



T.C.

**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**RATLARDA LOKAL VE SİSTEMİK ARI SÜTÜ İLE BİRLİKTE
DEMİNERALİZE KEMİK GREFTİ UYGULAMALARININ
KALVARYAL KEMİK DEFEKTİ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Sinan BULUT

**AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ**

**Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 2017.06.01.1181)**

**MART 2018
BOLU**

TEZ ONAY BELGESİ

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
Tez Onay Belgesi

Tezin Başlığı

Rallarda Lokal ve Sistemik Akut Sızma ile Bilirubinemi ve
Kant Gırtlak Ağrılarının Klinik ve Laboratuvar İyileşmesi

Tezin Savunma Tarihi

20.03.2018

Tezin Danışmanı

Doç. Dr. Orhan TOPTAŞ

Jüri Başkanı

Orhan TOPTAŞ

Üye

Uğur GÜLER

Üye

Harif KIRIN

DEKANLIK ONAYI

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Hasan ORUÇOĞLU

DEKAN V.

ÖZET

RATLARDA LOKAL VE SİSTEMİK ARI SÜTÜ İLE BİRLİKTE DEMİNERALİZE KEMİK GREFTİ UYGULAMALARININ KALVARYAL KEMİK DEFECTİ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, rat kalvaryal defekt modelinde lokal ve sistemik arı sütünün kemik iyileşmesi üzerine etkisini histolojik olarak incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 18 adet 250-300 gr ağırlığında, iki aylık Albino-Wistar cinsi yetişkin erkek rat kullanıldı. Sham grubu (tedavi uygulanmadı), kontrol grubu (sadece demineralize kemik matrisi), lokal arı sütü grubu (demineralize kemik matriksi ve lokal arı sütü - 50 mg/ml 5 dakika boyunca) ve sistemik arı sütü grubu (demineralize kemik matriksi ve sistemik arı sütü - 8 hafta boyunca günde 100 mg/kg) olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Her bir hayvanın parietal kemiğinde standart bir trefayn frez yardımıyla dura matere zarar vermeden 5 mm çaplı kalvaryal defekt meydana getirildi. Sham ve kontrol grubu için defektler aynı rat kalvaryası üzerinde bilateral olarak hazırlanarak denek sayısı azaltıldı. Deney gruplarındaki defektler sadece sagittal süturun sağ tarafında hazırlandı. Hayvanlar ameliyattan 8 hafta sonra sakrifiye edildi. Kalvaryal defekt alanı en blok şeklinde çıkarıldı. Alınan kesitler yeni kemik oluşumu, anjiyogenezis ve RANKL(Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand) eksprese eden osteoblast değerleri açısından histolojik olarak incelendi.

Sonuç: Yeni kemik kalitesi ve anjiyogenezis, sistemik arı sütü grubunda sham ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksekti. RANKL ekspresyonu, sistemik arı sütü grubunda sham ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktü. Arı sütü lokal uygulamanın istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunamadı.

Tartışma: Çalışmanın sınırları dahilinde, rat kalvaryal defekt modelinde demineralize kemik matrisi ile sistemik olarak uygulanan arı sütü, kemik rejenerasyonunu arttırmıştır. Arı sütünün kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Arı sütü, demineralize kemik matriksi, kemik iyileşmesi, kritik boyut kemik defekti.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTS OF LOCAL AND SYSTEMIC APPLICATION OF ROYAL JELLY WITH DEMINERALIZED BONE GRAFT ON HEALING OF CALVARIAL BONE DEFECTS IN RATS

Objective: The aim of this study was to evaluate histological effects of local and systemic applications of royal jelly on osseous wound healing in a rat calvarial defect model.

Materials and Methods: Eighteen male 2-months-old Albino-Wistar adult rats, weighing 250-300 g were used in the study. A total of 4 groups including a sham group (non-treatment), a control group(only demineralized bone matrix), local royal jelly group (demineralized bone matrix with local royal jelly-50mg/ml for 5 min) and systemic royal jelly group (demineralized bone matrix with systemic royal jelly- 100mg/kg body weight per day for 8 weeks) were formed. On each animal, a-5 mm diameter calvarial defect was created with a standard trephine bur in the parietal bone without damaging the underlying dura mater. To reduce the number of animal, defects were prepared bilaterally on the same rat calvaria for sham and control groups. The defects in the experimental groups only prepared on the right side of the sagittal sutures. The animals were sacrificed at the end of 8th week after the surgery. The original defect area was removed from the animal's calvarium bone by en bloc resection. New bone formation, angiogenesis and osteoblasts expressing RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand) were examined histologically in the sections.

Results: The new bone quality and angiogenesis were significantly increased in the systemic royal jelly group when compared to the sham and control groups. The RANKL expression was significantly lower in the systemic royal jelly group than the sham and control groups' RANKL expressions. No statistically significant effect of local administration of royal jelly was found.

Conclusion: Within the limits of the study, the combination of systemic administration of royal jelly and demineralized bone matrix increased the bone regeneration in the rat calvarial defect model. Further studies are needed to explain the effects of royal jelly on bone healing.

Keywords: Bone healing, critical-sized bone defect, demineralized bone matrix, royal jelly

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her basamağında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel ve teknik olarak çalışma boyunca hoşgörüsüyle yol gösteren, uzmanlık ve klinik çalışma sürem boyunca desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve aynı zamanda Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ'a,

Bölümümüze geldiği günden beri gösterdiği ilgi ve destek ile cerrahideki gelişimimize katkı sağlayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Sadi MEMİŞ'e,

Uzmanlık sürem boyunca hem klinik içi hem de klinik dışında eğlenceli dakikalar geçirdiğimiz ve güzel dostluklar edindiğimiz değerli asistan arkadaşlarım Murat CANBOLAT, Betül CENGİZ DURAN, Tayfun Tolgay ÇELİK, Mert CAN, Merve BOZKURT, Alperen ERDAL, Zübeyr BAŞ ve Adem Ali AKDERE'ye,

Ekip olarak güzel işler yaptığımız ameliyathane hemşireleri ve bölüm yardımcı personellerine,

Çalışmamın histolojik değerlendirmesini gerçekleştiren Cemre BALCI'ya ve cerrahi aşamalarındaki yardımlarından ötürü Dt. Elif DİNÇER'e,

Hayatımın her aşamasında sürekli arkamda duran, desteklerini ve dualarını esirgemeyen annem, babam ve sevgili ablalarım,

Varlığıyla hayatıma anlam katan ve her konuda olduğu gibi tez çalışmamda da bana destek vererek motivasyon kaynağım olan canım eşim Dt. Elif SOSLU BULUT'a;

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar	viii
ŞEKİLLER	ix
RESİMLER	x
GRAFİKLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kemik.....	5
2.1.1. Kemik embriyolojisi	5
2.1.2. Kemik biyolojisi.....	6
2.1.3. Kemik biyokimyası	6
2.1.4. Kemik hücreleri.....	7
2.1.4.1. Osteoklastlar.....	7
2.1.4.2. Osteoblastlar.....	8
2.1.4.3. Osteositler	9
2.1.4.4. Kemik sınır hücreleri	9
2.1.5. Kemik yapısı: Kortikal kemik ve trabeküler kemik.....	10
2.1.6. Kemik histolojisi: Lameller kemik ve örgü kemik	11
2.1.7. Kemik gelişimi	11
2.1.7.1. İntramembranöz kemik oluşumu.....	11
2.1.7.2. Endokondral kemik oluşumu	12
2.1.8. Kemik iyileşmesi.....	12
2.1.8.1. Evre 1: İnflamasyon	13
2.1.8.2. Evre 2: Yumuşak kallus oluşumu	13
2.1.8.3. Evre 3: Sert kallus oluşumu	14
2.1.8.4. Evre 4: Kemik remodelingi.....	14
2.2. Kemik Graft Materyalleri.....	16
2.2.1. Otojen kemik greftleri (Otogreftler).....	19
2.2.2. Allojen kemik greftleri (Allogreftler)	20
2.2.2.1. Taze veya dondurulmuş iliak kansellöz kemik allogreftleri	21
2.2.2.2. Mineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleri	21
2.2.2.3. Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleri	21
2.2.2.4. Demineralize kemik matriksi	22
2.2.3. Ksenogreftler (Heterogreftler)	23
2.2.4. Alloplastikler.....	25
2.2.4.1. Trikalسيوم fosfat	25
2.2.4.2. Sentetik hidroksiapatit.....	26
2.2.4.3. Biyoaktif camlar.....	26
2.2.4.4. Dikalسيوم fosfatlar.....	27
2.3. Arı Sütü (Royal Jelly)	28

2.3.1. Arı sütü bileşimi.....	29
2.3.2. Arı sütü biyoaktif maddeleri	32
2.3.3. Arı sütünün biyolojik etkileri	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Arı Sütünün Hazırlanması.....	44
3.2. Cerrahi Yöntem	45
3.3. Ratların Bakımı ve Deneyin Sonlandırılması	50
3.4. Histolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme.....	51
3.5. İstatistiksel İnceleme	54
4. BULGULAR	56
4.1. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular	56
4.2. İstatistiksel Bulgular.....	62
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
7. KAYNAKLAR	87
8. EKLER.....	103
Ek-1. Etik Kurul Onayı.....	103
9. ÖZGEÇMİŞ.....	104

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1: Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması.....	16
Tablo 2.2: Arı Sütünün Bileşimi	29
Tablo 2.3 Arı Sütünün Amino Asit İçeriği.....	30
Tablo 2.4: Arı Sütü Karbonhidrat İçeriği	30
Tablo 2.5: Arı Sütü Mineral İçeriği.....	31
Tablo 2.6: Arı Sütü Vitamin İçeriği	31
Tablo 2.7: İzole Edilmiş Arı Sütü Bileşikleri ve Etkileri	33
Tablo 2.8: Arı Sütü Biyolojik Etkileri.....	41
Tablo 3.1: Allen Kırık İyileşme Skorlaması	53
Tablo 4.1: Histopatolojik Kriterlerin İstatistiksel Analizi.....	62
Tablo 4.2: ALLEN Kemik Skorlaması, VEGF ve RANKL Arasındaki Korelasyon Durumu	63

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1: Kemik Hücreleri	7
Şekil 2.2: Osteoklast Formasyonunun RANKL-Bağımlı Regülasyonu	8
Şekil 2.3: Kompakt ve Kansellöz Kemik (Kesitsel Görünüm).....	10
Şekil 2.4: Kırık İyileşme Evreleri.....	12
Şekil 2.5: Kemik Remodelasyon Döngüsü.....	15
Şekil 2.6: Kemik Rejenerasyonu İçin Biyolojik Gereksinimler	19
Şekil 2.7: Arı Sütü ve Larvanın Görünümü	28
Şekil 2.8: Kalvaryal Kritik Boyut Kemik Defekti Şematik Gösterimi	42
Şekil 3.1: Çalışma Gruplarının Şematik Gösterimi	44



RESİMLER

Resim	Sayfa
Resim 4.1: Sham Grubuna Ait H.E Boyaması	56
Resim 4.2: Sham Grubuna Ait VEGF İmmün İşaretleme	57
Resim 4.3: Sham Grubuna Ait RANKL İmmün İşaretleme	57
Resim 4.4: DKM Grubuna Ait H.E Boyaması	58
Resim 4.5: DKM Grubuna Ait VEGF İmmün İşaretleme.....	58
Resim 4.6: DKM Grubuna Ait RANKL İmmün İşaretleme	59
Resim 4.7: DKM+LAS Grubuna Ait H.E Boyaması	59
Resim 4.8: DKM+LAS Grubuna Ait VEGF İmmün İşaretleme.....	60
Resim 4.9: DKM+LAS Grubuna Ait RANKL İmmün İşaretleme	60
Resim 4.10: DKM+SAS Grubuna Ait H.E Boyaması	61
Resim 4.11: DKM+SAS Grubuna Ait VEGF İmmün İşaretleme	61
Resim 4.12: DKM+SAS Grubuna Ait RANKL İmmün İşaretleme.....	62

GRAFİKLER

Grafik

Sayfa

Grafik 4.1: ALLEN Kemik İyileşme Skorlamasının Gruplara Göre Değişimi	64
Grafik 4.2: VEGF ile Boyanan Kapillerlerin Gruplara Göre Değişimi	65
Grafik 4.3: RANKL ile Boyanan Osteoblastların Gruplara Göre Değişimi	66



SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	Anjiyotensin-1 dönüşüm enzimi
AC-TSHR	Tiroid uyarıcı hormon reseptörü
ark.	arkadaşları
AS	Arı sütü
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
CAT	Katalaz
DDKKA	Demineralize dondurulmuş-kurutulmuş kemik allogrefti
DKKA	Dondurulmuş-kurutulmuş kemik allogrefti
DKM	Demineralize kemik matriksi
ESM	Ekstraselüler matriks
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
g / ml	Gram/mililitre
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
HA	Hidroksiapatit
HDA	10-hidroksi-2-desenoik asit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipid
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
IFN	İnterferon
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IHH	Indian hedgehog hom+ologue geni
IL	İnterlökin
KBD	Kritik boyut defekt
KKBD	Kalvaryal kritik boyut defekt
KMP	Kemik morfojenik proteini
LDL	Düşük yoğunluklu lipid
MDA	Malondialdehit
MÖ	Milattan önce
OPG	Osteoprotegrin
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
PTH	Paratiroid hormonu
RANK	Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B
RANKL	Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand
ROS	Reaktif oksijen türleri
RRJP	Majör tip arı sütü proteini
SOD	Süperoksit dismutaz
TCP	Trikalsiyum fosfat
TGF-B	Transforme edici büyüme faktörü
TNF-α	Tümör nekroz faktörü- α
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Geçen yüzyılda, kemiğin fonksiyonel ve estetik onarımı cerrahların ilgi odağı olan konular arasında yer almıştır. Kraniyo-maksillofasiyal iskelette oluşan kemik defektleri halen önemli bir klinik sorundur. Kemik dokusu şekil ve fonksiyonunu yeniden kazanabilecek düzeyde iyileşme potansiyeline sahiptir (1). İskelet sisteminin diğer elemanlarında olduğu gibi maksillofasiyal bölgede de kist, tümör operasyonları, onkolojik rezeksiyonlar, gelişimsel anomaliler, travma veya çoklu diş kaybından sonra oluşan geniş kemik defektlerinin iyileşme süreci fibröz doku dolumu ile sonuçlanabilmekte ve bu durum defektin rekonstrüksiyonunu engelleyebilmektedir.

Kritik boyutlu kemik defekti, kemik dokusunda canlının yaşamı boyunca şekil ve fonksiyon olarak kendiliğinden tamamen iyileşmesinin mümkün olamayacağı en küçük boyuttaki defekt anlamına gelir. Kritik boyut kemik defektlerinin iyileşmesi genellikle fibröz bağ dokusu formunda olmaktadır (2,3). Pepijn F. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 192 erkek Sprague-Dawley ratının sağ mandibulasında 5mm çapında sirküler defekt oluşturmuşlardır. Kontrol grubunda defekt alanını boş bırakmışlar ve 2, 4 ve 12. haftalarda kemik iyileşmesine baktıklarında fibröz iyileşme gözlemlemişlerdir (4).

Kemik defektlerinin tamiri ve restorasyonunun çok eski bir tarihi vardır. Milattan önce (MÖ) 3000’li yıllarda cerrahlar rekonstrüksiyon amacıyla altın ve gümüş tabakaları greft materyali gibi kullanmışlardır. Günümüzde kritik boyut kemik defektlerinde tedavi için otojen greft uygulaması altın standart olarak kabul edilir. Bunun nedeni otojen kemik greftinin osteoindüktif ve osteojenik potansiyele sahip olmasıdır. Ancak, otojen kemik greftlerinde verici sahanın sınırlı olması, ikinci bir cerrahi alan oluşturulması ve enfeksiyon riski bulunması gibi dezavantajlar bu greft türünün kullanımını kısıtlayabilmektedir (2,5). Otojen kemik greftinin bu dezavantajları nedeniyle araştırmacılar çalışmalarını farklı greft materyalleri üzerinde

yoğunlaştırmıştır. Özellikle 20. yüzyılda altın standart olarak kabul edilen otojen greftlere alternatif olması amacıyla geliştirilen allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik materyaller geniş kullanım alanı bulmuştur (6).

Otojen kemik greftlerine alternatif olarak kullanılan kemik greftlerinin başında allojenik (insan kaynaklı) kemik greftleri yer almaktadır. Allojenik kemik greftlerinin otojen kemik greftlerine alternatif olarak kullanılmasında en önemli faktörlerden biri, allojenik kemik greftlerinin tıpkı otojen kemik greftleri gibi osteoindüktif potansiyele sahip olmasıdır (2). Allojen kemik greftinin osteoindüktif potansiyele sahip olması ve otojen greftlere göre daha kolay elde edilmesi gibi avantajları olmasına rağmen; hastalık transmisyonu, potansiyel reddedilme ve hızlı rezorbsiyon gibi dezavantajları bulunmaktadır (2).

Araştırmacılar yeni kemik formasyonunu arttıran veya indükleyen yüksek osteogenik potansiyele sahip greft materyali geliştirmek için alternatif greft materyallerini osteoindüktif maddelerle kombine etmişlerdir (7). Kullanılan biyoaktif maddelerin başında kemik morfojenik proteini (KMP) gelmektedir. KMP-2 bütün KMP'ler arasında en yüksek osteoindüktif etkiye sahip olandır. Biyoaktif maddelerin kemik yapımı üzerine olumlu etkileriyle beraber yüksek dozlarda kullanılmaları, alıcıda ters etki gösterme riski ve yüksek maliyet nedeniyle araştırmacıları farklı maddeler araştırmaya yönlendirmiştir. Klinik kullanımda ise, kemik greft materyallerinin başarısı plateletten zengin plazma, plateletten zengin fibrin gibi kan ürünleri ve bifosfonatlar gibi farklı ilaçlarla kombine edilerek artırılmaya çalışılmaktadır.

Arı sütü (*Royal Jelly*) (*Apis Mellifera*), genç larvalar ile ergin ana arıyı beslemek için genç işçi arıların hipofaringeal salgı bezlerinden salgılanan bir arı ürünüdür. Bal ve polen ile beslenen genç işçi arıların sindirim organlarında hazmedilmesi sonucunda yavru gıda bezlerinde üretilmektedir. Arı sütü (AS) üretimi için gerekli maddeler kan yoluyla süt salgı bezlerine gelmekte, süt sentezi bu bezlerde yapılarak üretilen süt ağız boşluğuna verilmektedir. İşçi arılar tarafından salgılanır salgılanmaz doğrudan larva ya da ana arıyı (kraliçe arı) beslemek için

kullanılmakta ve depolanmamaktadır (8,9). Arı sütü ana arının temel yiyeceğidir, büyüme ve gelişme sırasındaki farklılaşmayı sağlar (10). Sarı, beyaz ve bej renklerde, fenolik bir kokuya ve ekşi bir tada sahiptir. Yoğunluğu yaklaşık 1,1 gr/cm³ tür, suda kısmen çözünmektedir. Viskozitesi su içeriğine ve tazeliğine göre değişebilmektedir. Oda sıcaklığında ya da 5°C'de tutulduğunda daha viskoz olmaktadır. Arı sütünün temel bileşenleri; su, protein, şekerler, lipitler ve mineral tuzlardır. Kompozisyonu coğrafik olarak ve iklimsel koşullara göre değişebilmektedir. Ortalama nem içeriği %60-70, ham protein içeriği toplam %12-15, şeker içeriği %10-16 ve lipit içeriği %3-6 olmakla birlikte düşük molekül ağırlıklı bileşikler (vitaminler, tuzlar ve serbest aminoasitler) ile suda çözünür protein fraksiyonları içermektedir (11).

Arı sütünün çok sayıda farmakolojik aktivitesi tespit edilmiştir. Bunlar içinde en çok vurgulananlar; antitümöral etki, antihiperkolesterolemik etki, antihipertansif ve vazodilatör etki, yorgunluk giderici etki, antiinflamatuvar etki ve yara iyileştirici etki, immünmodulatuar etki, antioksidatif etki, insulin benzeri etki ve antibakteriyel etkidir. Bu nedenle arı sütü 30 yıldan fazla süredir ticari olarak tıbbi ürünler, gıdalar ve kozmetikte geniş oranda kullanılmaktadır.

