD: CRC Press; 2001. pp.77-98.

110. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann Med* 1997; **29**(2): 95-120.
111. Davis SR, Dalais FS, Simpson ER, Murkies AL. Phytoestrogens in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1999; **54**: 185-210; discussion 210-1.
112. Morris D. Hormone replacement therapy and coronary artery disease. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1996; **8**(3): 184-7.
113. Collins BM, McLachlan JA, Arnold SF. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* 1997; **62**(4): 365-72.
114. Djuric Z, Chen G, Doerge DR, Heilbrun LK, Kucuk O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett* 2001; **172**(1): 1-6.
115. Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol* 1996; **87**(5 Pt 2): 897-904.
116. Umland EM, Cauffield JS, Kirk JK, Thomason TE. Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. *Pharmacotherapy* 2000; **20**(8): 981-90.
117. Jacobs MN, Lewis DF V. Steroid hormone receptors and dietary ligands: a selected review. *Proc Nutr Soc* 2002; **61**(1): 105-22.
118. Burke GL, Vitolins MZ, Bland D. Soybean isoflavones as an alternative to traditional hormone replacement therapy: are we there yet? *J Nutr* 2000; **130**(3): 664S-5S.
119. Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 2004; **91**(4): 513-31.
120. Wilson T, Murphy PA. Health benefits of soy isoflavones. İçinde Wilson T, Temple NJ, editor. *Nutritional Health*. Totowa, NJ: Humana Press; 2001. pp. 75-88.
121. Mazur W. Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998; **12**(4): 729-42.

122. Albertazzi P, Purdie D. The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas* 2002; **42**(3): 173-85.
123. Reinli K, Block G. Phytoestrogen content of foods-a compendium of literature values. *Nutr Cancer* 1996; **26**(2): 123-48.
124. Adlercreutz H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1990; **201**: 3-23.
125. Mazur W, Adlercreutz H. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition* 2000; **16**(7-8): 654-8.
126. Axelson M, Sjövall J, Gustafsson BE, Setchell KD. Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature* 1982; **298**(5875): 659-60.
127. Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer* 1991; **16**(1): 43-52.
128. Raffaelli B, Hoikkala A, Leppälä E, Wähälä K. Enterolignans. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; **777**(1-2): 29-43.
129. Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; **17**(2): 253-71.
130. Begum AN, Nicolle C, Mila I, Lapierre C, Nagano K, Fukushima K ve ark. Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J Nutr* 2004; **134**(1): 120-7.
131. Fletcher RJ. Food sources of phyto-oestrogens and their precursors in Europe. *Br J Nutr* 2003; **89**(Suppl 1): S39-43.
132. Clavel T, Doré J, Blaut M. Bioavailability of lignans in human subjects. *Nutr Res Rev* 2006; **19**(2): 187-96.
133. Kitts DD, Yuan YV, Wijewickreme AN, Thompson LU. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol Cell Biochem* 1999; **202**(1): 91-100.

134. Saarinen NM, Penttinen PE, Smeds AI, Hurmerinta TT, Mäkelä SI. Structural determinants of plant lignans for growth of mammary tumors and hormonal responses in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **93**(2): 209–19.
135. Wang LQ. Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr B* 2002; **777**(1): 289–309.
136. Kuijsten A, Arts ICW, Vree TB, Hollman PCH. Pharmacokinetics of enterolignans in healthy men and women consuming a single dose of secoisolariciresinol diglucoside. *J Nutr* 2005; **135**(4): 795–801.
137. Clavel T, Borrmann D, Braune A, Doré J, Blaut M. Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. *Anaerobe* 2006; **12**(3): 140–7.
138. Bickoff EM, Booth AN, Lyman RL, Livingston AL, Thompson CR, Deeds F. Coumestrol, a new estrogen isolated from forage crops. *Science* 1957; **126**: 969–70.
139. Keinan-Boker L, van Der Schouw YT, Grobbee DE, Peeters PHM. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2004; **79**(2): 282–8.
140. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2000; **72**(3): 844–52.
141. Gambacciani M, Ciapponi M, Cappagli B, Piaggese L, Genazzani AR. Effects of combined low dose of the isoflavone derivative ipriflavone and estrogen replacement on bone mineral density and metabolism in postmenopausal women. *Maturitas* 1997; **28**(1): 75–81.
142. Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N ve ark. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 2002; **17**(10): 1904–12.
143. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman Jr JW. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1998; **68**(6): 1375S–9S.

144. Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Grobbee DE, de Haan EHF, Aleman A, Lampe JW ve ark. Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; **292**(1): 65–74.
145. Tempfer CB, Bentz E-K, Leodolter S, Tscherne G, Reuss F, Cross HS ve ark. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. *Fertil Steril* 2007; **87**(6): 1243–9.
146. John JB, Garner SC. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr Res* 1997; **17**(10): 1617–32.
147. Kanno S, Hirano S, Kayama F. Effects of the phytoestrogen coumestrol on RANK-ligand-induced differentiation of osteoclasts. *Toxicology* 2004; **203**(1): 211–20.
148. Pan W, Quarles LD, Song LH, Yu YH, Jiao C, Tang HB ve ark. Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *J Cell Biochem* 2005; **94**(2): 307–16.
149. Setchell KDR, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2003; **78**(3): 593S-609S.
150. Usui T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J* 2006; **53**(1): 7–20.
151. Merz-Demlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR ve ark. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**(6): 1462–9.
152. Puska P, Korpelainen V, Høie LH, Skovlund E, Lahti T, Smerud KT. Soy in hypercholesterolaemia: a double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2002; **56**(4): 352–7.
153. Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR ve ark. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 2000; **72**(2): 395–400.
154. Nestel PJ, Yamashita T, Sasahara T, Pomeroy S, Dart A, Komesaroff P ve ark. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in

menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**(12): 3392–8.

155. Clarkson TB. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr* 2002; **132**(3): 566S–9S.

156. Wroblewski Lissin L, Cooke JP. Phytoestrogens and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol* 2000; **35**(6): 1403–10.

157. Hale G, Paul-Labrador M, Dwyer JH, Merz CNB. Isoflavone supplementation and endothelial function in menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; **56**(6): 693–701.

158. Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D. Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr* 2001; **131**(4): 1202–6.

159. Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 1998; **19**(12): 2151–8.

160. Lee HP, Lee J, Gourley L, Duffy SW, Day NE, Estève J. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 1991; **337**(8751): 1197–200.

161. Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr* 2000; **71**(6): 1705S–7S.

162. Bouker KB, Hilakivi-Clarke L. Genistein: does it prevent or promote breast cancer? *Environ Health Perspect* 2000; **108**(8): 701–8.

163. Fitzpatrick LA. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the postmenopausal woman. *Mayo Clin Proc* 1999; **74**(6): 601–7.

164. Brandi ML. Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. *Calcif Tissue Int* 1997; **61**(1): S5–8.

165. Morelli V, Naquin C. Alternative therapies for traditional disease states: menopause. *Am Fam Physician* 2002; **66**(1): 129–34.

166. Setchell KDR. Soy isoflavones—benefits and risks from nature’s selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 2001; **20**(sup5): 354S–62S.

167. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. *J Clin Periodontol* 1999; **26**(4): 239–45.
168. Marinak KW, Mellonig JT, Towle HJ. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. *J Periodontol* 1989; **60**(1): 12–8.
169. Tadjoeidin ES, De Lange GL, Bronckers ALJJ, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss®) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 2003; **30**(3): 261-70.
170. Tuskan C, Yaltırık M. *Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateriyaller*. İstanbul: İÜ Basım ve Yayınevi Müdürlüğü; 2002.
171. Urist MR, Jurist JM Jr, Dubuc FL, Strates BS. Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1970; **68**: 279-93.
172. Walters SP, Greenwell H, Hill M, Drisko C, Pickman K, Scheetz JP. Comparison of porous and non-porous teflon membranes plus a xenograft in the treatment of vertical osseous defects: a clinical reentry study. *J Periodontol* 2003; **74**(8): 1161–8.
173. Beeson WH. Plaster of paris as an alloplastic implant in the frontal sinus. *Arch Otolaryngol* 1981; **107**(11): 664–9.
174. Begley CT, Doherty MJ, Hankey DP, Wilson DJ. The culture of human osteoblasts upon bone graft substitutes. *Bone* 1993; **14**(4): 661–6.
175. Bifano CA, Edgin WA, Colleton C, Bifano SL, Constantino PD. Preliminary evaluation of hydroxyapatite cement as an augmentation device in the edentulous atrophic canine mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; **85**(5): 512-6.
176. Jee WSS. Structure and function of bone tissue. İçinde Bronner F, Worrell RV editörler. *Orthopedics: Principles of Basic and Clinical Science*. Florida: CRC Press; 1999.
177. Sautier JM, Nefussi JR, Boulekbache H, Forest N. In vitro bone formation on coral granules. *Vitr Cell Dev Biol J Tissue Cult Assoc* 1990; **26**(11): 1079–85.

178. den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res* 2003; **21**(3): 521-8
179. Güven O, Saraçoğlu U. Bir santral odontojenik fibroma vakasında otojen kemik grefti ve implant uygulaması: vaka raporu. *Türkiye Klinikleri J Dental Sci* 2000; **6**(3): 158-62
180. Pompili A, Caroli F, Carpanese L, Caterino M, Raus L, Sestili G ve ark. Cranioplasty performed with a new osteoconductive, osteoinducing hydroxyapatite-derived material. *J Neurosurg* 1998; **89**(2): 236-42.
181. Gomi K, Lowenberg B, Shapiro G, Davies JE. Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 1993; **14**(2): 91-6.
182. Kirschner RE, Karmacharya J, Ong G, Hunenko O, Losee JE, Martin B ve ark. Synthetic hybrid grafts for craniofacial reconstruction: sustained gene delivery using a calcium phosphate bone mineral substitute. *Ann Plast Surg* 2001; **46**(5): 538-45.
183. Burdick JA, Frankel D, Dornell WS, Anseth KS. An initial investigation of photocurable three-dimensional lactic acid-based scaffolds in a critical-sized cranial defect. *Biomaterials* 2003; **24**(9): 1613-20.
184. Özyuvacı H. Yetersiz kemik desteği olan maksiller posterior bölgede alloplastik kemik greftleri ve silindirik implant uygulamaları. *Akad Dent Dışhekimliği Derg* 2001; **3**(2): 4-9.
185. Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontol 2000* 1999; **19**: 74-86.
186. Alfaro FH, editör. *Bone Grafting in Oral Implantology: Techniques and Clinical Applications*. ABD: Quintessence Publishing; 2006.
187. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006; **10**(1):7-19.
188. Yoshikawa T, Ohgushi H, Akahane M, Tamai S, Ichijima K. Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow/hydroxyapatite construct implanted at ectopic

sites: A comparison with the osteogenic ability of cancellous bone. *J Biomed Mater Res* 1998; **41**(4): 568–73.

189. Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1996; **32**(3): 481–92.

190. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 2006; **3**(1): 49–57.

191. Kruger GO. *Textbook of Oral Surgery*. Toronto: The C.V. Mosby Company; 1974. pp. 265–78.

192. Bernstein S, Cooke J, Fotek P, Wang H-L. Vertical bone augmentation: where are we now? *Implant Dent* 2006; **15**(3): 219-28.

193. Ersu B. İmplant diş hekimliğinde kullanılan ağız içi otojen kemik greftleri. *Cum Üni Diş Hek Fak Derg* 2007; **10**: 135–6.

194. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; **3**(3): 192–5.

195. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995; **33**(5): 312–8.

196. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 2004; **13**(4): 301–9.

197. Kübler N, Reuther J, Kirchner T, Priessnitz B, Sebald W. Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogeneic human bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; **51**(12): 1346-57.