Arı sütünün kronik diyabetik ratlarda antiinflamatuvar etki gösterdiği, aynı zamanda yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (12). İnterferon ile uyarılmış fare peritoneal makrofaj kültür ortamına arı sütü süspansiyonlarının süpernatantları ilavesi ile doza bağlı olarak makrofajlarda proinflamatuvar sitokin yapımının inhibe olduğu tespit edilmiş ve buna bağlı antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu düşünülmüştür. Bu antiinflamatuvar faktör “Bal arısı arı sütü kaynaklı antiinflamatuvar” olarak adlandırılmıştır ve kromatografik analizde bu maddenin MRJP3 olabileceği ifade edilmiştir (12). Erem ve ark.’nın çalışmalarında hücre kültürlerinde arı sütü ilavesi ile lenfositlerden sitokin salınımının azaldığı gösterilmiştir (13). Arı sütünde bulunan royalisin isimli madde çok düşük konsantrasyonlarda bile gram pozitif bakterilere karşı aktivite gösterirken gram negatif bakterilere karşı aynı etkinlik tespit edilememiştir. Royalisinin balı bakteriyel kontaminasyona karşı koruduğu düşünülmektedir (14).

Yapılan çalışmalarda arı sütünün sıçanlarda, osteoporoza bağlı kemik kaybını azalttığı gösterilmiştir (15). Bu çalışmalardan yola çıkarak yapılan başka bir deneysel çalışmada periodontal ligament üzerine arı sütünün etkisi araştırılmış ve periodonsiumda osteojenik aktivitenin arttığı gözlenmiş ve arı sütünün periodontitis oluşumunu engellemede etkili bir ajan olabileceği dşnlmştir (16). Fizyolojik ve hücre kültürü çalışmalarında arı sütünün kemik formasyonunu stimüle ettiği de grlmştir (17). Arı sütünün yumuşak doku yara iyileşmesine etkileri araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (12).

Bu bilgiler işığında, yapılan çalışmada arı sütünün greft materyalleriyle lokal ve sistemik uygulamalarının kemik iyileşmesini hızlandırıcı etkisi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde bu yönde yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik

Kemik, bağ dokusunun dinamik ve oldukça özelleşmiş bir şeklidir. Kemiklerin ana işlevi, vücudun yumuşak dokularını desteklemek ve korumaktır. Ayrıca, kemikler sistemik mineral homeostazı için iyi bir depolama yeri olarak işlev görür. Kemik dokusu iyi bir elastikiyet derecesine sahipken, belirgin bir sertlik ve mukavemet özelliği de bulunan eşsiz bir birleşimle karakterizedir. Uygun bir kemik replasmanı oluşturmak için kemiğin kendi doğasını anlamak gerekir.

2.1.1. Kemik embriyolojisi

İskelet sistemi üç farklı kökenden gelişir (18):

1. Paraksiyel mezoderm aksiyal iskeleti (vertebra ve kaburga) oluşturur.
2. Lateral plaka mezoderminden apendiküler iskelet (ekstremité iskeleti) gelişir.
3. Ektoderminden gelişen kafa nöral krestleri kraniyofasiyal iskeleti oluşturur.

Kemik gelişimi intramembranöz ossifikasyon ve endokondral ossifikasyon olmak üzere iki ayrı yol ile gerçekleşir. İntramembranöz ossifikasyon sırasında mezenkimal hücreler yoğunlaşır ve doğrudan osteoblastlara farklılaşır (19). Bu tür kemikleşme birkaç kraniyofasiyal kemikte ve klavikuların lateral kısmında görülür. Endokondral ossifikasyon esnasında mezenkimal hücreler doğrudan kemik ve kemik iliği ile yer değiştirecek olan kıkırdak modelinin sentezi için yoğunlaşır ve kondroblastlara farklılaşır (19). Bu süreç uzun kemikler, kafatasının bazal kısmı, vertebra, kaburga ve klavikuların medial kısmında gerçekleşir (20). Bu nedenle, iki tip ossifikasyon arasındaki en önemli fark endokondral ossifikasyon sırasında bir kıkırdak öncü şablonunun varlığıdır.

2.1.2. Kemik biyolojisi

Kemik, katı bir çerçeveye entegre edilmiş metabolik olarak aktif hücrelerden oluşan dinamik bir biyolojik dokudur. Kemiğin 3 temel fonksiyonu vardır:

1. Mekanik destek ve hareket için kasların yapışma yeri,
2. Hayati organlar ve kemik iliği için koruma,
3. Serum homeostazının korunması için kalsiyum ve fosfat iyonlarının metabolik rezervi (21).

Kemiğin iyileşme potansiyeli çeşitli biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik mekanizmalardan etkilenir (22). Sürekli olarak oluşan kemik depozisyonu, rezorpsiyon ve remodelling iyileşme sürecini kolaylaştırır (22). Kemik iyileşmesinin temel biyolojik ve fizyolojik ilkelerini anlamak, rekonstrüktif cerrahide başarılı sonuçlara ulaşmak için en etkili tekniğin seçimine yardımcı olacaktır.

2.1.3. Kemik biyokimyası

Kemik, organik ve inorganik elementlerin birleşmesinden oluşur ve ağırlıkça yaklaşık %20'si sudur. Kuru kemik inorganik kalsiyum fosfat (%65-70) ve ağırlıklı olarak kollajenden (%30-35) oluşan bir organik protein matriksten oluşur (23). Osteoid, osteoblastlar tarafından salınan mineralize edilmemiş organik matrikstir. Bu organik yapı Tip I kollajen (%90), glikoproteinler, proteoglikanlar, peptidler, karbonhidratlar ve lipitlerden oluşan temel maddeden ibarettir (23).

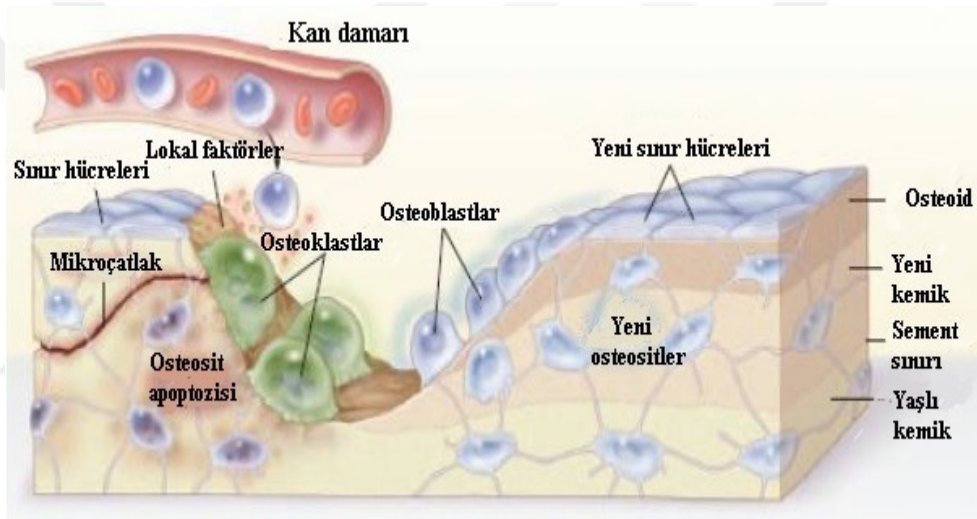
Kollajen liflerin ayrıcalıklı yönelimi yetişkin kemikte tabakadan tabakaya dönüşümlü olarak karakteristik lameller yapı sağlar (24). Lameller düz bir yüzey boyunca biriktirilirse birbirine paralel olabilir veya Haversian sisteminde olduğu gibi çevresel bir kanal veya kan damarı etrafında biriktirilirse konsantrik olabilir. Büyüme ve kırık iyileşmesi sırasında kemiğin hızlı bir şekilde oluşması sonucu kollajen liflerin ayrıcalıklı bir organizasyonu yoksa rastgele bir düzen oluşur.

Osteoidin inorganik mineral tuzları ile mineralizasyonu kemiğe sağlamlık ve sertlik kazandırır. Kemikteki inorganik içerik esasen kalsiyum fosfat ve kalsiyum

karbonat ile birlikte az miktarda magnezyum, florür ve sodyumdan oluşur (25). Mineral kristaller hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ 'i osteoidin kollajen lifleri çevresinde bir düzen içinde çöktürür.

2.1.4. Kemik hücreleri

Bütün bağ dokularında olduğu gibi kemiğin temel unsurları hücreler ve ekstraselüler matrikstir. Kemikte bulunan dört temel hücre türü; osteoklastlar, osteoblastlar, osteositler ve kemik sınır hücreleridir (Şekil 2.1) (26).

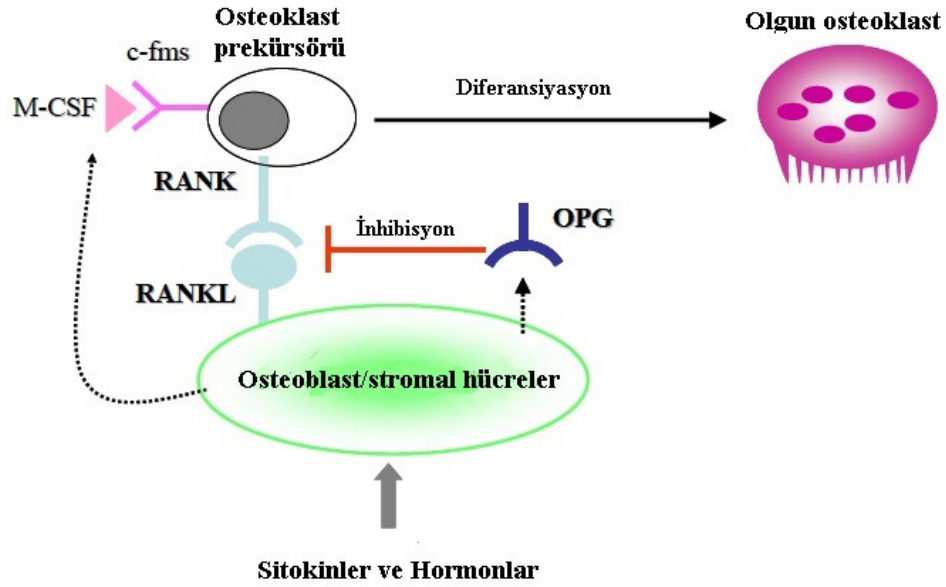


Şekil 2.1: Kemik hücreleri (27).

2.1.4.1. Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik remodelinginden sorumlu çok çekirdekli hücrelerdir (26). Kemik iliğinden türetilmiş hematopoietik kök hücrelerden kaynaklanırlar. Osteoklastların çapı 20-100µm aralığındadır ve yedi haftaya kadar bir ömürleri vardır (28). Normal iskelet olgunlaşması için mineralize dokuların rezorpsiyonu zorunludur (29). Kemik ile temas halinde olan hücre alanı 'şeffaf zon' ile çevrili dalgalı bir kenara sahiptir. Hücre, bu şeffaf zonda kemiğe yapışır ve kemik absorpsiyonu için gerekli olan mikro çevre oluşumuna imkan sağlar (28). Osteoklastlar aktif olduklarında doğrudan kemik yüzeyine oturur (30) ve genellikle Howship lakünaları olarak bilinen boşluklarda bulunur. Kemiği absorbe etmek için asitleri ve kemik

mineralini çözen H^+ iyonları içeren hidrolazları salgılarlar. Osteoklastlar rezorpsiyon belirli bir bölgede durduktan sonra bitişik kemik iliğine göç ederek apoptozise girer (28). Osteoklast farklılaşması ve fonksiyonunun düzenlenmesi karmaşıktır ve Şekil 2.2'de gösterildiği gibi osteoblast fonksiyonuyla yakından ilişkilidir.



Şekil 02.2: Osteoklast formasyonunun RANKL-bağımlı regülasyonu (31).

2.1.4.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik matriksi oluşumundan sorumlu olan tamamen diferansiye olmuş mononükleer hücrelerdir. İnaktif olduklarında düzleşir ve kemik-sınır hücreleri olarak adlandırılırlar (32). Bununla birlikte, aktif osteoblastlar küboid bir şekle sahiptir (33). Osteoblast hücresinin göreceli olarak büyük çekirdeği, belirgin bir golgi alanı (hücreden dışarıya salınacak malzemelerin depolanması ve paketlenmesinden sorumlu) ve ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerinin sentezi ve salınımı için iyi gelişmiş bir endoplazmik retikulumu vardır (34). Osteoblastlar büyük miktarda ribonükleik asit içerir (35,36). İnsan aktif osteoblastlarının maksimum boyutu 20-30 μ m'dir (37). Kemik yüzeylerinde ve kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücrelerden meydana gelirler. Bu pluripotent kök hücrelerin osteoblastlara diferansiyasyonu dokuya özgü transkripsiyon faktörü Runx2 / Osterix ile kontrol edilir (38).

Osteoblastların farklılaşması ve çoğalması KMP (39), fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ve Indian Hedgehog Homologue (IHH) geni gibi çeşitli büyüme faktörleri tarafından regüle edilir (40). Bu hücrelerin kemik oluşturma işlevleri D vitamini düzeyleri, paratiroid hormonu (PTH, kalsiyum hemostaz regülatörü) ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) düzeylerinden etkilenir (41). Bir osteoblastın protein ekspresyonu ömrü boyunca değişir. Bu nedenle, bu proteinlerin ölçümü ile osteoblastın olgunlaştığı safhayı doğru bir şekilde tanımlamak mümkündür.

Bir osteoblastın fonksiyonel ömrü 3-18 ay arasında değişmekte olup, ortalama yaşam süresi 5-6 aydır (42). Osteoblastların yaklaşık %50-70'i apoptoz ile ölür, geri kalan kısmı osteositler veya kemik sınır hücreleri halini alır (33). Aktif osteoblastlar Tip 1 kollajen ve kollajen olmayan proteinleri içeren osteoid sentezi yoluyla trabeküller veya Havers sistemi yüzeyinde kemik matriksini oluşturur. Osteoid daha sonra mineralize edilerek kemik ESM'si oluşur. Osteoblastların osteoid oluşumuna ek olarak, osteoklast aktivitesinin regülasyonunda da rol oynadığı düşünülmektedir (Bkz. Şekil 2.2).

2.1.4.3. Osteositler

Osteositler olgun kemikte sayıca en çok bulunan hücrelerdir. Bunlar, bir osteoblastın kemik matriksine dahil edilmesiyle oluşur. Osteoblasttan olgun osteosite dönüşüm sırasında bir hücre hacminin %70'ini kaybeder ancak, uzunlukları 20-60µm'ye kadar artabilir (28). Osteositler, çekirdeği çevreleyen az miktarda sitoplazmaya ve hücreleri diğer osteositlere bağlamak için kemik kanalından yayılmış uzun sitoplazma uzantılarına sahiptir. Kemik onarımından sorumlu olan bu hücrelerin matriks sentezi ve lokal matriks rezorpsiyon yeteneği bulunmaktadır. Kalsiyum iyonlarının değişimini kontrol eden iyonik konsantrasyonu koruyarak kemik minerallerini stabilize ettikleri düşünülmektedir.

2.1.4.4. Kemik sınır hücreleri

Kemik sınır hücreleri hem kemik formasyonuna, hem de kemik rezorpsiyonuna uğrayan yüzeyleri kaplar (30). Tekrar osteoblastlara aktive olmaları

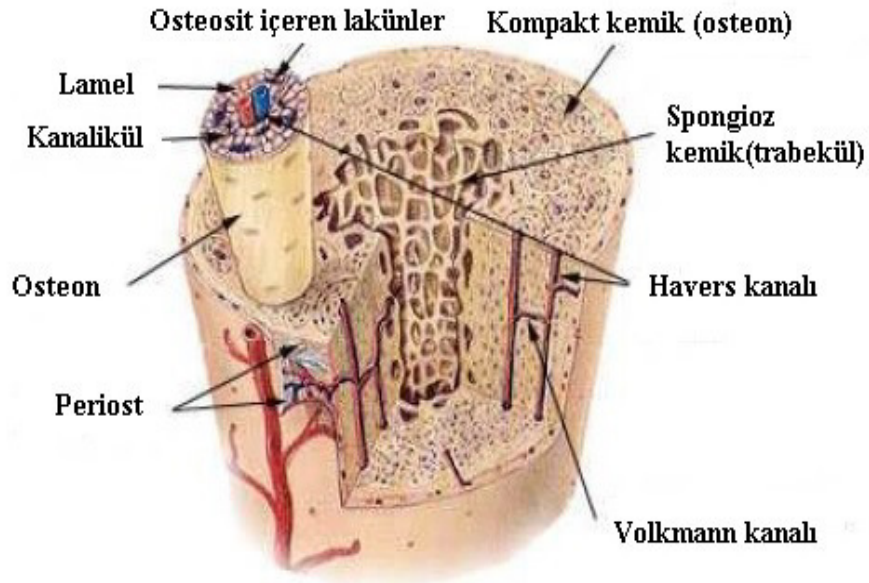
mümkündür (33). Sinyal üretimi yoluyla osteoklastları aktive ederek kemik remodelinginin aktivasyonunda da rol oynamaktadırlar (44). Kemik rezorpsiyonu başlamadan önce bu hücreler, endosteal membranı sindirip kemik mineralini açığa çıkarır (28).

2.1.5. Kemik yapısı: Kortikal kemik ve trabeküler kemik

Morfolojik olarak kemikte iki temel şekil vardır (Şekil 2.3):

1. Kortikal (Kompakt)
2. Trabeküler (Spongioz veya kansellöz)

Kortikal kemikte kollajen fibriller konsantrik lameller oluşturmak üzere yoğun şekilde sıralanır ve fibriller komşu lamellerde dik düzlemde birleştirilir. Trabeküler kemik, lamellerin birbirine paralel olarak düzenlendiği zayıf mineralize ve gözenekli bir ağdan oluşur (45). Kortikal ve kansellöz kemik yüzdesi iskelet sistemindeki farklı bölgeler arasında değişiklik gösterir. Örneğin; bel omurgasında kemiğin %66'sı kansellöz kemik iken, orta radiusda kemiğin %95'den fazlası kortikal kemiktir (46).



Şekil 2.3: Kompakt ve kansellöz kemik(kesitsel görünüm).

2.1.6. Kemik histolojisi: Lameller kemik ve örgü kemik

Lameller kemik, kollajen liflerin lamel yapısı içinde sıralandığı olgun kemiktir (46,47). Lameller kemiğin esasen konsantrik lameller ile çevrili santral kanallar içeren Osteonlar veya Haversiyan sistemler denilen silindirik birimlerden oluştuğu düşünülmektedir. Merkezi kanala Osteon veya Haversian kanalı denir ve bu kanal, içerisinde kan damarı ve sinirleri bulundurur (47). Örgü kemik olgunlaşmamış kemiktir. İskelet oluşumu veya kırık iyileşmesi sırasında çok hızlı bir biçimde şekillenir. Örgü kemikteki kollajen lifler gevşek diziler halinde düzenlenir ve bu nedenle de nonlamellar kemik olarak adlandırılır. Örgü kemik lameller kemiğe göre birim alan başına daha fazla hücre içerir (48).

2.1.7. Kemik gelişimi

Kemik oluşumunda iki temel süreç vardır; intramembranöz kemik oluşumu ve endokondral kemik oluşumu.

2.1.7.1. İntramembranöz kemik oluşumu

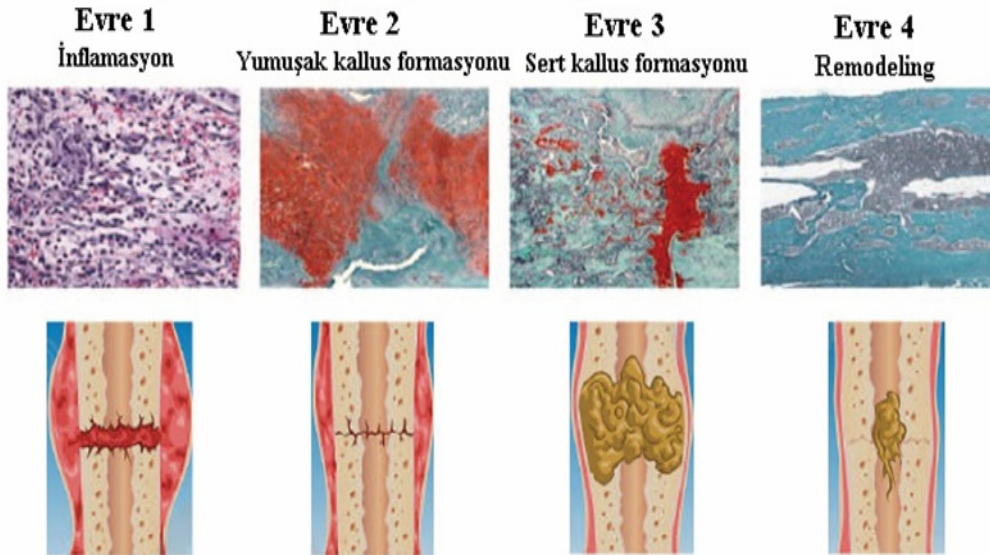
Bu tip kemik oluşumu kafa kemiklerinin ve pelvik kemikleri içeren yassı kemiklerin gelişimsel yoludur. Kemik hücre progenitörleri, yani MSC'ler, gelişim sırasında kıkırdak şablonu olmadan doğrudan kemik hücrelerine diferansiye olur. Bu süreç mezenkimal progenitörlerin yoğunlaşmasıyla başlar. Bu hücreler pre-osteoblastlara diferansiye olmaya başlar ve sialoprotein/osteopontin gibi bir dizi hücre bağlayıcı protein içeren başlangıç osteoidi üretir. Osteokalsin kollajen olmayan proteinlerin en bol miktarda olanıdır. Bu protein kemik oluşumunun mineralizasyon aşamasında görülen bir kalsiyum bağlayıcı maddedir. Tip 1 kollajen ve küçük proteoglikanlar oluştuktan sonra kemik olgunlaştıkça çapraz bağlantılar kurulur. Kollajen lifler immatür örgü kemikte kemik mineralizasyonunun erken evrelerinde daha az organize olur. Daha sonra, örgü kemik kollajen liflerin tabakalarda daha fazla yönlendirildiği lameller kemik ile yer değiştirir.

2.1.7.2. Endokondral kemik oluşumu

Endokondral kemikleşme uzun kemiklerin ve omurganın geliştiği süreçtir. Şablon olarak başlangıç kıkırdak doku oluşumunu içerir. Bu yapı, projenitör hücrelerin bir rezervuarı olan periost ve perikondrium ile çevrilidir. Projenitör hücreler kondrositlere farklılaşır ve kondrositler kalsifiye kıkırdak matriksi üretir. Bu hücreler kan damarı oluşumunu uyaran vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılar. Kıkırdak matriksinin merkez bölgesini kaplayan vasküler tomurcuklar oluşur. Kalsifiye kıkırdak matriksin merkezinde bir boşluk gelişir. Bu, daha sonra primer spongioza, yani lameller kemik ile çevrili immatür trabekül ve kemik iliği boşluğunu oluşturur. Kemik geliştikçe epifiz bölgelerinde ossifikasyonun ikincil merkezi olan sekonder spongioza oluşur.

2.1.8. Kemik iyileşmesi

Kemik iyileşmesi hücreler, büyüme faktörleri ve ESM'den oluşan karmaşık bir etkileşimin yer aldığı, büyüme ve iskelet gelişiminin belirli yönlerini birleştiren çok faktörlü bir süreçtir. Geleneksel olarak süreç dört aşamada açıklanmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Kırık iyileşme evreleri (49).

Erken evrede, hücresel enflamasyon reaksiyonunu fibrokartilaj doku üretimi (yumuşak kallus dokusu) takip eder. Sert kallus oluşumu için doğal parmak izi olan bu fibrokartilaj dokusu, fizyolojik olarak kortikal veya trabeküler kemik ile yer değiştirir. Son evrede kemik yeniden şekillendirilir ve tamamlanır. Onarım sürecinde her yeni oluşan doku bir önceki dokudan gelişir ve tüm iyileşme mekanizması bu örtüşen aşamaların gelişmesiyle gerçekleşir (49-54).

2.1.8.1. Evre 1: İnflamasyon

Bir kemik hasarı tipik olarak lokal yumuşak doku bütünlüğünün bozulmasıyla ilişkilidir, bu da alanda kanamaya ve hematoma gelişimine neden olur. Yara iyileşmesinin ilk aşaması spesifik değildir ve inflamatuvar mediyatörlerin regülasyonu ile karakterizedir. Enfeksiyona karşı mücadele için doku hasarının bulunduğu bölgede trombositler, makrofajlar ve inflamatuvar hücreler toplanır. Sitokinler ve büyüme faktörleri salgılanır, fibrinöz trombus içinde pıhtı gelişir. Zamanla endotel hücreleri pıhtı içine yeni kılcal damarlar üretir ve granülasyon dokusu formasyonu oluşur. Makrofajlar, dev hücreler ve diğer fagositik hücreler bozulan hücreleri ve diğer debrisleri temizler. Bu hücresel yanıt, bir dizi sitokin ve büyüme faktörünün salgılanması ile koordine edilir. Bir inflamasyon varlığında hücreler ve moleküllerin yanında biyofiziksel özellikleri ve geometrik karakteristikleri olan ESM'yi de içeren son derece kompleks bir süreç gelişir (49,50,55-58).

2.1.8.2. Evre 2: Yumuşak kallus oluşumu

Kırıklar genellikle bir derece mekanik dengesizlik ile karakterizedir. Ossifikasyon kırıkta şablonla başladığı için yumuşak kallus kırığa yarı sert bir destek sağlar. Kondrositler ve fibroblastlar kartilaj matriksin sentezinden sorumlu hücrelerdir ve kırık fragmanları arasında geçici tıkaç görevi görür. Mezenkimal progenitorlardan türetilen kondrositler, apoptoza uğramadan önce hipertrofiye olur ve kartilaj matriksi mineralize eder. Büyüme faktörlerinin fibroblast proliferasyonu, kondrosit yönlendirilmesi ve var olan damarlardan kollateral dalların ve daha büyük

damarların vasküler morfogenezisinin düzenlenmesi gibi önemli görevleri vardır (49,50,54).

2.1.8.3. Evre 3: Sert kallus oluşumu

Bu aşamada, osteojenik faktörlerin varlığında osteoprojenitörlerden farklılaşan osteoblastlar hücre seviyesi olarak baskındır. Projenitör hücreler periost, kemik iliği, damar sistemi ve çevre lokal dokular gibi birçok kaynaktan köken alır. Bu evrede osteoblastlar, yumuşak kallusun stabil bölgelerinden başlayarak mineralize edilmiş kemik matriksi üretir. Yeni sert kallus köprüsü kurmak için sağlam olmayan yumuşak kallus revaskülarizasyon eşliğinde yavaş yavaş kaldırılır. Vasküler sistem, lokal bölgedeki osteoblastlara dönüşen projenitör hücrelerin oksijen ihtiyacının karşılanmasını sağladığı için sert kallus oluşumunda kilit noktadır (49,50,54).

2.1.8.4. Evre 4: Kemik remodelingi

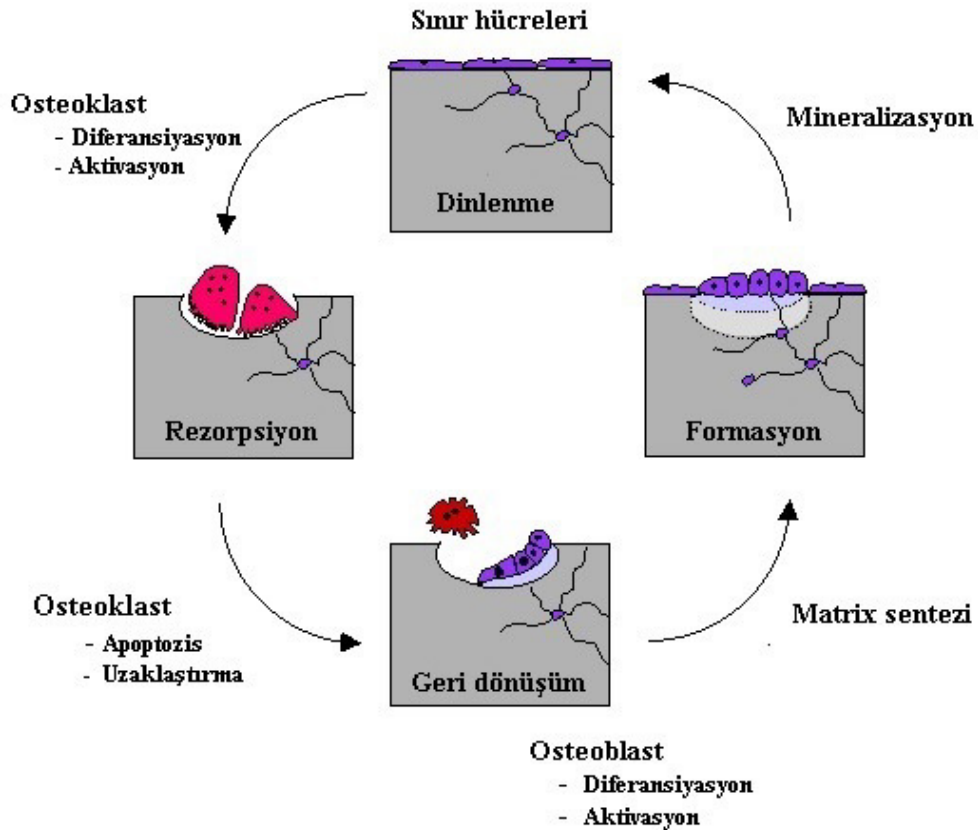
Bu son evre, sert kallusun yerini aldığı ve yeni kortikal veya trabeküler kemiğin olduğu bir süreç olan kemik remodelingi ile karakterizedir. İlgili anahtar hücre tipi kemik yüzeyinin ve yeni kemik sekresyonu yapan osteoblastların rezorpsiyonunu sağlayan osteoklastlardır. Özellikle osteoklastlar matriksin demineralize edilmesi ve kollajen gibi organik bileşenlerin indirgenmesi için asit ve proteinazları rezorpsiyon alanına pompalamaktadır. Osteoblastlar osteoklast davranışını etkileyen, kemik oluşum ve rezorpsiyon koordinasyonundan sorumlu sitokinleri salgılar. Bu aşamada vaskülarizasyon devam eder (49,50,54).

Kemik remodelasyon fizyolojisi

Canlı bir doku olarak kemik, ömrü boyunca düzenli bir turn-over ve remodelinge sahiptir. Bu fizyolojik süreç, süreçte yer alan ve kemik remodeling ünitesi olarak bilinen çeşitli hücreler grubunu gerektirir. Kemik turn-over derecesi kemik tipine bağlıdır. Kansellöz kemikte turn-over kompakt kemikten daha yüksektir (59). Bu sürecin düzensiz olması özellikle vertebralar, proksimal femur ve

diafizden daha çok kansellöz kemiğe sahip olan radius distal ucu gibi kemiklerde osteoporotik kırıklara neden olabilir (60). Kemik remodeling döngüsünde dört evre vardır; aktivasyon, rezorpsiyon, geri dönüşüm ve formasyon (Şekil 2.5)(61).

Osteoklastlar yerel sitokinlere (M-CSF ve RANKL) cevap olarak aktive edilir ve kemik içinde toplanır (61). Daha sonra, tam diferansiye osteoklastlar Katepsin-K ve matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi proteolitik enzimleri salgılar (62). Bu rezorpsiyon aşamasının bir parçasıdır ve Howship lakünasının oluşumu ile sonuçlanır. Kemik matriksinin rezorpsiyonu ile transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), kemik morfojenetik proteinleri (KMP), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I ve II) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) salınır (63). Bu büyüme faktörleri MSC'lerin ve diğer kemik progenitörlerinin farklılaşmasını uyarır ve destekler. Farklılaşmış osteoblastlar daha sonra mineralize olacak olan yeni bir kemik matriksini formasyon evresinde sentezlemeye başlar.

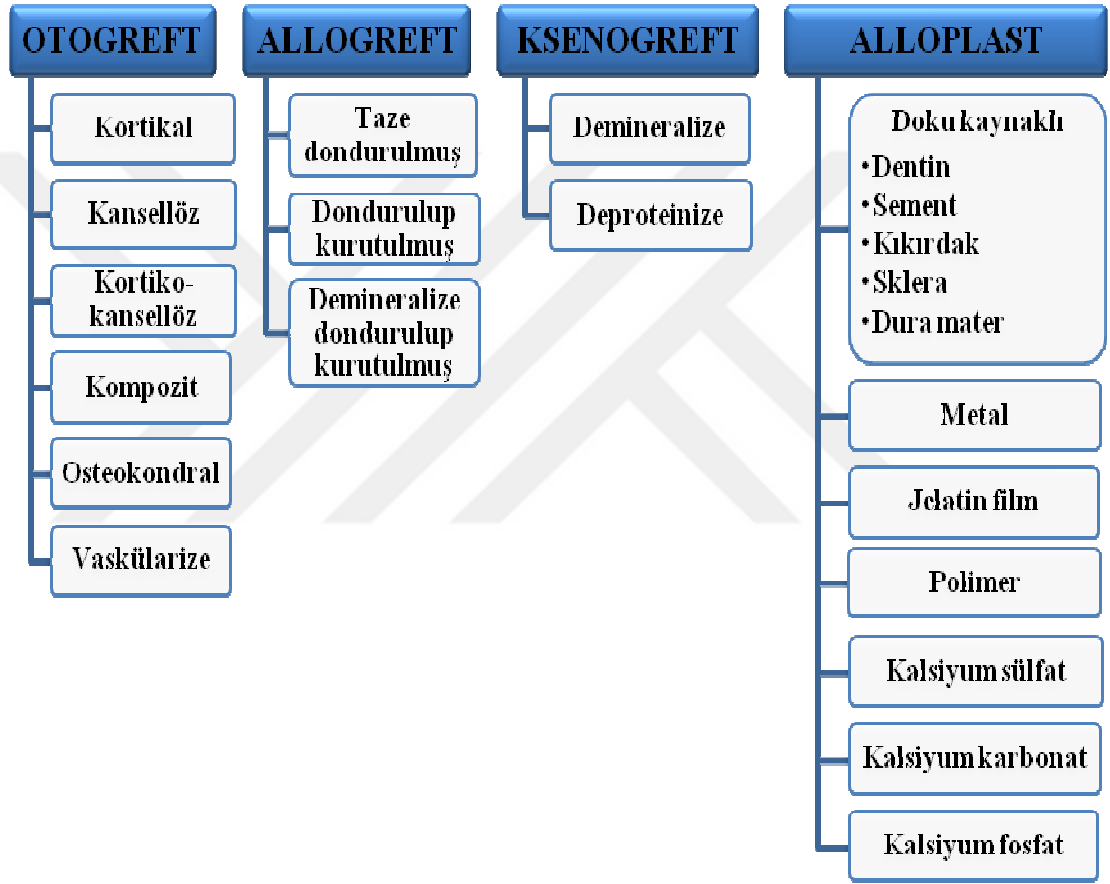


Şekil 2.5: Kemik remodelasyon döngüsü.

2.2. Kemik Greft Materyalleri

Kemik ogmentasyonu için kullanılan greftler doğal elde edilen materyaller (otogreftler, allogreftler ve ksenogreftler) ve sentetik materyaller (alloplastlar) olmak üzere iki gruba ayrılır (Tablo 2.1)(64-66). Bu greft materyalleri osteojenik, osteoindüktif, osteokondüktif veya bu özelliklerin bir kombinasyonuna sahip oldukları hipotezine dayanılarak klinik uygulamalar için kullanılır (67).

Tablo 2.1: Kemik greftlerinin sınıflandırılması



Osteogenez

Osteogenez, greft içinde yaşayan osteoblast ve osteoklast gibi hücreler tarafından başlatılan yeni kemik formasyon olayıdır. (68-70). Bu işlem taze kansellöz otogreftlerde oluşur; çünkü bunlar transfer edilmiş hücrelerin yaşamasına izin veren taze kortikal otogreftlerden daha hızlı revaskülerize olabilir (69,71). Kansellöz kemik, aktif osteoblastlar ya da farklılaşmamış mezenşimal hücreler tarafından kaplanmış geniş bir alan içerir.

İmplantasyondan 5-6 gün sonra başlayan osteogenezis, transplantasyonu takiben 8 hafta boyunca maksimum düzeye ulaşır (69). Otojen ve allojen kansellöz kemik greftlerinin alıcı kemik içinde bütünleşmesi bir yılda tamamlanır (69,71). Yeni kemik formasyonu için öncelikle gerekli miktarda “osteojenik progenitör hücreler” ortamda bulunmalıdır (72-74). Osteoprojenitör hücreler osteoblastlara dönüşerek kemik yapımını sağlar. Bu hücreler başlangıçta özel bir doku hücresine diferansiye olmaz ve yaşamları boyunca çoğalabilme özelliğine sahiptir. Farklılaşmamış kök hücre klonları oluşturabildikleri gibi geçiş hücrelerine diferansiye olup gelişerek kemik, kıkırdak, ligament, tendon ve yağ gibi bağ dokusu hücrelerine de dönüşebilir (72).

Taşıyıcı matriksler osteoprojenitör hücreleri kendilerine çekme, migrasyonlarını kolaylaştırma ve revaskülarizasyonu başlatma özelliğine sahiptir. Son aşamada yeni kemik formasyonu başladıktan sonra taşıyıcının işlevi tamamlanır ve zararlı artıklar bırakmadan rezorbe olması beklenir (34). Hücre matriks kompozitlerinin osteoblastik progenitör hücrelerin transplantasyonu sırasında uygun bir taşıyıcı ve destek oldukları, ayrıca hücrelerin yaşaması ve çoğalması üzerine etki gösterdikleri belirtilmektedir. Allogreft kemik dokusu en iyi taşıyıcı desteklerden biridir ancak; potansiyel enfeksiyon riski, immun reaksiyon ve yetersiz miktarda elde edilebilmesi nedeniyle allogreft yerine mineralize kollajen, kalsiyum fosfat seramikleri, hyaluronik asit veya kollajen yapıda matriksler ve sentetik polimerler gibi taşıyıcılar da geliştirilmiştir (74).

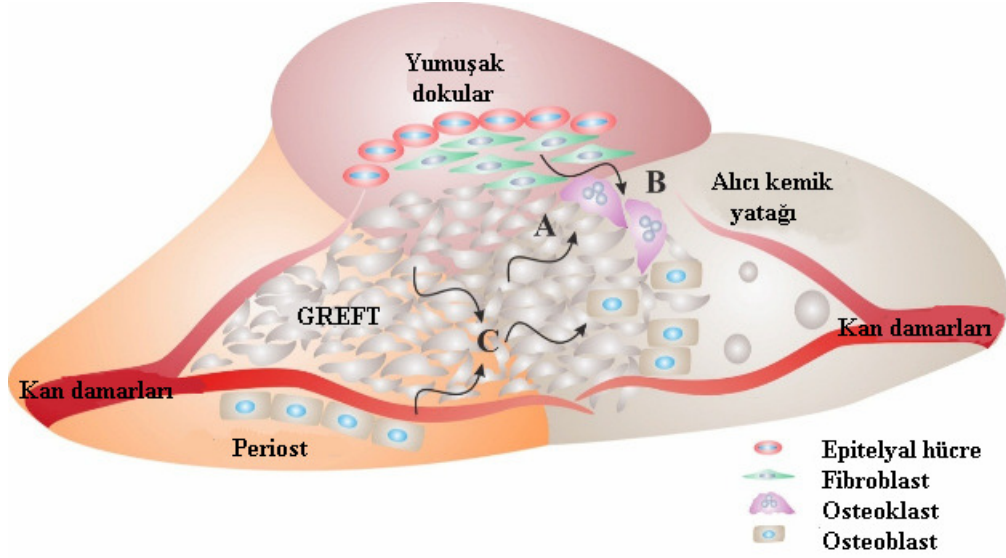
Osteokondüksiyon

Greftlenmiş bölgelerdeki kemik rejenerasyonunun erken aşamasında tüm greft boyunca aktif kemik rezorpsiyonu ve formasyon olayları baskındır. Birleşmenin daha sonraki aşaması osteokondüksiyon süreci ile karakterizedir (75). Osteokondüksiyon, greftin sahadan gelen kılcak damarların ve osteoprojenitor hücrelerin defekt bölgesine doğru büyümesi için üç boyutlu bir iskelet sağladığı özelliğidir (76). Günümüzde kullanılan birçok kemik greft materyali bu biyolojik süreç aracılığıyla yeni kemik oluşumuna katkıda bulunabilmektedir (77).

Osteokondüksiyon için materyal yapısı ve tasarımı kritik önem taşır. Hücresel osteojenik farklılaşma için en uygun materyal kemik kimyasını taklit edendir. Ayrıca, makropörözite ve gözenek bağlantı modelleri osteokondüksiyon potansiyeli üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yüksek pörözite seviyesi, kan damarı büyümesi ve kemik matriks depozisyonu için gereklidir. Gözenek şekli ve ara bağlantı boyutu vasküler akış için sınırlayıcı faktörler olabilir (78). Bu nedenle, materyal kompozisyonu ve tasarımı yeni kemik oluşumu için gerekli olan greft rezorpsiyonu ve kondüksiyonuna izin vermelidir.