198. Carranza FA, Newman MG. *Clinical Periodontology*. 8th ed. ABD: W.B. Saunders Company; 1996.

199. Revell PA. Necrosis and healing in bone. İçinde Revell PA, editor. *Pathology of Bone*. Londra: Springer; 1986. pp. 203–34.

200. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000; (371): 10–27.

201. Okumuş Z, Yıldırım Ö. The cuttlefish backbone: a new bone xenograft material. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; **29**: 1177–84.

202. Schmidmaier G, Capanna R, Wildemann B, Beque T, Lowenberg D. Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options? *Injury* 2009; **40**(Suppl 3): S39-43.
203. Kökden A, Türker M. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateriyaller. *Cum Ünv Dis Hek Fak Derg* 1999; **2**(2): 134-40.
204. Tofe AJ, Watson BA, Bowerman MA. Solution and cell mediated resorption of grafting materials. *J Oral Implantol* 1991; **17**: 345.
205. Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; **35**(8): 708-13.
206. Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dent* 1993; **2**(3): 151-6.
207. Tadjoeidin ES, De Lange GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Burger EH. High concentrations of bioactive glass material (BioGran®) vs. autogenous bone for sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 2002; **13**(4): 428-36.
208. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler. *Totbid Derg* 2004; **3**: 11-24.
209. Doyle A, Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures in Biotechnology*. UK: John Wiley & Sons Ltd; 1998.
210. Helfrich MH, Ralston SH. *Bone Research Protocols*. Totowa: Humana Press Inc.; 2003.
211. Freshney RI. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. 3rd ed. New York: Wiley-Liss Inc.; 1994.
212. Aydınтуğ YS, Mutlu İ. *Hücre Kültürü ve Diş Hekimliğindeki Uygulamaları*. Ankara: GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi; 2003. pp. 2-22.
213. Davis J. *Basic Cell Culture*. UK: Oxford Uni. Press; 1994.

214. Çiçek C, Bilgiç A. Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı: bir model. *İnfeksiyon Derg (Turkish J Infect)* 2006; **20**(3): 231–41.
215. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 1996; **12**(3): 186–93.
216. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994; **22** Suppl 2: S6-11.
217. Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH, Nelson J. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Arch Oral Biol* 1985; **30**(8): 609–13.
218. Spier R, Griffiths J. *Animal Cell Biotechnology. Volume 1: Cell Biology Experimental Aspects*. Londra: Academic Pres Inc; 1985.
219. Topal ŞR. *Hücre Kültür Teknikleri-II Uygulamalar*. İstanbul: Cem Turan Ofset Matbaası; 2004.
220. Öztürk SS. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. Florida: CRC press; 2006.
221. Harrison M, Rae I. *General Techniques of Cell Culture*. Cambridge: Cambridge University Press; 1997.
222. Scott M, Bentley C, Marshall C. *Setting Up a New Cell Culture Laboratory, in Animal Cell Biotechnology*. Indianapolis: Humana Press; 1999.
223. Vellonen KS, Honkakoski P, Urtti A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur J Pharm Sci* 2004; **23**(2): 181-8.
224. van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* 1991; **141**(1): 15–22.
225. Wilson JK, Sargent JM, Elgie AW, Hill JG, Taylor CG. A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *Br J Cancer* 1990; **62**(2): 189–94.