Osteoindüksiyon

Osteoblast prekürsörleri osteoindüktörlerin etkisi altında olgun osteoblastlara farklılaşır ve ilk haftalar boyunca yeni kemik sentezler. Kemik oluşumunda rol oynayan büyüme faktörleri fibroblast ve osteoblast proliferasyonu, hücre dışı matriks birikimi, mezenkimal hücre farklılaşması ve vasküler proliferasyon üzerine etki gösterir (Şekil 2.6). Kemik rejenerasyonunun erken safhalarındaki kemik indüksiyon regülasyonunun karmaşıklığı büyüme faktörlerinin spesifik etki özelliğine sahip olmasıyla çözülür (79). PDGF ve FGF fibroblast ve osteoblast proliferasyonunu stimüle ederek indüksiyonun erken evrelerini etkilemektedir. Benzer şekilde IGF hücre proliferasyonunda, ayrıca hücre dışı matris birikimi üzerinde de etkindir. Buna karşın, BMP öncelikle mezenkimal hücre farklılaşması ve vasküler proliferasyon gibi osteoindüksiyonun ilerleyen aşamalarında görevlidir. TGF- β hücresel çoğalma, matriks birikimi ve vaskülarizasyon üzerine etkindir; ancak mezenkimal hücre farklılaşması üzerinde etkinliği yoktur.



Şekil 2.6: Kemik rejenerasyonu için biyolojik gereksinimler (80). (A) Çoğu greft materyali osteoblastlar tarafından kemik depozisyonu yapılmadan önce osteoklastlar tarafından rezorbe olur. (B) Yumuşak dokuların turn-over hızı kemikten daha yüksek olduğu için, yüksek resorpsiyon oranına sahip olan greftler yüzeylerini yumuşak dokulardan ayıran membranlarla kombinasyon halinde kullanılır. Bu yaklaşım, yumuşak dokuların kemik oluşumunun amaçlandığı alana girmesini önler. (C) Osteoblast kemik depozisyonu, greft içinden yeterli kan akışı ve greftin osteoblast farklılaşması ve fonksiyonu için gerekli büyüme faktörlerini sağlayan osteoindüktif özellikleri ile kolaylaştırılır.

2.2.1. Otojen kemik greftleri (Otogreftler)

Otojen greftler intraoral veya ekstraoral bölgeden elde edilip, aynı bireyde kemik defekti olan bölgelere aktarılır. Otojen greft osseöz doku rejenerasyonu için en iyi osteojenik organik grefttir (81). İliak krestten elde edilen greftler optimal osteokondüktif, osteoindüktif ve osteojenik özellikler sağlar (82). Bununla birlikte, verici alan morbiditesi, artan maliyet ve greft hacmi kısıtlamaları nedeniyle diğer greft materyallerinin kullanımı klinik uygulamada daha yaygın hale gelmiştir (82,83). Hücrel (osteojenik) elementlerin çoğunluğu transplantasyon prosedüründe canlılığını koruyamadığı için otogreftlerin alıcı bölgelerde başarısız olabileceği de belirtilmiştir (82).

Otojen greft eldesinde en sık kullanılan bölgeler mandibula (çene ucu, mandibular ramus ve mandibular corpus) (84,85), maksilla (tuber, spina nasalis ve krista zygomatico-alveolaris), kalvaria, iliak krest (pelvis kenarı) ve tibiadır. Ekstraoral bölgelerle karşılaştırıldığında intraoral verici alanlarda daha az morbidite

oranı vardır (74). Mandibular kemik en çok tercih edilen ağız içi bölgedir ve greft, blok halinde veya partikül şeklinde elde edilebilir. Kemik yongaları elde etmek için kazıyıcılar kullanılabilir (86). Büyük miktarda otolog kortiko-kansellöz kemiğin eldesinde en sık kullanılan ekstraoral verici alan ise pelvis dış kenarıdır (87).

Otogreftler kansellöz veya kortikal yapıda ya da her ikisinin kombinasyonu şeklinde olabilir. Kansellöz greftler, süngerimsi yapıları nedeniyle kortikal greftlerden daha erken revaskülarize olma özelliğine sahiptir. Bu greftlerin revaskülarizasyonu transplantasyondan sonraki beşinci gün civarında başlar (88). Kortikal greftlerin zamanla azalan yüksek derece başlangıç dayanıklılık özelliği vardır. İmplantasyondan 6 ay sonra kortikal otogreftlerin normal kemikten %40-50 daha zayıf olduğu gösterilmiştir (88). Aksine, kansellöz otogreftler başlangıçta gözenekli yapılarından dolayı daha yumuşaktır. Bir süre boyunca dayanıklılık kazanmaya devam eder ve biyomekanik uyarı yeterli boyutsal stabilite ve güç elde etmek için kritik önem taşır (67).

2.2.2. Allojen kemik greftleri (Allogreftler)

Allogreftler aynı türden olup genetik olarak farklı bireylerden elde edilir. Büyük miktarlarda alınabildiğinden ve ikinci bir cerrahi alan ile ilgili dezavantajları ortadan kaldırdığından allogreft kullanımı çoğu zaman tercih edilmektedir. Allogreftler kullanmadan önce farklı işlemlere maruz kalsalar da hastalık bulaşma riski hala olasıdır. Allogreft kullanımı ile insan immün yetmezlik virüsü (HIV) bulaşma riskinin 1.6 milyonda 1 olduğu tahmin edilmektedir (89). Çapraz enfeksiyon ve ensefalopati insidansına ilişkin bazı raporlar vardır (90-92). Bununla birlikte, allogreft avantajları bu düşük oranlı risklerin önüne geçmekte ve allogreftlerin rutin kullanımını arttırmaktadır (93,94). Alveolar sırt ogmentasyonu (95), sinüs ogmentasyonu (96) ve diş çekim sonrasında soket korunması (97) gibi çeşitli kemik ogmentasyon prosedürleri için farklı ebat ve kökende (kortikal, kansellöz veya her ikisi) allogreft parçacıkları kullanılmaktadır. Allogreftler çoğunlukla taze, dondurulmuş, dondurulmuş-kurutulmuş, mineralize ve mineralden arındırılmış

olarak hazırlanırlar. Bunların her biri kortikal cips, kortikal granüller, kortikal yonga veya kansellöz toz greft olarak bulunabilir (67,98).

2.2.2.1. Taze veya dondurulmuş iliak kansellöz kemik allogreftleri

Taze ya da donmuş iliak kansellöz kemik mevcut tüm allogreftlerin en yüksek osteokondüktif ve osteoindüktif potansiyele sahip olan şeklidir (99,100). Antijenite, çapraz enfeksiyon ve hastalık bulaşma riski donmuş iliak allogreftlerin günümüz pratiğinde kullanımını sınırlandırmıştır (100).

2.2.2.2. Mineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleri

Dondurulmuş-kurutulmuş kemik allogreftleri (DKKA) oral cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır (101). Yapılan çalışmalar taze dondurulmuş kemik ile ilişkili sağlık risklerinin minimal olduğunu ve greftleme prosedürlerinin klinik başarısının yüksek olduğunu göstermektedir (102). Dondurarak kurutma yönteminin allogreft partikül yüzeyindeki insan lökosit antijenlerini üç boyutlu bozarak konakçıdaki immün tanımayı etkilediği düşünülmektedir (103,104). DDKA, taze veya dondurulmuş allogreftlerle karşılaştırıldığında daha az osteoindüktif ve mekanik özelliklere sahiptir (67,102). Kortikal DDKA, primatlarda immün reaksiyon göstermemiştir (105). Kortikal veya kansellöz DDKA'nın avantajları; greft rezorpsiyon süresini uzatan daha yüksek kemik matriksi hacmi, matrikste depolanan büyüme faktörleri yoluyla daha yüksek indüktif potansiyel ve daha az antijenitedir. DDKA, osteokondüktif olarak kabul edilir (76,106) ve greftin osteojenik potansiyelini arttırmak için otogreftler ile kombinasyon halinde kullanılabilir (107). Alveolar augmentasyon sonuçları, rezorbe olan membranlarla birlikte DDKA'nın ciddi alveolar sırt defektlerinin tedavisinde otojen blok greft için kabul edilebilir bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir (108).

2.2.2.3. Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleri

Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleri (DDKKA), maksillofasiyal greftleme prosedürleri için tek başına veya DDKA ve otogreftler ile

kombine olarak sıklıkla kullanılır. Diğer kemik rejenerasyon materyalleri ile karşılaştırıldığında DDKKA hızlı rezorpsiyon ve demineralizasyonu takiben osteoindüktif proteinlerin açığa çıkması avantajlarına sahiptir (109-111). DDKKA'nın osteoindüktif potansiyeli esas olarak matrikste depolanan morfogenetik proteinlere (BMP) dayandırılır (112). Büyüme ve diferansiyasyon faktörlerinin DDKKA preparatlarında mevcut olduğu gösterilmiştir (113). Genç bireylerden elde edilen greftlerin osteojenik potansiyelinin daha yaşlı bireylere göre yüksek olması DDKKA'nın biyoaktivitesinin donör yaşına bağlı olduğunu gösterir.

Maksiller sinüs augmentasyon prosedürlerinde, otojen greftlerle %40 oranında yeni kemik oluşumu görülürken DDKKA'da bu oran %29 olarak bulunmuştur (114). Ayrıca, greftin merkezine yakın parçacıklar remineralizasyon veya yeni kemik formasyon belirtisi göstermezken, donör kemiğin yakınında bulunan DDKKA parçacıkları yeni kemik ile kaplanmıştır. Bununla birlikte, piyasada bulunan DDKKA ile zayıf kemik formasyonu gösteren raporlar da mevcuttur (115).

2.2.2.4. Demineralize kemik matriksi

Demineralize kemik matriksi (DKM), osteokondüktif ve farklı derecelerde osteoindüktif bir materyal olarak kemik kayıplarını ve boşlukları doldurmak için kullanılır. DKM hızlı bir şekilde yeniden damarlanır ve aynı zamanda otolog kemik iliği için iyi bir taşıyıcıdır. Urist ve ark. tarafından tarif edilen ve daha sonra Reddi ve Huggins tarafından geliştirilen standardize edilmiş yöntemle DKM elde edilir. Bu yöntemde allojen kemik 74-420µm partikül büyüklüğüne erişene kadar ezilir ve ardından üç saat 0,5N HCL mEq/gr'da demineralize edilir. Kalan asit steril su, etanol ve etil eter ile yıkanır (116). DKM elde etme aşamalarına göre (demineralizasyon zamanı, asit uygulaması, ısı, yağdan arındırıcı ajan uygulamaları ve gama ışınlan veya etilen oksit ile sterilizasyon) doku bankaları ve firmalar arasında farklılıklar bulunur (117).

DKM'nin biyolojik aktivitesi ekstrasellüler matrikste bulunan proteinler ve büyüme faktörleri ile olur. DKM'nin osteoindüktif kapasitesi kemiğin işlenmesi, saklama şekli, sterilizasyon yöntemi ve donöre göre değişebilir. Ürün; dondurulmuş-kurutulmuş toz, ezilmiş granüller veya yongalar, jel veya macun şeklinde kullanılabilir (117). Gliserol, hyaluronik asit, kalsiyum sülfat ve jelatin ile karıştırılarak bu formlar elde edilir. Bostrom ve ark. ve Wang ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarda gliserolle kombine edilen DKM uygulamaları sonrasında aşırı doz kullanımında nörotoksik ve nefrotoksik etkiler gösterilmiştir (118). Bu nedenle gliserolle kombine edilen DKM kullanılacağı zaman 2 cc/kg'nin üzerinde dozda kullanılmaması (düşük vücut ağırlığına sahip çocuk ve yaşlılarda dikkat edilmesi) ve renal fonksiyonları bozuk olan hastalarda kullanımından kaçınılması önerilir. Açıkta bulunan spinal sinirlerle doğrudan temasının önlenmesi gerektiği belirtilmiştir (119).

DKM'nin uzun kemik kaynamamaları ve kırık sonucu oluşan kemik kayıplarında otolog kemik greftlerine benzer iyileşme sonucu elde edildiğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir. Kemik kaybı büyük olduğu zaman otolog kemik greftini arttırmak ve yoğunlaştırmak için DKM kansellöz greft ile karıştırılarak kullanılabilir. Aynı zamanda otolog kemik grefti kullanılamayan hastalarda alternatif olarak düşünülebilir. Yine perkütan olarak DKM ve otolog kemik iliği kullanımı bu tip olgularda göz önünde bulundurulmalıdır (117).

DKM allojen bir madde olması nedeniyle HIV bulaştırma riski gibi bazı dezavantajlar da taşımaktadır. Ancak, alıcı seçimi sırasında yapılan değerlendirmeler ve dekalsifikasyon işlemi esnasında virüsün inaktive olması sebebiyle bu risk çok düşüktür. Bugüne kadar yapılan yayınlarda DKM kullanımı sonrası HIV geçişi bildirilmemiştir.

2.2.3. Ksenogreftler (Heterogreftler)

Ksenogreftler insan dışındaki türlerden elde edilir. İnsanlarla biyolojik olarak uyumlu oldukları ve osteokondüktif özelliklere sahip oldukları kabul edilmektedir. Aseptik kemik kavitelerinde kemik grefti olarak ksenogreft kullanımı ilk kez 1889

yılında bildirilmiştir (120). Ksenogreft materyali alıcı bölgede zamanla rezorbe olup yeni oluşan kemikle yer değiştirme potansiyeline sahiptir (121-123). Genel kullanımda olan sığır kemiği, organik bileşensiz doğal kemik minerali elde etmek üzere işlenir. Sığır kaynaklı anorganik kemik düşük ısı ve kimyasallar ile organik bileşenlerinden arındırılan, pöröz kortikal ve kansellöz kemik içeren HA iskeletinden oluşur.

Geçmişte sığır ksenogreftleri, muhtemelen advers reaksiyonlara neden olan rezidüel proteinlerin kaldığı kimyasal tekniklerle oluşan greft reddi nedeniyle başarısız olmuştur (124). Sığır kökenli ksenogreftler hastalık geçişi için teorik bir risk taşır. Mevcut verilerde sığır ensefalopati riski göz ardı edilebilir olmasına rağmen endişeler halen mevcuttur. Bu greft materyalinin bir avantajı, sentetik olarak üretilen materyallere kıyasla daha yüksek osteokondüktif potansiyele sahip olmasıdır. Sığır kaynaklı kemik greftleri (partikül ve blok) kemik içi defektlerde ve alveolar ogmentasyon tedavisinde başarıyla kullanılmıştır (96). Vertikal kemik ougmentasyon çalışmalarında kullanılan ksenojen kemik blokları çok kırılmandır ve yeterli dayanıklığa sahip değildir. Sıklıkla vida sabitleme işlemi sırasında kırılırlar ki bu, iyileşmede istenilen sonucun alınmasını engeller ve daha hassas cerrahi prosedür gerektirir (125).

Koralina kalsiyum karbonat, Porites cinsi doğal mercandan elde edilir ve öncelikle aragonitten oluşur. Kansellöz kemikte olduğu gibi 100 ila 200µm gözenek boyutuna sahiptir (126). Göreceli %45'lik gözeneklilik greft rezorpsiyonu ve yeni kemik ile yer değiştirme için büyük bir yüzey alanı sağlar (127). Kalsiyum karbonat, ısı dönüşümüyle aynı mercandan elde edilebilen HA'dan farklı olarak in-vivo rezorbe olabilir. Kalsiyum karbonat, kemik formasyonunu uyarmak için diğer greft materyallerine benzer şekilde karbonata yüzey dönüşümü gerektirmez, dolayısıyla potansiyel olarak hızla yeni kemik depozisyonunu başlatabilir (126). Mercan kalsiyum karbonatın yüksek osteokondüktif özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir ve aynı zamanda bu materyal fibröz enkapsülasyona uğramaz (128).

2.2.4. Alloplastikler

Alloplast kemik greft materyalleri, otogreft kullanımı ile ilişkili doğal sorunların üstesinden gelmek için geliştirilmiş sentetik materyallerdir (129). Alloplastik materyallerin başlıca avantajları; doğal materyallere kıyasla yüksek miktarda bulunabilmeleri, hastalık bulaşma risklerinin olmaması ve çok düşük antijenik etki içermesidir (101). Alloplastlar çeşitli şekillerde ve farklı fiziko-kimyasal özelliklerde üretilebilir. Hem rezorbe olabilen hem de rezorbe olmayan formda, farklı porözite ve farklı gözenek boyutlarında olabilirler. Alloplastlar osteogenetik veya osteoindüktif intrinsik potansiyele sahip olmayan esas olarak osteokondüktif materyallerdir ve oral rekonstrüktif cerrahide başarıyla kullanılmaktadır. Başlıca alloplastik materyaller trikalsiyum fosfatlar (TCP), biyoaktif camlar, HA ve dikalsiyum fosfatlardır (130). Yeterli kemik büyümesine izin veren porözlü yapı ve büyük partikül boyutu alloplastların kullanımında başarı için kritik olduğu düşünülen bir özelliktir.

2.2.4.1. Trikalsiyum fosfat

TCP gözenekli bir kalsiyum fosfat formudur. TCP, α -TCP ve β -TCP gibi iki kristalografik forma sahiptir (131). En yaygın tip β -TCP'dir. Kemik formasyonu ve replasmanına izin veren, kısmen rezorbe olabilen dolgu maddesi olarak kullanılır (101). Yıllar boyunca β -TCP daima öngörülebilir olmayan sonuçlara rağmen kemik greft materyali olarak kabul görmüştür. Doğrudan bir karşılaştırma yapıldığında, allojenik greftlerin rezorpsiyon ve kemik formasyonu açısından β -TCP'den daha başarılı olduğu görülmektedir (132). TCP granüllerinin fibröz doku enkapsülasyonuna uğradıklarına ve yeterli kemik büyümesini teşvik etmediklerine dair kanıtlar vardır (133,134). Öte yandan, bazı çalışmalarda β -TCP ile kemik depozisyonu bildirilmiştir (132). α -TCP veya β -TCP kullanılarak yapılan, dikey ve yatay alveolar augmentasyon amaçlanan hayvan ve klinik çalışmalarında değişken sonuçlar elde edilmiştir (135).

2.2.4.2. Sentetik hidroksiapatit

Sentetik hidroksiapatit(HA) pöröz rezorbe olmayan, solid rezorbe olmayan ve rezorbe olan (pöröz, seramik olmayan) şeklinde çeşitli formlarda kullanım için hazırlanmıştır. HA, osteojenik özelliği bulunmayan, osteoindüktif etkisi kesin olmayan, osteofilik ve osteokondüktif greft materyali olarak işlev görür. HA'nın resorptif potansiyeli işlendiği sıcaklığa bağlıdır. Daha yüksek sıcaklıklarda hazırlanarak üretilen HA yoğun, rezorbe olabilir ve daha büyük kristal boyutuna sahiptir (136). Yoğun HA greftleri osteokondüktif, osteofilik ve biyouyumlu dolgular olarak etki gösterir. Düşük sıcaklıklarda işlenmiş partiküllü ve gözenekli emilebilir HA preparatları da klinik kullanım için bulunmaktadır. Bu tür HA sinterlenmeden yoğunlaştırılan (seramik olmayan), boyutları 300 ila 400µm olan parçacıklardan oluşur. Bu sinterlenmemiş HA'nın osteokondüktif mekanizmalar yoluyla kemik oluşumunu indükleyen bir mineral rezervuarı olarak işlev gördüğü düşünülmektedir (137). Rezorpsiyon hızı yavaştır, çünkü greft kemik replasmanı için bir iskelet görevi görebilir (138).

HA granüllerinin tek başına veya otojen kemik greftleri ile birlikte kullanıldığı sinüs elevasyonu ve alveolar sırt augmentasyonu işlemlerinde yüksek başarı oranlarına ulaşılmıştır (139). Özelleştirilmiş Computer - Aided Design / Computer - Aided Manufacturing (CAD/CAM) sistemi kullanılarak üretilen pöröz hidroksiapatit iskeletleri ile atrofik mandibulanın (posterior bölge) vertikal augmentasyonu denenmiştir (140). Buna rağmen, HA'in in-vivo rezorpsiyon ve remodeling kapasitesi sınırlıdır. Bu nedenle vertikal kemik augmentasyonda onley kemik grefti olarak kullanımı uygun değildir (141,142).

2.2.4.3. Biyoaktif camlar

Biyoaktif cam silisyum dioksit (%45), kalsiyum oksit (%24.5), sodyum oksit (%24.5) ve fosfor pentoksit (%6)'den oluşur (143). İn-vivo olarak implante edildiğinde lokal çevrenin pH'ı 10 değerinin üzerine çıkar. Osteojenik hücreler ve kollajen lifler için bağlayıcı tabaka olarak işlev gören biyoaktif seramik yüzey üzerinde silikondan zengin bir jel oluşur. Partikül boyutları 90-710µm ile 300-355

um arasındadır (143). Boşluklu kalsiyum fosfat büyüme bölmelerinin oluşması, dış silika jel katmanına nüfuz eden ve jelin rezorbe olmasını sağlayan fagositozan hücrelerin bir sonucu olarak görülür. Bu olay osteoprojenitör hücrelerin yapışabileceği, diferensiye ve proliferate olabileceği keseler oluşumuna yol açar (144).

Birçok çalışmada biyoaktif camların daha üstün yönetilebilir, hemostatik ve osteokondüktif özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (144,145). Biyoaktif camlar ile ilgili alveolar ogmentasyon klinik raporlarında parçacıklara yakın temasta olan bölgelerde yeni kemik oluşumu gözlenmiştir (146). Bununla birlikte, biyoaktif camlar hiçbir şekilde rezorpsiyona uğramadıkları için kemik, parçacıkların çevresinde oluşur ve osteokondüksiyon yoluyla büyür. Bu süreç, biyoaktif camların vertikal alveolar ougmentasyon için biyolojik destekleyici iskelet olarak işlev görme kabiliyetini sınırlar.

2.2.4.4. Dikalsiyum fosfatlar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fizyolojik pH değerinde yüksek çözünürlüklü dikalsiyum fosfat bileşiklerinin başarılı bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir (147).

Brushit (dikalsiyum fosfat dihidrat, DCPD), örgü kemik ve fibrovasküler doku miktarlarında değişiklik oluşturan, kısmi osteogenezi destekleme yeteneğine sahip materyaldir. Birkaç klinik çalışmada enjekte edilebilir brushit materyalinin alveolar bukkal dehissens defektlerinde, atrofik kretlerde ve maksiller sinüs elevasyonunda kemik rejenerasyonuna katkı sağlayabileceği belirtilmiştir (148).

Monetit (susuz dikalsiyum fosfat, DCPA) bazlı biyomateryaller, brushite ile karşılaştırıldığında daha hızlı oranlarda rezorbe olur ve HA'ya dönüşmez (149,150). Monetit biyoseramik materyallerin onlay blokları (3D baskılı) ve granüller formları test edilmiştir (147). Monetit granülleri, insanlarda çekim sonrası alveoler soketlerde ve hayvanlardaki kraniyofasiyal defektlerde kemik iyileşmesini desteklemeyi başarmıştır (150). Monetit granüllerinin klinik performansı piyasada bulunan sığır

HA ile karşılaştırılmış ve alveolar çekim soketlerinde in-vivo daha fazla rezorpsiyon ve kemik formasyonu sonucuna varılmıştır (147).

2.3. Arı Sütü (Royal Jelly)

Arı sütü işçi arıların sefalik bezlerinin bir salgı ürünüdür. Bal arısı larva diyetinin en önemli parçasıdır ve kast farklılaşmasında kritik rol oynamaktadır (Şekil 2.7). Olgunlaşma sürecinin ilk günlerinde arı sütü tüm genç larvalara verilen tek besindir. Kraliçe arı ise, tüm yaşam dönemi boyunca bu özel besini tüketir. Diğer arılara göre kraliçe arının ömrünün uzun olmasının nedeni de budur. İnsanlar için en etkili ve yararlı ilaçlardan biri olan arı sütü hem geleneksel tıp, hem de genel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır ve etkili bir diyet takviyesidir.



Şekil 2.7: Arı sütü ve larvanın görünümü (151).

Karmaşık bileşimi (Tablo 2.2) (su, proteinler, lipidler, karbonhidratlar, amino asitler, mineraller, vitaminler, enzimler, hormonlar, oligo elementler ve doğal antibiyotikler) nedeniyle antioksidan, nörotropik, hipoglisemik, hipolipidemik, hepatoprotektif, hipotansif, antitümör, antibiyotik, antiinflamatuvar, immunomedülatör, antialerjik, kan basıncı düzenleyici etki, genel uyarıcı etki ve yaşlanmayı geciktirici etki gibi sayısız farmakolojik özelliklere sahiptir (152).

2.3.1. Arı sütü bileşimi

Arı sütü viskoz, jöle kıvamında olan bir maddedir. Suda 1.1 g / ml yoğunlukla kısmen çözünür. Rengi beyazımtırak olmakla birlikte sarıya yakındır. Depolama esnasında geçen zamanla sarı renge daha çok yaklaşır. Arı sütünün kokusu mayhoş ve keskin, karakteristik olarak ekşi bir tada sahiptir. Duyusal özellikler önemli kalite kriterleridir. Düzgün depolanmamış olan arı sütünün kıvamı koyu ve tadı acı olur. En iyi kalite için donmuş halde saklanmalıdır. Viskozite su içeriğine ve zamana göre değişir. Oda sıcaklığında veya 5°C'de buzdolabında saklandığında yavaş yavaş daha koyu kıvam alır. Artan viskozite suda çözünmeyen azotlu bileşiklerde artış ile birlikte çözünür azot ve amino asitlerdeki azalma ile ilişkilendirilmiştir (153). Görünüşe göre bu değişiklikler içerdikleri enzimatik aktiviteler ve lipid-protein fraksiyonları arasındaki etkileşime bağlı gerçekleşir (154).

Tablo 2.2: Arı sütünün bileşimi (%) (155).

Bileşen	%
Su	60-70
Protein	9-18
Mineraller	2-3
Karbonhidratlar	11-23
Yağlar	3-8

Nem

Arı sütünün %60-70'lik su içeriği ana bileşenini oluşturur. Kuru içerik karbonhidratlardan, proteinlerden, amino asitlerden ve yağlardan oluşur. Daha az miktarda mineral ve vitamin bulunmaktadır (153).

Proteinler ve peptidler

Azotlu maddeler bu grubun yaklaşık %97-98'ini oluşturmaktadır. Bunların yaklaşık %60'ı suda çözünür bileşenlerdir (156). Serbest amino asitler sadece %0.6-1.5 oranındadır, çoğunluğu L serisine aittir (Tablo 2.3). En karakteristik olan prolin ve lizindir. Oda sıcaklığında depolamadan sonra prolin ve lizin içeriği artarken, 10 ay boyunca 4°C'de depolandığında önemli bir amino asit değişikliği görülmemiştir. Bunun nedeni muhtemelen proteolitik enzim aktivitesidir.

Tablo 2.3 Arı sütünün amino asit içeriği mg/100g (155).

Amino asitler	mg/100g	Amino asitler	mg/100g
Aspartik	3851	Valin	573
Metiyonin	403	Arginin	-
Alanin	517	Amonyak	139
Glisin	421	Lisin	643
Prolin	-	Histidin	589
Fenilaiani	905	Serin	980
Sistin	-	Tirosin	828
Treonin	807	Lösin	962
Isolösin	312	Glutamik asit	3851

Lipidler

Arı sütü ağırlığının %3-19'u olan lipidlerin %80-90'ı serbest yağ asitlerinden, geriye kalan kısmı nötr lipitler, steroller ve hidrokarbonlardan oluşur (157). Organik asitlerin çoğunun mono-di hidroksi asitler ve 8-10 karbon atomlu dikarboksilik asitler şeklinde bulunduğu bildirilmiştir (158). Bu fraksiyonun tanımlanmasının arı sütü türünü belirlemek için tercih edilen kriter olduğu düşünülmektedir (2). 10-hidroksi-2-desenoik asit (HDA) arı sütünün incelenmesinde kullanılan bir asittir (159). HDA ve ayrıca arı sütünün diğer yağ asitleri antibakteriyel özelliklere sahiptir, böylelikle ürünlerde nispeten daha düşük bakteri içeriği olmasını sağlar (35).

Karbonhidratlar

Arı sütü çoğunlukla fruktoz, glukoz ve sükrozdan oluşur (Tablo 2.4). İçeriğinde aynı zamanda maltoz, trehaloz, melibioz, riboz ve erloz da bulunmaktadır (160).

Tablo 2.4: Arı sütü karbonhidrat içeriği (%) (153).

Karbonhidratlar	%
Fruktoz	3-13
Glukoz	4-8
Sükroz	0.5-2

Mineraller

Mineral içeriği taze arı sütünün %0,8 - 3'ünü oluşturur. Ana elementler K, P, S, Na, Ca, Al, Mg, Zn, Fe, Cu ve Mn'dır ; fakat az miktarda (0.01 1mg / 100g) Ni, Cr, Sn, W, Sb, Ti ve Bi elementleri de bulunur (Tablo 2.5). Arı sütü sodyum içeriği 11-14 mg / 100 g arasında değişir (161).

Tablo 2.5: Arı sütü mineral içeriği mg/100g (153).

Mineraller	mg/100g	Mineraller	mg/100g
Potasyum (K)	200-1000	Demir (Fe)	1-11
Kalsiyum (Ca)	25-85	Bakır (Cu)	0.33-1.6
Magnezyum (Mg)	20-100	Sodyum (Na)	11-14
Çinko (Zn)	0.7-8	Selenyum (Se)	0.006

Vitaminler

Arı sütü içindeki vitamin konsantrasyonları geniş bir spektrumda dağılır. Bu vitaminler; riboflavin, tiamin, niasin, folik asit,. piridoksin, biyotin, pantotenik asit ve inositol'dür (Tablo 2.6). A, D, E ve K vitaminleri gibi yağda eriyen vitaminler yokken sadece C vitaminin izleri görülmektedir (162).

Tablo 2.6: Arı sütü vitamin içeriği mg/100g (153).

Vitaminler	Niasin (B3)	Pridoksin (B6)	Tiamin (B1)	Riboflavin (B2)	Pantotenik asit (B5)	Folik asit (B9)
mg/100g	4.5-19	0.2-5.5	0.1-1.7	0.5-2.5	3.6-23	0.01-0.06

Diğer küçük bileşenler

Arı sütü içinde çeşitli kimyasal kategorilere ait çok sayıda küçük bileşen tanımlanmıştır. Bunların arasında sırasıyla 25 ve 5 µg/g ağırlıktaki biopterin ve neopterin olmak üzere iki heterosiklik madde vardır. Bu bileşikler işçi arı larvalarının yiyeceklerinde de bulunur, ancak miktar olarak bu konsantrasyonun yaklaşık onda biridir. Tanımlanan diğer maddeler arasında nükleotidler (adenosin, uridin, guanozin, iridin ve sitidin), fosfatlar (AMP, ADP, ATP), asetilkolin (1 mg / g kuru ağırlık) ve glukonik asit (taze ağırlığın %1.4'ü) bulunmaktadır (163). Benzoik asit (8-15 mg / kg), az miktarda malik asit, laktik asit ve sitrik asit de bulunmuştur (164).

2.3.2. Arı sütü biyoaktif maddeleri

10-hidroksi-2-desonoik asit ve diğer yağ asitleri: Arı sütünde organik asitlerin çoğu doğada nadiren karşılaşılan yapı olan mono-di hidroksi asitler ve 8-10 karbon atomlu dikarboksilik asitler şeklinde görülür (158).

Proteinler ve peptidler: Schmitzova ve ark. (165), arı sütü proteinlerinin %82-90'ının majör tip arı sütü proteinine (RRJP) ait olduğunu ileri sürmüşlerdir. RRJP albümin protein sınıfına aittir (166). Arı sütü immün-modülatör aktiviteye (167) ve farklı glikoproteine sahiptir (168). Ayrıca, arı sütü apisimin olarak tanımlanan peptidleri de içerir. Bir tanesi antihipertansif ve antibakteriyel etkileri olan jeleinedir (169).

Adenozin monofosfat NI oksit: Adenozin monofosfat NI oksit, yalnızca arı sütü içinde bulunan bir bileşiktir. Ana etkisi merkezi sinir sistemi üzerindedir. Sinirsel farklılaşmayı uyarır ve nöronal hasara karşı merkezi sinir sistemini oluşturan her üç hücre tipi (nöronlar, astrositler ve oligodendrositler) oluşumunu teşvik eder (170).

Asetilkolin : Asetilkolin 1 mg/g kuru ağırlık konsantrasyonunda merkezi ve otonom sinir sisteminde bir takım hormon benzeri etkilere sahiptir (171).

Hormonlar (testosteron, progesteron, prolaktin ve östradiol): Arı sütü içinde bulunan hormonlar (testosteron, progesteron, prolaktin ve östradiol) erkek ve dişi fertilitasını artırır, ayrıca güç ve dayanıklılığa katkıda bulunur (172).

Polifenoller: Polifenollerin arı sütünde antioksidan etkiye katkı sağladığı düşünülmektedir (173). Arı sütü biyoaktif maddeleri ve bilimsel çalışmalarla kanıtlanan etkileri Tablo 2.7' de gösterilmiştir.

Tablo 2.7: İzole edilmiş arı sütü bileşikleri ve etkileri (174).

İçerik	Biyolojik etki	Referans
Royalaktin	Antibakteriyel	Barnuti ve ark. (2001); Bilikova ve ark. (2015); Boukraâ ve ark. (2008); Fontana ve ark. (2004); Sheridan ve ark. (1993)
Royalisin	Antimikrobiyal	Tseng ve ark. (2011)
10-Hydroxy-2-decenoic Acid (10HDA)	Antikanser, antianjiogenezis, immunomodulator	Yang ve ark. (2010), Izutu ve ark. (2009)
Trans-2-decenoic acid (2DEA)	Östrojenik	Suzuki ve ark. (2008)
Adenosine monophosphate (AMP) N1-oxide	Nörotrofik	Hattori ve ark. (2007)
Arı sütü peptitleri (RJPS)	Antioksidan	Guo ve ark. (2009)
24-methylenecholesterol (24MET)	Östrojenik	Suzuki ve ark. (2008)
MRJP3	Antihiperlipidemik	Kashima ve ark. (2014)

2.3.3 Arı sütünün biyolojik etkileri

Antioksidan etki

Arı sütü doku DNA'sını oksidatif hasara karşı korumaktadır. 16 hafta boyunca farelere arı sütü verilerek yapılan bir çalışmada, böbrek DNA'sında ve serumda 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (oksidatif stres markırı) seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı görülmüş ve farelerin ortalama ömrü azaltılmış oksidatif hasar mekanizması yoluyla artırılmıştır (10).

Nörotrofik etki

Arı sütünün hafızayı iyileştirdiği, bunamayı önlediği, enerjiyi arttırdığı, anksiyeteyi ve hiperaktiviteyi azalttığı bilinmektedir (175). Periferik ve merkezi sinir sistemlerinde nörotransmitter olan, somatik sinir sistemin motor bölümünün tek nöromodulatorü asetilkolin, büyük miktarlarda arı sütünde bulunur. Arı sütü her tür beyin hücresinin sinir kök hücrelerinden farklılaşmasını desteklerken, arı sütünün doymamış yağ asidi karakteristiği nöron üretimini artırır ve sinir kök hücrelerinden astrosit gelişimini azaltır. Arı sütü yetişkin fare beyninin hipokampusunda nörotrofik ve nöroprotektif rol oynamıştır (176). Oral yoldan uygulanan arı sütü, hipokampus dentat gyrusundaki granüler hücrelerin sayısının artmasında ve etkilenen bilişsel

sürecin aynı anda iyileştirilmesinde etkili olmuştur (177). Trans-10-hidroksi-2-desanoik asit sinir kökünün nöronlara in-vitro olarak farklılaşmasını stimüle eder (178).

İnsülin benzeri etki

Arı sütü, insülin benzeri peptidler ve diğer bileşikler (krom, kükürt, B3 vitamini ve H) yoluyla kan şekeri seviyesini düşürür. İçinde bulunan insülin benzeri peptidlerin insülinik etkileri yoluyla enerji elde etmek için glikozun oksidasyonunda yer alarak optimum şeker seviyesini sürdürebilir (179). Arı sütünde bulunan insülin, memelilerde bulunan insüline çok benzerdir (180). İnsüline dirençli diyabet hastalarında arı sütü enjeksiyonundan 3 saat sonra şeker düzeyinde %33'lük önemli bir düşüş meydana gelmiştir. Arı sütü ratlarda şeker hastalığını indükleyen Alloxan'ı azaltarak etki gösterir. İnsülin dirençli sıçanlara 8 hafta boyunca arı sütü ve fruktoz solüsyonu eşzamanlı olarak uygulaması, glukoz veya toplam kolesterol kan seviyelerini etkilemeksizin insülin ve trigliserid plazma konsantrasyonu ile sistolik arter basıncını düşürmüştür. Arı sütü, diyabetli hastalarda hipertansiyon gelişmesine neden olan insülin direncinin önlenmesi için fonksiyonel bir diyet tedavisi olabilir. İnsanlarda trigliseritleri ve kolesterolü düşürüp kontrol altına almak için arı sütünün kolesterol düşürücü ve hepatoprotektif özelliği önemlidir (181).

Aterosklerozlu hastalarda 50-100mg RJ/gün uygulanması total kolestrol serum seviyesini %14 ve toplam lipidlerin seviyesini %10 düşürmüştür (182). Yaşlı insanlarda 14 gün süreyle günde 10g'lık alınan arı sütü, serum trigliseridlerini etkilemeksizin serum yüksek yoğunluklu lipid (HDL) ve düşük yoğunluklu lipid (LDL) seviyelerini arttırmıştır (183). Kamakura ve ark. (184) fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, kolesterol düzeylerini azaltan etkinin karaciğerde kolesterol birleşmesinde yer alan skualen epoksidaz enziminin (SQLE) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörlerinin (LDLR) düzenlenmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Arı sütü, özellikle hepatositler olmak üzere hücresel büyümeyi uyarır. 57 kDa protein bu etkiden sorumlu görülmektedir (184). Bu protein kolesterol seviyesinin yükselmesini indükleyen Nikotin-1'i inhibe eder (185). Arı sütü sıçanlarda fumosinlere (mikotoksinler) karşı karaciğer ve böbreklerin serum seviyelerinde belirgin histolojik ve histokimyasal iyileşmeler içeren doz bağımlı bir koruyucu etkiye sahiptir (186). İnsan ve hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda arı sütü, glikojenin yenilenmesini sağlamış, amonyak ve latic (yorulmadan sorumlu) detoksifikasyonuna yardımcı olmuştur (184). Ayrıca, arı sütü karaciğere oksijen akışını arttırarak hepatositlerin gelişmesini uyarır (182).

Hipotansif etki

Takaki-Doi ve ark. (187), peptidlerin anjiyotensin-1 dönüşüm enzimi (ACE) üzerinde inhibitör etki gösterdiğini ve spontan hipertansif farelere tekrarlayan oral arı sütü uygulamaları sonrasında kan basıncının düştüğünü ileri sürmüşlerdir. Arı sütünün anti-hipertansif etkisi %38 oranında yüksek bulunmuştur (188). Arı sütü içerisindeki trans-2-oktenoik asit ve hidroksidesanoik asit antihipertansif etkiden sorumlu olabilir. Ayrıca, arı sütü ile adrenal kaynaklı aritmilere karşı koruyucu ve terapötik etkiler ilişkilendirilmiş, nabız üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (189).

Antitümöral etki

Antitümör etki mekanizması arı sütü içinde bulunan 10-hidroksi-2-desenoik asit (10HDA) ile gerçekleşir. 10HDA, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'in indüklediği anjiyogenezis üzerinde inhibitör etki gösteren bir maddedir. Böylece, arı sütü hem hücre proliferasyonunu hem de hücre göçünü engelleyerek tümör vaskülarizasyon inhibisyonuna neden olur (190). Arı sütündeki iki önemli protein olan Apalbumin-1 ve Apalbumin-2 fare makrofajlarını uyararak TNF- α salınımına katkıda bulunur (191). Arı sütü Ehrlich ascetik tümör (EAT) taşıyan farelerde tümör gelişimi ve splenik hematopoez baskılanmasını indükleyen myelosupresyonu önleyerek bağışıklığı uyarıcı etki gösterir. Tedavinin başlama evresine, süresine ve arı sütü dozuna bağlı olarak etki miktarı değişmektedir (192).

Kamakura ve ark. (193) arı sütünün anti-östrojenik etkisiyle MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu uyaran bisfenol-A östrojenini inhibe ettiğini bulmuşlardır. RJP30 antitümöral rol oynadığı tespit edilen diğer bir arı sütü fraksiyonudur. RJP30 servikal rahim karsinomasının HeLa hücreleri üzerine 7 günlük tedavi sonrasında ilk hücre yoğunluğunu 2,5 kat azaltarak sitotoksik etki göstermiştir (194).

Antibiyotik etki

Arı sütü royalisin proteininin gram pozitif bakterilere (*Lactobacillus helveticus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Leucnoscoc*, *Staphilococcus*, *Streptococcus*) karşı güçlü antibakteriyel etkisi olduğu kanıtlanmıştır, ancak royalisinin gram-negatif olanlara karşı etkisi bulunamamıştır (195). Arı sütünün proteinler ve peptidler gibi suda çözünür bileşenlerinin gram-pozitif bakteri ve mantarları inhibe etme kapasitesi vardır (196). Tüm bu antibakteriyel bileşenlerin arıların bağışıklık sisteminde yer aldığı kabul edilmektedir.

Hem arı sütü hem de nişastanın *Streptococcus aureus* ve *E.coli*'ye karşı in-vitro kümülatif veya sinerjik etkileri olduğu; ayrıca arı sütü ve balın *Staphylococcus aureus*'a karşı antagonist etki gösterdiği bildirilmiştir (197). Abdelatif ve ark. (198) ekstremiteleri tehdit eden, kutanöz ülser ve derin doku enfeksiyonlarıyla karakterize diyabetik ayak enfeksiyonu olan 60 diyabet hastası üzerinde yaptıkları çalışmalarında arı sütü ve panthenol merhem ile yaraları başarı ile tedavi etmişlerdir.