226. Uo M, Sjögren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater* 2003; **19**(6): 487–92.
227. Wise C. *Epithelial Cell Culture Protocols in Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press; 2002.
228. Holst-Hansen C, Brünner N. *MTT- Cell Proliferation Assay, In Cell Biology*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1998.
229. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(5259): 680–5.
230. Huh JE, Lee WI, Kang JW, Nam D, Choi DY, Park DS ve ark. Formononetin attenuates osteoclastogenesis via suppressing the RANKL-induced activation of NF- κ B, c-Fos, and nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 signaling pathway. *J Nat Prod* 2014; **77**(11): 2423–31.
231. Liu X, Zhang R, Zhou Y, Yang Y, Si H, Li X ve ark. The effect of Astragalus extractive on alveolar bone rebuilding progress of tooth extracted socket of ovariectomied rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2014; **11**(5): 91-8.
232. Tyagi AM, Srivastava K, Singh AK, Kumar A, Changkija B, Pandey R ve ark. Formononetin reverses established osteopenia in adult ovariectomized rats. *Menopause* 2012; **19**(8): 856–63.
233. Kaczmarczyk-Sedlak I, Wojnar W, Zych M, Ozimina-Kamińska E, Taranowicz J, Siwek A. Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; **2013**: 457052.
234. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater* 2012; **24**: 1-17.
235. Liang W, Lin M, Li X, Li C, Gao B, Gan H ve ark. Icariin promotes bone formation via the BMP-2/Smad4 signal transduction pathway in the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line. *Int J Mol Med* 2012; **30**(4): 889–95.
236. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod* 2002; **28**(3): 188–92.

237. Vajrabhaya L, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent* 2003; **28**(4): 440–4.
238. Ergün G, Eğılmez F, Uçtaşı MB, Yılmaz S. Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. *Int Endod J* 2007; **40**(3): 216–23.
239. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 1996; **104**(3): 292–9.
240. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent Mater* 1992; **8**(1): 65–70.
241. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol Biol* 2015; **1250**: 333–48.
242. Palermo C, Manduca P, Gaggero E, Foppiani L, Segat D, Barreca A. Potentiating role of IGF-BP-2 on IGF-II-stimulated alkaline phosphatase activity in differentiating osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **286**(4): E648-57.
243. Huh JE, Seo DM, Baek YH, Choi DY, Park DS, Lee JD. Biphasic positive effect of formononetin on metabolic activity of human normal and osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Int Immunopharmacol* 2010; **10**(4): 500–7.
244. Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H ve ark. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; **15**(2): 169–80.
245. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FVJ, Ferrara N ve ark. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(15): 9656–61.
246. Huh JE, Kwon NH, Baek YH, Lee JD, Choi DY, Jingushi S ve ark. Formononetin promotes early fracture healing through stimulating angiogenesis by up-regulating VEGFR-2/Flk-1 in a rat fracture model. *Int Immunopharmacol* 2009; **9**(12): 1357–65.
247. Ha H, Lee HY, Lee JH, Jung D, Choi J, Song KY ve ark. Formononetin prevents ovariectomy-induced bone loss in rats. *Arch Pharm Res* 2010; **33**(4):625–32.
248. Bono N, Tarsini P, Candiani G. Demineralized dentin and enamel matrices as suitable substrates for bone regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater* 2017; **15**(3): e236–43.

249. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen H-C, Cummins J ve ark. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 2002; **110**(6): 751–9.
250. Singh KB, Dixit M, Dev K, Maurya R, Singh D. Formononetin, a methoxy isoflavone, enhances bone regeneration in a mouse model of cortical bone defect. *Br J Nutr* 2017; **117**(11): 1511–22.
251. Deckers MML, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE ve ark. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002; **143**(4): 1545–53.
252. Huh JE, Nam DW, Baek YH, Kang JW, Park DS, Choi DY ve ark. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *Int Immunopharmacol* 2011; **11**(1): 46–54.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FORMONONETİN MOLEKÜLÜNÜN OSTEOLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN IN VITRO İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 8	% 4	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

TÜM KAYNAKLARI EŞLEŞTİR (SADECE SEÇİLİ OLAN KAYNAĞI YAZDIR)

%7

★ Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

Alıntılan çıkart	üzerinde	Eşleşmeleri çıkar	< 5 words
Bibliyografyayı Çıkart	üzerinde		

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Deniz	Soyadı	Başaran
Doğ.Yeri	Sofya	Doğ.Tar.	09.08.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	61861120702
Email	dentiz@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2011
Lise	İstek Kaşgarlı Mahmut Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Diş Hekimi	Özel Muayenehane	2015-Halen
2.	Diş Hekimi	Medipol Üniversitesi Diş Hastanesi	2011-2015
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	-	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):