Anti-inflamatuar ve yara iyileştirici etki:

İn-vitro çalışmalarda lipopolisakaridler ve IFN- γ ile muamele edilen farelerde peritoneal makrofaj kültürüne eklenen arı sütü süspansiyonlarının doza bağımlı olarak pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-6, IL-1) üretimini etkin bir şekilde inhibe ettiği ortaya konulmuştur. Arı sütünün makrofajlar üzerinde sitotoksik etkisi olmaksızın pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını baskılayan faktörleri (MRJP3) içerdiği düşünülmektedir (199). Arı sütü, anti-inflamatuar etkiye sahiptir ve granülasyon dokusu oluşumunda eksüda ve kollajen formasyonunu destekleyerek

yara iyileşme kapasitesini artırır. Deskuame cilt lezyonlarının iyileşme süresini kısaltır (200). Arı sütü, askorbik asit-2-Oa-glikid (AA-2G) varlığında 10-hidroksi-2-dekenoik asit (10H2DA) ve 10-hidroksidekanoik asit (10HDA) etkisiyle deri fibroblastlarının kollejen üretimini artırır. 10H2DA, kollajen üretimi için önemli olan transforme edici büyüme faktörü TGF- β 1'in üretimini başlatır (201). Suemaru ve ark. (202), farklı arı sütü konsantrasyonlarına sahip merhemlerin 5-fluorourasil kaynaklı hasarları önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Bu da, arı sütü topikal uygulamasının kemoterapi ile oluşan şiddetli oral mukozit üzerinde olumlu etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

İmmünomodülatör ve antialerjik aktivite:

Arı sütü amino ve gamma globulin doymamış yağ asitleri, hormonlar, enzimler, proteinler, E vitamini ve bağışıklık sisteminde enfeksiyonlarla mücadelede yardımcı olan A vitamini içerir. Arı sütünden izole edilen yağ asitleri (10HDA ve 3-10-dihidroksidekanoik asit), konsantrasyona bağlı olarak farklı yollarla sıçan dendritik hücre ve T hücre kültürlerinde immün cevabı modüle eder. Arı sütü T hücrelerinin çoğalmasını uyarır, fakat yüksek konsantrasyonlarda inhibe eder. IL-2 üretimini azaltırlar ve IL-10'u artırır (203).

Arı sütünden izole edilen farklı bileşenlerin sıçan T hücresinde etkileri benzer bulunmuştur ve su ekstraktının in-vitro en güçlü immüno-modülatör aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmektedir (204). Okamoto ve ark. (167) tarafından 70 kDa glikoproteininin in-vivo ve in-vitro immün yanıt modülasyonu, IL-4, IL-2 ve gamma-IFN üretimini baskılamanın yanında T lenfosit proliferasyonunun inhibisyonunda da rol oynadığı bildirilmiştir. Farelerde yapılan başka bir deneysel modelde MRJP3'ün intraperitoneal uygulaması spontan hipersensitibilibiteyi indükleyen ovalbümini baskılamıştır.

Tavuklarda 28 gün boyunca yapılan arı sütü uygulamasıyla dolaşımdaki lökositlerin ve lenfositlerin sayısında artış (serum globulin düzeylerinde azalma) bulunmuştur (205). Tavuklarda koyun eritrositleriyle (SRBC) hayvan

immünizasyonu söz konusu olduğunda, arı sütü verilen grupta antikor üretiminde belirgin bir artış görülmüştür (206). Dalak tümörü taşıyan farelerde arı sütü uygulanmasıyla kemik iliği kök hücreleri ve hematopoez üzerinde pozitif etkiler görülmüş ve miyeloprotektif etki kanıtlanmıştır (192). Sistemik lupus eritematosuslu farelerde arı sütü uygulaması serum IL-10, anti-DNA antibody, anti-eritrosit antibody seviyelerinde belirgin bir düşüşe neden olup splenik oтореaktif B lenfosit sayısını azaltarak otoimmüniteyi inhibe etmiştir. Hastalık belirtilerinin başlamasından önce oral yolla uygulanan arı sütü hastalığı geciktirirken, belirtilerden sonra verilmesi proteinüriyi azaltarak yaşam süresini uzatmıştır (207).

Erem ve ark.(13) Grave's hastalığında arı sütünün sağlıklı lenfositlerin proliferasyonunu ve çeşitli sitokinlerin (gamma-IFN) sekresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Arı sütü ile tedavi edilen hasta lenfositlerinde Th1 / Th2 (IFN γ / IL-4) sitokinleri arasındaki oran Th1 lehine değişmiş ve tiroid uyarıcı hormon reseptörüne (Ac-TSHR) karşı antikor seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonuçlar, arı sütünün etkisinin Ac-TSHR'yi düşürmek için kullanılan olağan ilaçlara benzer olduğunu düşündürmektedir.

Arı sütü, TNF'ye spesifik IFN-gamma üretiminin düşürülmesi ve iNOS ekspresyonunun yükseltilmesi yoluyla atopik dermatitlerden kutanöz lezyonların gelişimini durdurur. Bunun yanında hipertrofi, hiperkeratoz ve epidermis-dermis inflamatuvar hücrelerin infiltrasyon seviyelerini düşürür (208). Arı sütü, askorbik-1-O-alfa-glikozid asit varlığında kutanöz fibroblastların kollajen üretimini uyarmasıyla bilinir. Ayrıca, saflaştırılmış arı sütü 10HDA'ya benzer olarak kollajen üretiminde önemli bir faktör olan growth factor beta-1 dönüşümünü sağlamak için fibroblastları uyarabilmektedir (201).

Üreme sistemi ve doğurganlık üzerine etkileri:

Arı sütü, arı larva hücrelerinin tamamen gelişmesini sağlar ve ömrü boyunca yumurtlama kapasitesini korur. Arı sütünün bu alışılmadık özelliği doğurganlık ile bağlantı olasılığını artırır. Arı sütünün geçmiş dönemlerde doğurganlığın uyarıcısı

olarak kullanıldığı bilinmektedir (152). Ovum ve sperm kalitesini arttırarak perimenopozal semptomlarda, osteoporozda, hormonal dengeyi ve fertilitiyi arttırmada etkilidir (209).

Suzuki ve ark. (210), bu ürünün düzenli olarak en az 6 ay tüketen kadınlarda doğurganlığı artıran önemli bir para-aminobenzoik asit kaynağı olduğunu bildirmişlerdir. Pantotenik asit (vitamin B5) ile birlikte bu asit saç ve cilt sağlığı için protein kullanımını indükler. Arı sütünden gelen birçok yağ asiti insan östrojenlerini taklit eder. Arı sütünün östrojen reseptörleri ile etkileşime girerek modifiye edilmiş gen ekspresyonuna ve hücre çoğalmasına yol açan düşük östrojenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (211).

Suzuki ve ark. (210), arı sütünün uterus lümen epitelinde hipertrofi oluşturduğunu bildirmişlerdir. Oral yoldan verilen arı sütü yaz kısırlığına karşı (bir dizi spermografi parametrelerinin önemli gelişimi) etkili olabilmekte ve erkek tavşanlardaki fizyolojik durumu iyileştirebilmektedir. Arı sütü östrojen içermesi, doğum oranı ve gebeliği geliştirmesi ile at koryonik gonodotropinine benzer etkiler gösterir (212). Buna rağmen, başka bir çalışmada da oral yoldan uygulanan arı sütünün koyunlarda aktif ve aktif olmayan üreme dönemleri arasındaki geçiş sırasında östrusun iyileştirilmesinde etkili olmadığı görülmüştür (213).

Arı sütü kas efor kapasitesi, vital kapasite, solunum fonksiyonu ve enerji düzeylerini artırır. Ayrıca kronik hastalıklarda enerjik olma hissini arttırdığı da belirtilmiştir (179). Yara iyileşmesinde ve ameliyat sonrası dönemlerde çok iyi sonuçlar vermiştir (214).

Güç ve dayanıklılık etkisi

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü, (FAO) (1996), insanlarda pantotenik asitin vücudun lipidleri metabolize etmesine ve böbrek üstü bezlerini destekleyerek stres cevap kapasitesini iyileştirmesine yardımcı olan koenzim A'ya dönüştürüldüğünü bildirmiştir. Arı sütünün pantotenik asit (B5) içeriği bilinen

herhangi bir kaynaktan daha yüksektir. Kamkura ve ark. (184), farelerde yaptıkları çalışmalarında arı sütünün fiziksel yorgunluğu önleyip, laktat ve serum azotu birikimlerini azalttığı sonucuna varmışlardır.

Arı sütünün farklı zamanlarda yapılmış çalışmalarla desteklenen çeşitli biyolojik özellikleri Tablo 2.8’de özetlenmiştir.



Tablo 2.8: Arı sütü biyolojik etkileri (174).

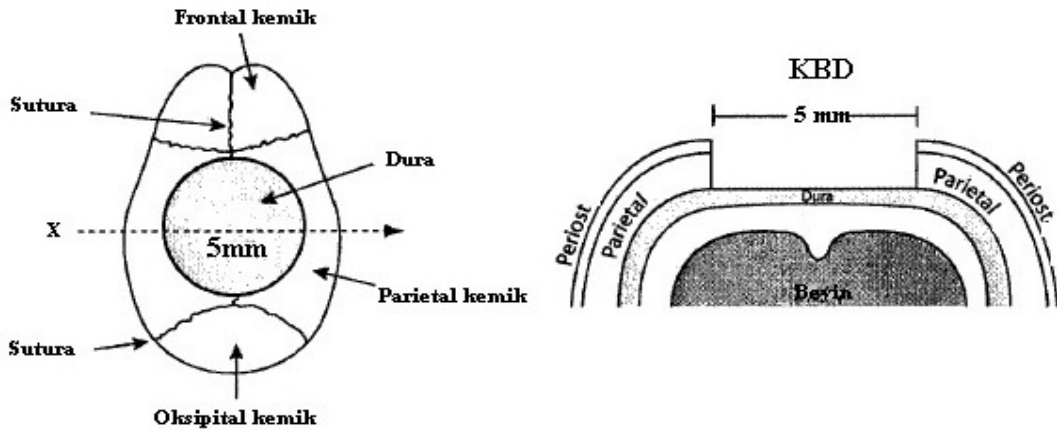
Hücre/sistem	Etki	Preparat	Referans
Mikroorganizma	Antibakteriyel	10HDA	Genç ve Aslan (1999; Kitahara ve ark. 1995)
	Antibakteriyel	AS	Bincoletto ve ark. (2005); Manfredi ve Chiodo (2000)
	Antibakteriyel	AS	Barnu,tiu ve ark. (2011); Bılikova ve ark. (2015); Boukraâ ve ark. (2018); Fontana ve ark. (2004)
Mikroorganizma	Antifungal	Royalisin	Moselhy ve ark. (2013)
Yaralar	Antimikrobiyal	Royalisin	B̃arnu,tiu ve ark. (2011)
Ayak ülserleri	Yara iyileştirici	Merhem (AS ve penthanol)	Abdelatif ve ark. (2008)
İn-vitro	Antioksidan	Arı sütü proteinleri (RJP)	Guo ve ark. (2009)
Böbrek	MDA seviyelerinde azalma ve GPx, CAT, GSR, SAD	AS	Inoue ve ark. (2003); Karadeniz ve ark.(2011); Silici ve ark. (2009)
Eritrosit	Antioksidan etki	AS	Pourmoradian ve ark. (2014)
İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7)	Antikanser etki	AS	Nakaya ve ark. (2007)
İnsan umbilikal ven endotelial hücreleri (HUVEC)	Hücre migrasyon ve proliferasyonunun inhibisyonu	10-Hydroxy-2-decanoic acid	Izuta ve ark. (2009)
Kan	Antidiabetik	AS	Kimura (2008); Shirzad ve ark. (2013)
Kolon	İnsülin direncini azaltma	AS	Zamani ve ark. (2012)
	Antiinflamatuvar	AS	Karaca ve ark.(2012)
Periferik kan mononükleer hücreler	Proliferasyon inhibisyonu	3, 10-dihydroxy-decanoic acid (3, 10-DDA)	Mihajlovic ve ark. (2014)
Kan serumu	Serum kolesterolünü düşürme Kolesterol ve total lipid seviyesinin düşmesi	Major AS protein1 (MRJP1) AS	Kashima ve ark. (2014) Kamakura (2011);Abdelhafiz ve Muhamad (2008);Vitte(1995)
Üreme sistemi	Asthenozoospermia tedavisi	AS+bal	Abdelhafiz ve Muhamad (2008)
Kan basıncı	Antihipertansif	MRJP	Leung ve ark. (1997)
Erkek üreme sistemi	Fertilite	AS	Amirshahi ve ark. (2014); Ghanbari ve ark. (2015);Gimenez-Diaz ve ark. (2012)
Kadın üreme sistemi	Hormonal bozuklukların inhibisyonu	AS	Elnagar (2010); Eshtiyaghi ve ark. (2016); Kohguchi ve ark. (2007);Kridli ve Al-Khetib (2006)
Hormon	Testeteron, progesteron ve LH sekresyonunda artış	AS %10'luk solüsyonu	Hang ve ark. (2008).
Karaciğer	Hepatoprotektif AS		Cihan ve ark. (2013); El-Nekeety ve ark. (2007); Kanbur ve ark. (2009); Yıldırım ve ark. (2012)
Kemik	Osteoporozdan koruma AS		Hidaka ve ark. (2006)
Diğer	Postmenapozal osteoporozu azaltma AS		Nagai ve Inoue (2004); Kim ve ark. (2010); Park ve ark. (2012)

AS=Arı sütü ;MDA=Malondialdehit; GPx=Glutasyon peroksidaz; CAT=Katalaz; GSR=Glutasyon redüktaz; SOD= Süperoksit dismutaz

Kritik boyutlu kemik defektleri

Kemik kırıkları veya kemik defektlerinin iyileşmesini hızlandırdığı düşünülen kemik greftleri, kemik benzeri ürünler, büyüme faktörleri veya rekombinant büyüme faktörleri gibi pek çok malzeme günümüz cerrahisinde kullanımdadır. Defekt boyutu ve hayvan tipi kemik iyileşmesini etkilediği için maddelerin etkinliğinin karşılaştırılabilmesinde standart bir kemik modeline ihtiyaç vardır. Kritik boyutlu kemik defekti, deney hayvanının ömrü veya bilimsel araştırmanın süresi boyunca kemik grefti gibi ek müdahale olmaksızın kemikteki tamamen iyileşemeyen en küçük boyutlu defekt olarak tanımlanır (215). Kritik boyutlu defekt modelleri kemik iyileşmesi deneylerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kranyum embriyolojik ve morfolojik olarak intramembranöz kemikleşme izlediğinden, gelişimsel olarak aynı özelliklere sahip maksillofasiyal bölge kemik iyileşmesine iyi bir modeldir. Kanlanmasında arteria meningia media, duradan ve dış yüzeyden gelen arteriyoller etkindir. Sıçan kalvaryumu modelinde defektler frontal ile oksipital kemikler arasındaki parietal kemikte yapılır (Şekil 2.8). Bir kritik boyutlu defektin boyutu veya çapı örneğin cinsine ve anatomik bölgeye göre değişir. Kranyumdaki kritik defekt boyutu farelerde 4-5 mm (216), sıçanlarda 8 mm (217,218), tavşanlarda 15 mm (218) ve koyunlarda 20 mm (219) çapındadır.



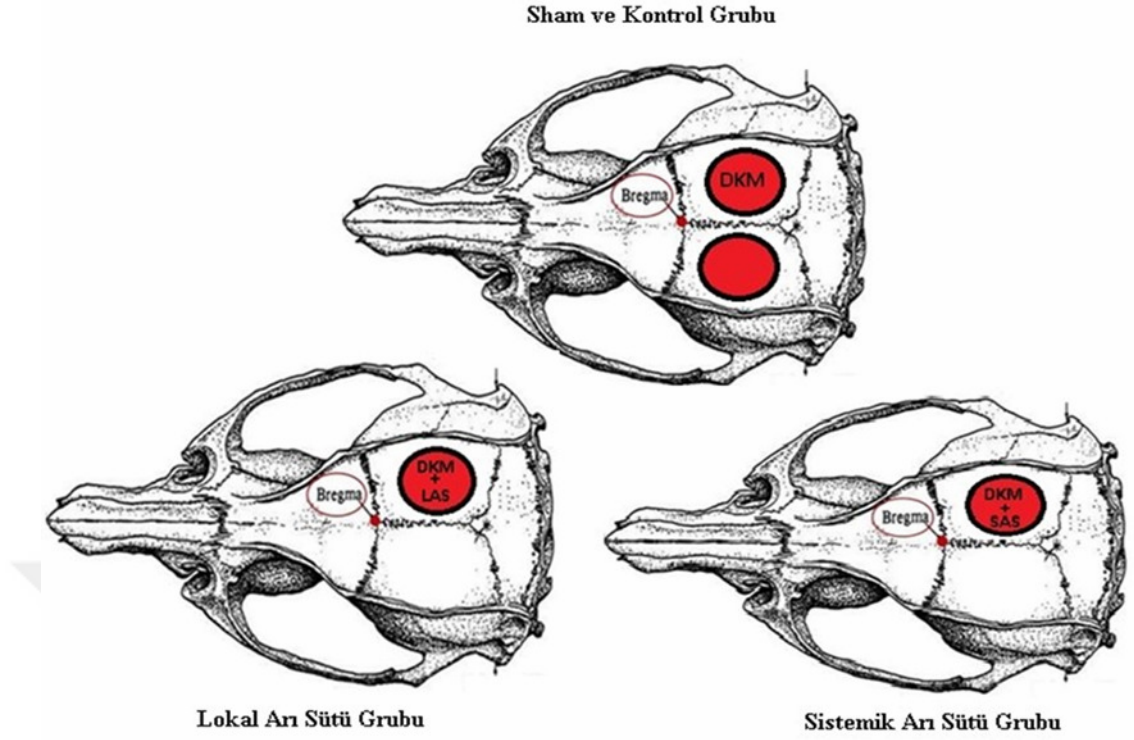
Şekil 2.8: Kalvaryal kritik boyut kemik defekti şematik gösterimi (220).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu Onayı alındıktan sonra (Bkz. Ek-1); hayvan deneyleri Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, histopatolojik incelemeler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmada 8 haftalık 19 adet Albino-Wistar cinsi erkek rat kullanıldı. Ağırlık ortalamaları 300 gram(gr) olarak ölçüldü. Denekler, çalışma boyunca laboratuvar hayvanları bakım prensibine uygun olarak 22 ± 2 santigrat derece ($^{\circ}\text{C}$) kontrollü oda sıcaklığında, 50 ± 10 nem oranında, 12 saat gündüz 12 saat gece sirkülasyonunda, gıda ve suya serbest ulaşabilecekleri şartlarda muhafaza edildi.

Bu çalışmada bir sham grubu, bir kontrol grubu ve iki deney grubu olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu (Şekil 3.1). Denek sayısını azaltmak için sham ve kontrol grupları aynı rat üzerinde çalışıldı.

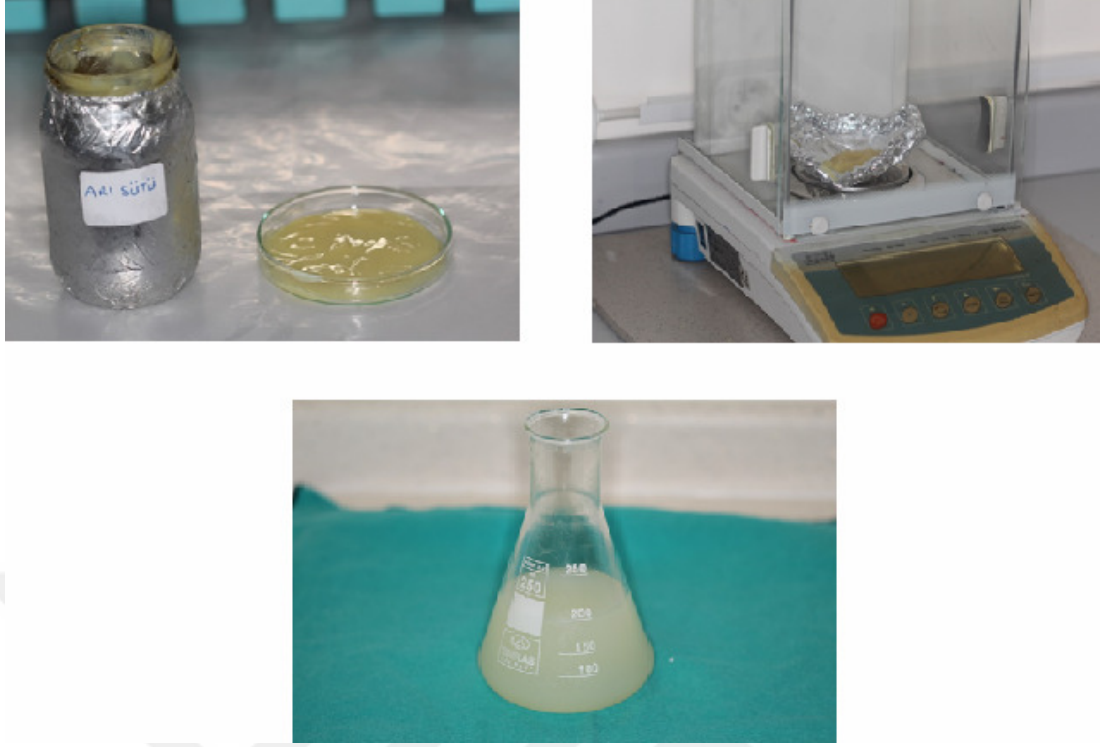


Şekil 3.1: Çalışma gruplarının şematik gösterimi.

- 1. Grup (n=5):** Sham grubu - Boş bırakılan (S)
- 2. Grup (n=5):** Kontrol grubu - Sadece DKM (DKM)
- 3. Grup (n=6):** Lokal arı sütü grubu - DKM + Lokal arı sütü (DKM+LAS)
- 4. Grup (n=7):** Sistemik arı sütü grubu - DKM+Sistemik arı sütü (DKM+SAS)

3.1. Arı Sütünün Hazırlanması

Arı sütü, bu çalışma için Trabzon Arıcılar Birliği'ne bağlı Fanus Gıda şirketinden saf ve organik bir şekilde temin edildi. Arı sütü süspansiyonu, literatür incelemeleri sonrasında lokal ve sistemik kullanıldığında optimum etki sağlamak için, 50 miligram(mg)/mililitre(ml)(%5) konsantrasyonunda hazırlandı (Resim 3.1)(221). Bu konsantrasyona ulaşmak için distile su ile karıştırılan arı sütü 10 dakika boyunca 10000XG hızında santrifüj edildi. Süspansiyon her uygulama öncesi taze olarak hazırlandıktan sonra kalan kısım üretici firmanın öngördüğü şekilde +4°C sıcaklıkta karanlık ortamda saklandı.



Resim 3.1: %5 oranında seyreltilen saf arı sütü

3.2. Cerrahi Yöntem

Deney hayvanlarını genel anesteziye almak için dissosiyatif anestezik Ketamin HCl (Ketalar®; Eczacıbaşı-Warner Lambert, İstanbul, Türkiye) 40-50 mg/kg oranında, trankilizan olarak α -2 adrenerjik agonisti Ksilizan (Rompun® %2; Bayer, İstanbul, Türkiye) 2-5 mg/kg oranında intramusküler yolla enjekte edildi. Operasyon boyunca vücut ısılarının sabit kalması ve hipotermi gelişmemesi için ratlar 35-37°C'de ısıtıcı cihazda bekletildi. Operasyonun yapılacağı kalvaryal alan traş edildikten sonra polivinilpirolidon-iyot (Batticon®; Adeka, İstanbul, Türkiye) içerikli antiseptik solüsyonla silindi (Resim 3.2 ve Resim 3.3).



Resim 3.2: Operasyon sahasının traş edilmesi



Resim 3.3: Betadine solüsyonu ile cerrahi alan antisepsisinin sağlanması

Anestezinin etkisi, enjeksiyon yapılmayan taraftaki ayağın çimdiklenmesiyle oluşan tepkiye göre değerlendirildi. Ayağında tepki olan deneklerde anestezinin derinleşmesi için beklenerek tekrar test yapıldı. Tepki vermeye devam eden hayvanlara ek anestezi verildi. Denekler dorsa ventral pozisyonunda stereotaktik frame aygıtında stabilize edildikten sonra cerrahi işlem başlatıldı (Resim 3.4).



Resim 3.4: Stereotaktik frame aygıtı ve çalışma alanı

Orta hatta cerrahi bisturi yardımıyla 20 mm longitudinal bir cilt insizyonu yapıldı ve elevasyonlar ile parietal kemik ortaya çıkarıldı (Resim 3.5).



Resim 3.5: Parietal kemiklerin ekspozisyonu

Bregma noktası referans alınarak parietal kemiklerde trefayn frez (Resim 3.6) yardımıyla 5 mm çapında kaviteler oluşturuldu. Soğutma amaçlı steril sodyum klorürle irrigasyon yapıldı. Kavite açılırken dura materin zarar görmemesine dikkat edildi (Resim 3.7).



Resim 3.6: Kaviterin hazırlanmasında kullanılan motor ve 5mm çapında özel tasarlanmış trephayn frez



Resim 3.7: Duramater ve sagittal sinüsün korunduğu kritik boyuttaki bilateral kalvaryal kemik defektleri

Grup I (Sham grubu (S) - 5 adet) ve Grup II (Kontrol grubu (DKM) – 5 adet): Parietal kemiklerde bilateral, dura matere kadar tam kat 5mm çapında kritik boyut kemik defekti oluşturuldu. Denek sayısını azaltmak için bu grupta bilateral kavite tercih edildi. Hazırlanan defektlerden kontrol grubu tarafı(sağ) allojenik demineralize kemik matriksi (Resim 3.9) ile doldurulurken sham grubu tarafı(sol)

boş bırakıldı (Resim 3.8). Periost 4/0 Vicryl® ile, cilt insizyonu ise 3/0 ipek ile suture edildi. Denekler 8. haftanın sonunda sakrifiye edildi.



Resim 3.8: Sham kavitesi boş bırakılırken kontrol kavitesinin DKM ile doldurulması



Resim 3.9:Kavitelere kullanılan DKM

Grup III (Lokal arı sütü grubu (DKM+LAS) - 6 adet): Deneklerin kalvaryasında sagittal süturun sadece sağ tarafında olacak şekilde 5 mm çapında kritik boyut kemik defekti oluşturuldu. Hemen öncesinde %5 oranında hazırladığımız arı sütü, steril bir godede DKM ile lokal karıştırılıp 5 dk bekletildi. Arı sütüne emdirilen DKM daha sonra kavitelere uygulandı (Resim 3.10). Periost 4/0

Vicryl® ile, cilt insizyonu ise 3/0 ipek ile suture edildi. Denekler 8. haftanın sonunda sakrifiye edildi.



Resim 3.10: Lokal olarak arı sütüne emdirilen DKM'nin kaviteye uygulanması

Grup IV (Sistemik arı sütü grubu (DKM+SAS) – 7 adet): Deneklerin kalvaryasında sagittal suturen sadece sağ tarafında olacak şekilde 5 mm çapında kritik boyut kemik defekti oluşturuldu. Kaviteler kontrol grubunda olduğu gibi yalnız DKM ile dolduruldu. Periost 4/0 Vicryl® ile, cilt insizyonu ise 3/0 ipek ile suture edildi (Resim 3.11). %5'lik arı sütü günde 100mg/kg olacak şekilde 8 hafta boyunca orogastrik gavaj yoluyla sistemik olarak uygulandı. Denekler 8. haftanın sonunda sakrifiye edildi.

3.3. Ratların bakımı ve deneyin sonlandırılması

Denekler kontrol edilip yara bakımı yapıldıktan sonra kafeslere yerleştirildi. Postoperatif dönemde deney hayvanlarına analjezik olarak Carprofen 4mg/kg (Rimadyl, Pfizer) ve antibakteriyel olarak Ceftriaxon 25 mg/kg (Rocephin, Roche) 5 gün süre ile intramusküler yöntemle uygulandı.



Resim 3.11:Cilt insizyonunun 3/0 ipek suture ile kapatılmış görünümü

8. haftanın sonunda yüksek doz ketamin ile yapılan anestezi sonrasında intrakardiyak yoldan kanları alınarak ratlar kurban edildi. Kurban edilen deneklerin parietal kemikleri defekt bölgesini de içine alacak şekilde çıkarıldı ve histopatolojik inceleme için %10'luk formol içine konuldu.

3.4. Histolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme

Doku takip aşaması

Dokular %10'luk formik asit içine alınarak dekalsifiye edildi. Hazır olan dokular formik asitten çıkarılıp doku takip aşamalarından geçirildi;

- ❖ %10'luk formaldehit ile tespit
- ❖ Yıkama
- ❖ Alkol serilerinden geçirme (%70-%80-%96-%96-%100-%100 etil alkol, 1'er saat)
- ❖ Ksilol I (1 saat)
- ❖ Ksilol II (1 saat)
- ❖ Ksilol + parafin (30 dk)
- ❖ Parafin I (2-3 saat)
- ❖ Parafin II (2-3 saat)
- ❖ Bloklama

Hematoksilen-eozin boyaması

Parafin bloklar hazırlandıktan sonra dokular 2-5µm kalınlığında mikrotom (Leica RM 2125 RT) ile kesilerek lamalar üzerine alındı. Hazırlanan kesitler histolojik inceleme yapabilmek için rutin Hematoksilen-Eozin boyama ile boyandı;

- ❖ Etüvde 30 dk bekleme (deparafinizasyon)
- ❖ Ksilol x2 (2dk)
- ❖ Alkol serilerinden geçirme (%100, %100, %96, %96)
- ❖ Yıkama
- ❖ Hematoksilen (3-5 dk)
- ❖ Yıkama
- ❖ Asit-alkole daldırma
- ❖ Yıkama
- ❖ %80'lik alkol
- ❖ Eosin (1-2 dk)
- ❖ Alkol serilerinden geçirme (%96, %96, %100, %100)
- ❖ Ksilol x2
- ❖ Lamel ile kapama

Masson's Trikrom boyaması

Dokudaki fibröz doku durumunu değerlendirmek için özel bağ doku boyaması olan Masson's Trikrom boyası (Masson-Goldner staining kit, merck millipore Cat. No. 1.00485.0001) ile kesitler boyandı.

- ❖ Ksilen I (2 dk)
- ❖ Ksilen II (2dk)
- ❖ Alkol serilerinden geçirme (%100, %100, %96, %96 – 1'er dk.)
- ❖ Distile suda yıkama (2 kez)
- ❖ A+B solüsyon karışımı (Weigers demirli hematoksin), 5 dk
- ❖ Distile suda yıkama (2 kez)
- ❖ Asetik asit %1 lik, 30 sn
- ❖ Azophloxine, 10 dk
- ❖ Asetik asit %1 lik, 30 sn

- ❖ Tungstophosphoric acid orange G, 1 dk
- ❖ Asetik asit %1'lik, 30 sn
- ❖ Light green, 2 dk
- ❖ Asetik asit %1 lik, 30 sn
- ❖ Alkol serilerinden geçirme (%70, %96, %100, %100- 1'er dk)
- ❖ Ksilen, 2 dk
- ❖ Ksilen, 2 dk
- ❖ Entellan ile kapama

Boyanan kesitler ışık mikroskobu (Olympus CX21) altında bakılarak histopatolojik olarak incelendi. Osteoklast dağılımı ve kalan greft alanı değerlendirildikten sonra, bölgede oluşan yeni kemik iyileşme düzeyi “*Allen's fracture healing scoring system*” esas alınarak saptandı (Tablo 3.1)(222). Buna göre defektlerin 5 ayrı bölgesinden 20x büyütmede skorlama yapıldı ve bu skorların ortalamaları alındı.

Tablo 3.1: Allen kırık iyileşme skorlaması (222).

Skor	İyileşme derecesi	Açıklama
0	İyileşme yok	Fibröz doku
1	Tamamlanmamış kırıkda iyileşmesi	Fibröz doku içeren kırıkda
2	Tamamlanmış kırıkda iyileşmesi	Tamamen kırıkda
3	Tamamlanmamış kemik iyileşmesi-erken kemikleşme safhasında	Kırıkda ağırlıklı trabeküler kemik
4	Tamamlanmamış kemik iyileşmesi-orta derecede kemikleşme safhasında	Kırıkda ve trabeküler kemik eşit seviyede
5	Tamamlanmamış kemik iyileşmesi-ileri derecede kemikleşme safhasında	Trabeküler kemik ağırlıklı kırıkda
6	Tamamlanmış kemik iyileşmesi	Tamamen kemik

İmmünohistokimyasal boyamalar

Dokularda defekt alanındaki anjiyogenezis artışını belirlemek için, Anti-VEGF-A antibody (ab46154) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Kesitlerde boyanan yeni kapiller oluşumların toplam sayımı yapıldı.

Kemik yapımında ve yıkımında görev alan osteoblastlardan salınan RANKL ekspresyonunu belirlemek için Anti-RANKL antibody (ab169966) ile

immünohistokimyasal boyama yapıldı. RANKL eksprese eden osteoblastların 40x büyütmede fotoğrafları alınarak sayımı yapıldı. İmmünohistokimyasal boyamalar için rutin boyama prosedürü uygulandı;

- ❖ Etüvde 37⁰C de bekletme (1 gece)
 - ❖ Deparafinizasyon işlemi
 - ❖ Distile su ile yıkama
 - ❖ Pbs ile yıkama
 - ❖ Sitrat Buffer içinde kaynatma (15 dk)
 - ❖ Hidrojen peroksidad damlatma (10 dk)
 - ❖ Pbs ile yıkama x2
 - ❖ Serum block (15 dk)
 - ❖ Primer antikor damlatma (Anti-VEGF antibody , Anti-RANKL antibody)
 - ❖ +4⁰C de 1 gece bekletme
2. gün
- ❖ Pbs (Phosphate buffered saline) ile yıkama x2
 - ❖ Sekonder Antibody (40 dk)
 - ❖ Pbs ile yıkama
 - ❖ DAP damlatma (20 sn)
 - ❖ Zıt boyama Hematoksilen ile (15 sn)
 - ❖ Alkol serisi ve ksilolden geçirme
 - ❖ Kapama

3.5 İstatistiksel İnceleme

Sayısal değişkenlerin normallik testi Kolmogrov Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Bağımsız ikiden fazla grup karşılaştırmalarında değişkenlerin normal dağılım göstermediği durumlarda Kruskall Wallis testi kullanılmıştır. Parametrik olmayan testlerde gruplar arasındaki farklılıklar ikili olarak Mann Whitney U testi ile karşılaştırılıp, Bonferroni düzeltilmesi yapılarak değerlendirilmiştir. Sayısal değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde, değişkenlerin normal dağılım göstermediği durumlarda ise Spearman Rho Korelasyon Katsayısı kullanılmıştır.

İstatistiksel analizler R 3.4.3v (açık kaynak) programı ile yapılmış ve istatistik analizlerde anlamlılık düzeyi 0.05 (p-value) olarak dikkate alınmıştır.



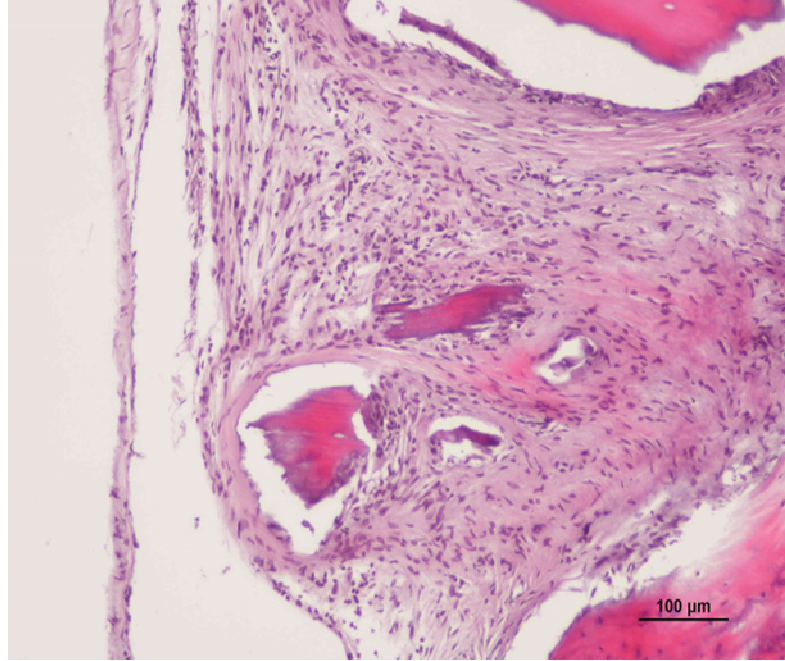
4. BULGULAR

4.1 Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

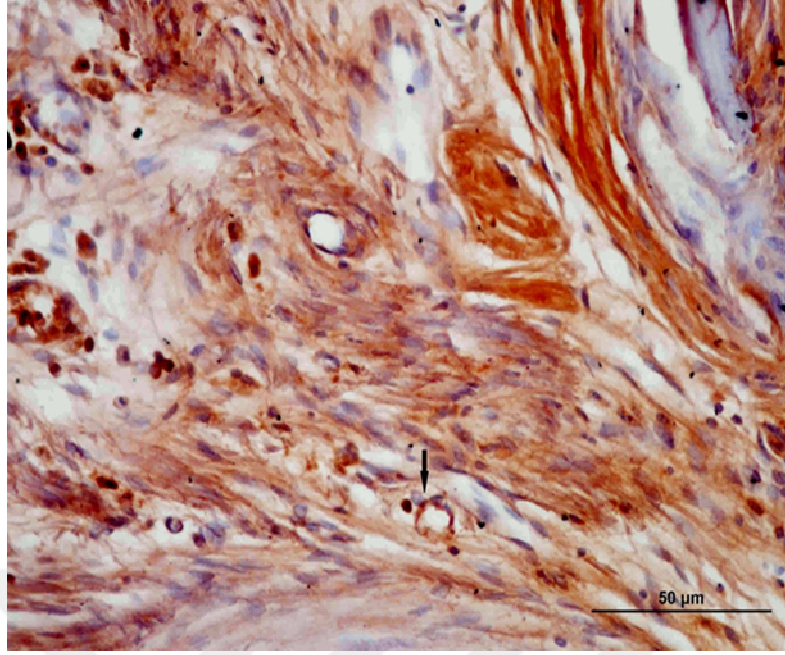
Bu çalışmaya 19 adet erkek Albino Wistar rat kullanılarak başlandı ve birinci ayda kontrol grubundan 1 adet kayıp yaşanarak 18 rat ile çalışma bitirildi. Deneysel çalışma süresince kalan ratların cerrahi işlemi iyi tolere ettikleri, sağlık durumlarının iyi olduğu, beslenmelerinin normal bir şekilde devam ettiği ve yara yerine bağlı herhangi bir enfeksiyon veya kilo kaybı gelişmediği gözlemlenmiştir.

Arı sütünün kemik iyileşmesine etkisinin incelendiği çalışmamızda 8 haftanın sonunda alınan örnekler histolojik olarak incelenmiştir. Histopatolojik değerlendirme;

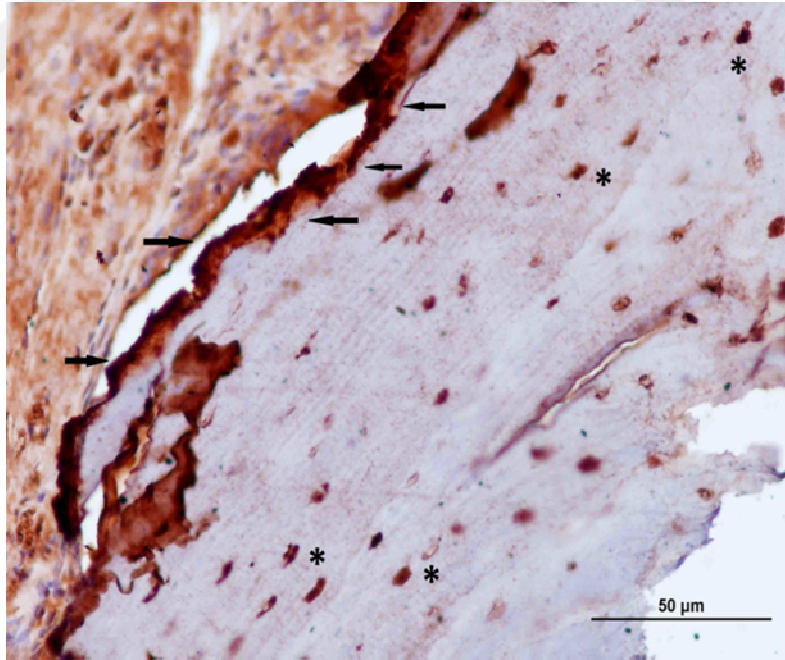
1. Yeni oluşan kemik kalitesi,
2. Anjiyogenezis,
3. Osteoblast RANKL ekspresyonu parametrelerine göre yapılmıştır.



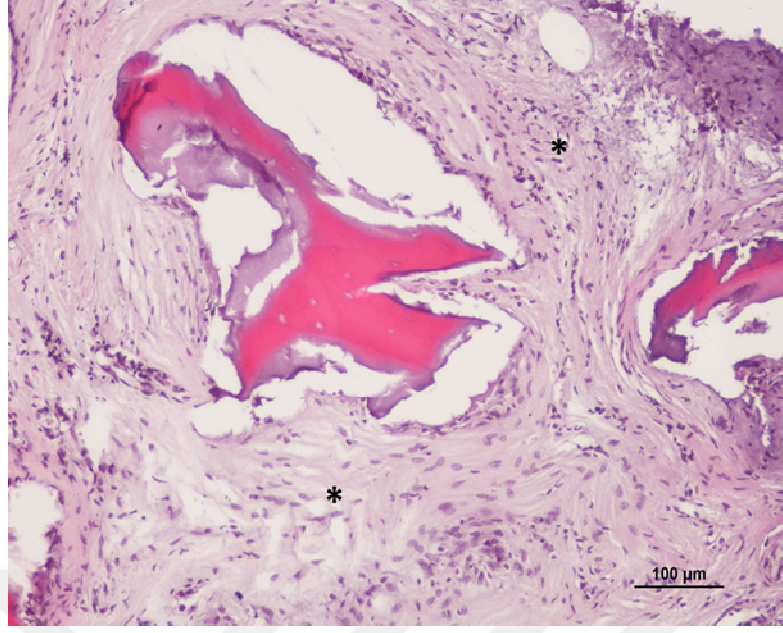
Resim 4.1: Sham grubuna ait Hematoksilen Eosin boyaması (10x). Bağ dokusu yoğunlukta olup yeni kemik oluşumu minimal düzeyde.



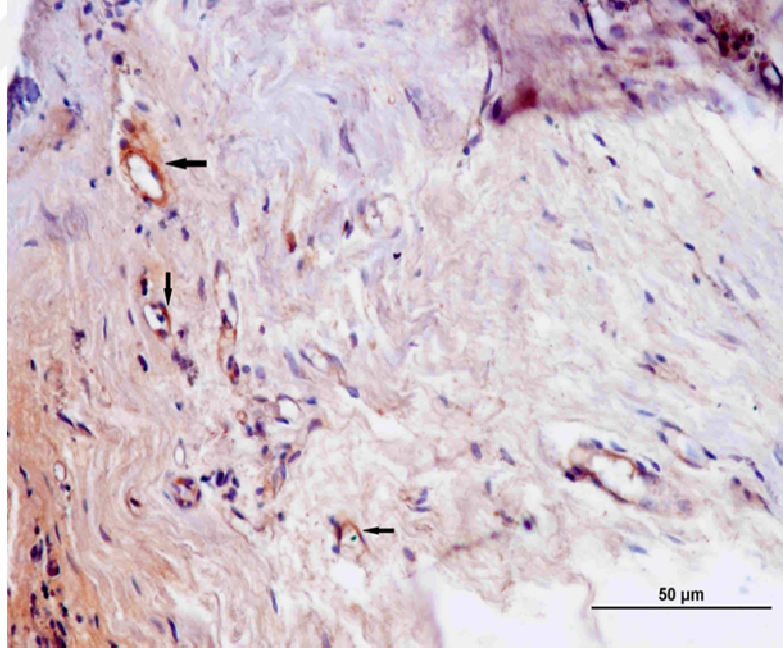
Resim 4.2: Sham grubuna ait VEGF immün işaretleme (10x). VEGF ile işaretlenmiş yeni oluşan kapiller (ok ucu). Sham grubuna ait dokularda anjiyogenez minimal düzeyde.



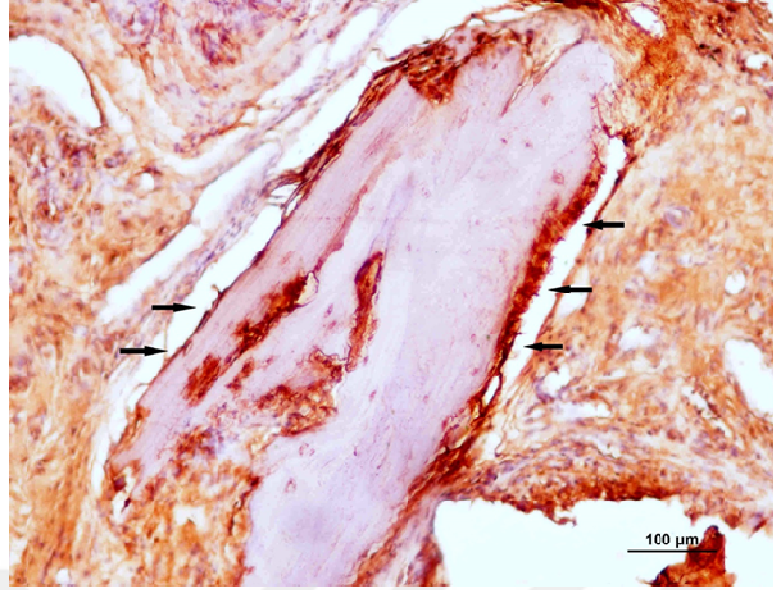
Resim 4.3: Sham grubuna ait RANKL immün işaretleme (20x). RANKL ile pozitif boyanan osteoblast hücreleri (ok ucu), osteositler(*). RANKL ile işaretlenmiş osteoblast hücrelerinde bir artış mevcut.



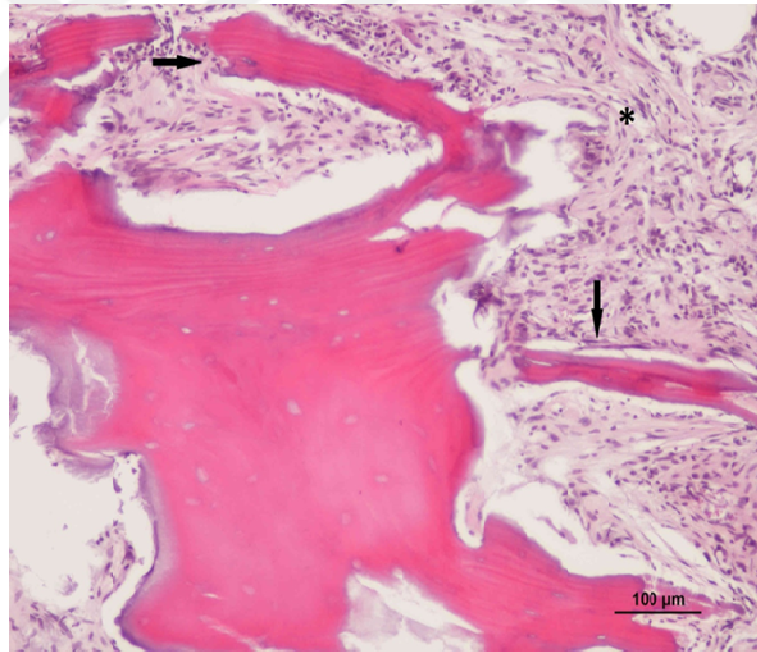
Resim 4.4: DKM grubuna ait H.E boyaması, bağ doku (*) (20x). DKM grubuna ait dokularda bağ dokusu yoğunlukta olup yeni kemik oluşumu minimal düzeyde.



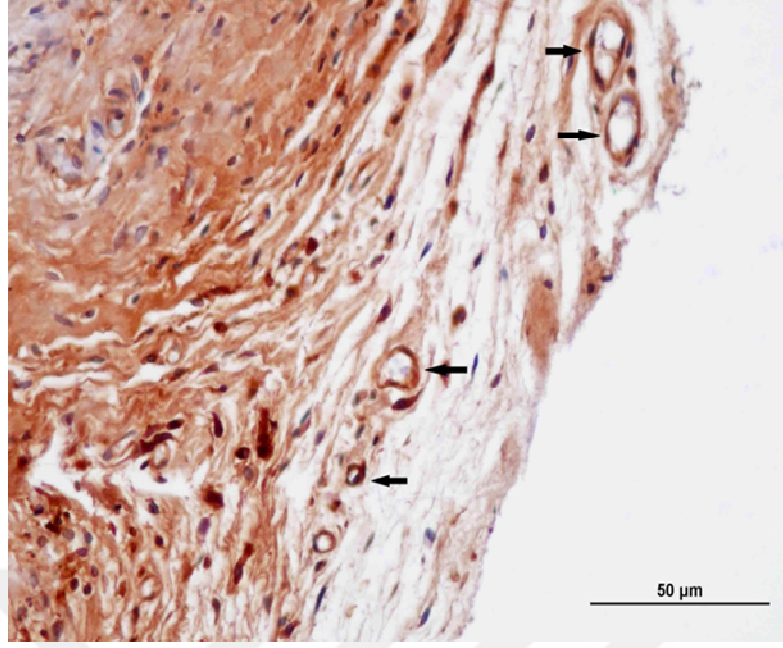
Resim 4. 5: DKM grubuna ait VEGF immün işaretleme (20x). VEGF ile pozitif boyanan kapillerler (ok ucu). Anjiyogenez ile oluşan kapillerler minimal düzeyde.



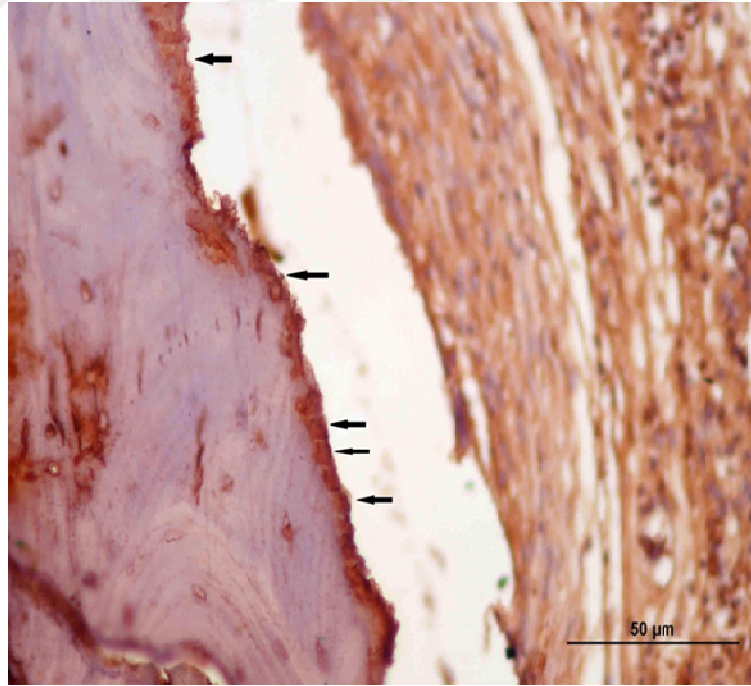
Resim 4.6: DKM grubuna ait RANKL immün işaretleme (20x). RANKL ile pozitif boyanan osteoblast hücreleri (ok ucu). RANKL eksprese eden osteoblast sayılarında artış mevcut.



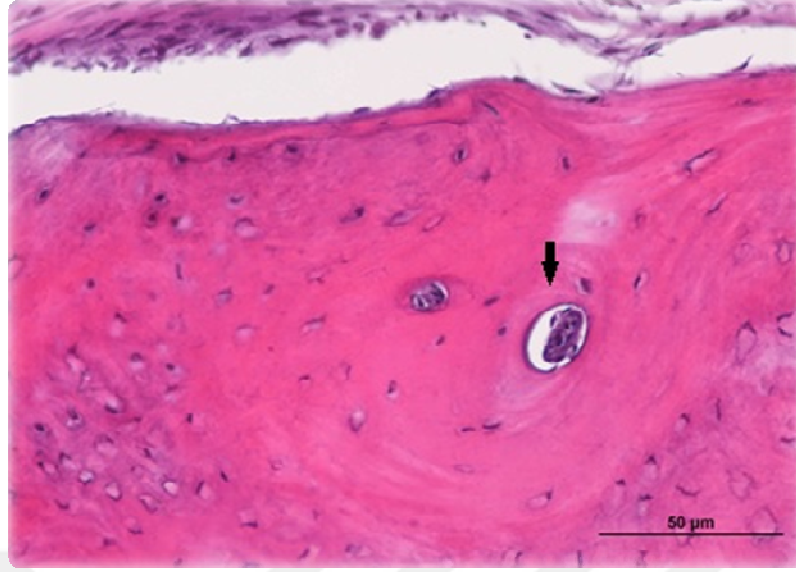
Resim 4. 7: DKM+LAS grubuna ait H.E boyaması, spiküler kemik(ok ucu), bağ dokusu (*) (10x) DKM+LAS grubuna ait dokularda trabeküler kemik oluşum alanları mevcut.



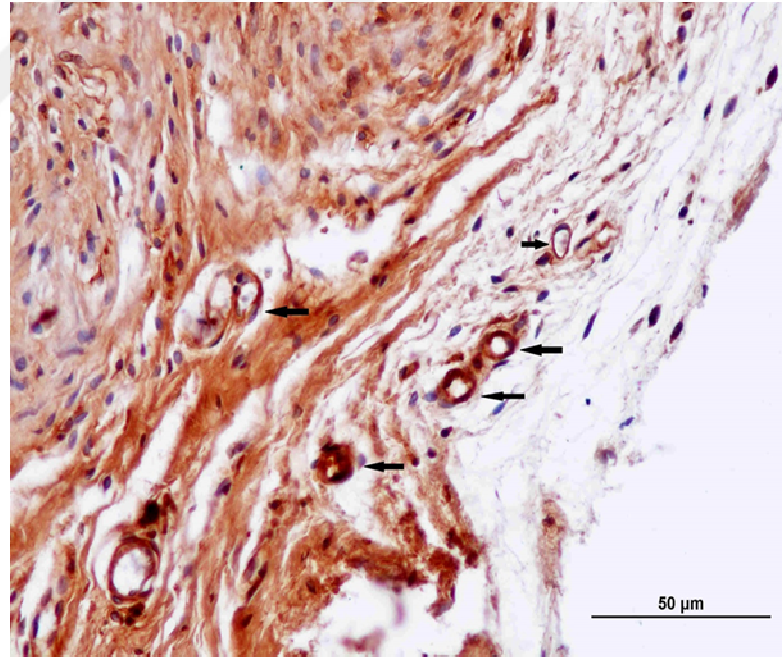
Resim 4.8: DKM+LAS grubuna ait VEGF immün işaretleme (20x). VEGF ile pozitif boyanan kapillerler(ok ucu). DKM+LAS gruplarında anjiyogenezis minimal düzeyde olup az sayıda oluşan yeni kapiller mevcut.



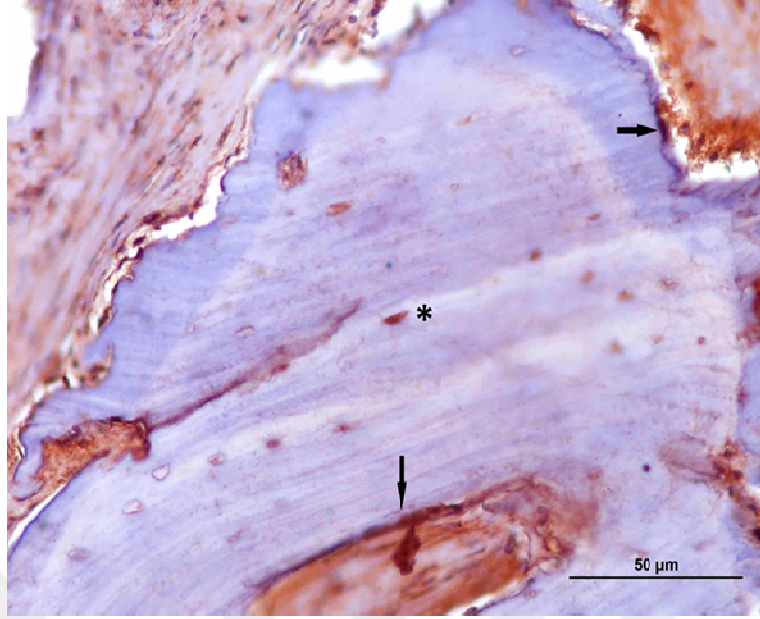
Resim 4.9: DKM+LAS grubuna ait RANKL immün işaretleme (20x). RANKL ile pozitif boyanan osteoblast hücreleri (ok ucu).



Resim 4.10: DKM+SAS grubuna ait H.E boyaması, kompakt kemik ve osteon yapısı (ok ucu) (40x). DKM+SAS grubuna ait dokularda bağ doku oranı azalmış olup, kompakt kemik yapıları mevcut.



Resim 4.11: DKM+SAS grubuna ait VEGF immün işaretleme (20x). VEGF ile boyanan kapillerler (ok ucu). DKM+SAS grubu dokularında anjiyogenez artışı gözlenmiş olup çok sayıda oluşan yeni kapiller mevcut.



Resim 4.12: DKM+SAS grubuna ait RANKL immün işaretleme (20x). RANKL ile pozitif boyanan osteoblast hücreleri(ok ucu), osteosit(*). DKM+SAS grubu dokularında RANKL ekspresyonunda azalma olup işaretlenen osteoblast sayısı minimal düzeyde.

4.2. İstatistiksel Bulgular

Işık mikroskobu ile yapılan histolojik inceleme sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Belirlenen parametreler üzerinden gruplar arası farklılık olup olmadığı araştırılmış ve her üç değişken arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (her biri için $p < 0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Histopatolojik kriterlerin istatistiksel analizi

	Grup								P*
	Sham		DKM		DKM+LAS		DKM+SAS		
	Ort.±SS	M(Q1-Q3)	Ort.±SS	M(Q1-Q3)	Ort.±SS	M(Q1-Q3)	Ort.±SS	M(Q1-Q3)	
RANKL	62,6±8,59	62(61-62)	60±6,86	57(57-65)	52,17±4,71	51,5(50-52)	37,43±4,86	36(36-43)	p<0,05
VEGF	1,2±1,3	1(0-2)	1,6±1,14	2(1-2)	11,67±3,2	11,5(9-13)	20,86±2,79	21(18-23)	p<0,05
ALLEN kemik skorlaması	0,76±0,22	0,8(0,8-0,8)	0,88±0,11	0,8(0,8-1)	1,23±0,23	1,2(1-1,4)	2,03±0,41	1,8(1,8-2,2)	p<0,05

* Kruskal Wallis testine göre anlamlılık. Ort: Ortalama, SS:Standart sapma, M: Medyan

Tablo 2’de her gruptaki olguların RANKL, VEGF ve ALLEN kemik skorlamaları arasında ilişki olup olmadığı araştırılmış ve değişkenler arasında

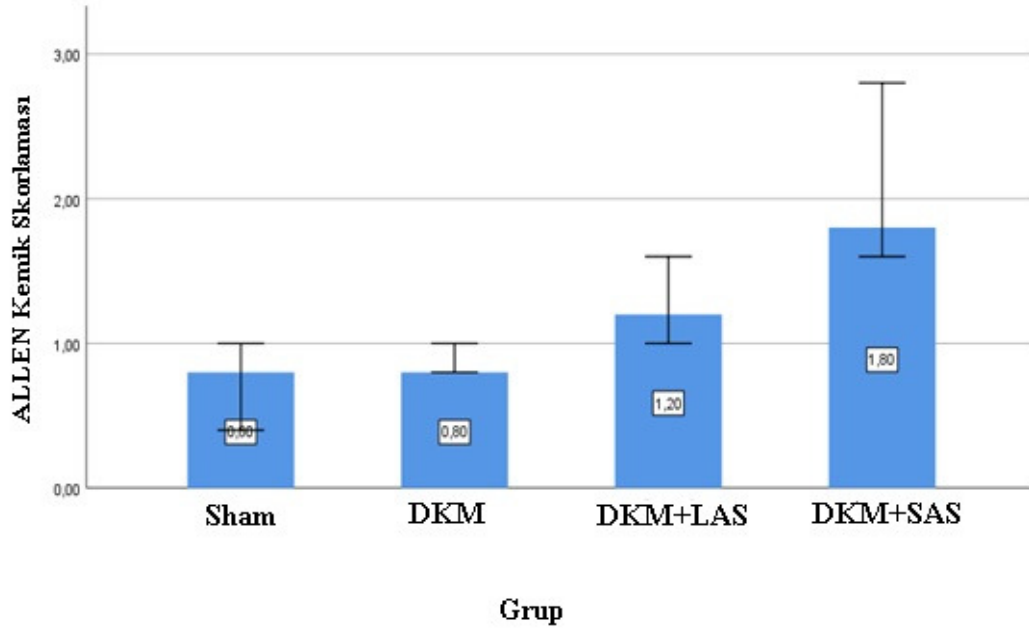
anlamli düzeyde dogrusal bir korelasyon olmadigi gorulmustur. (her biri icin $p>0,05$).

Tablo 4.2: ALLEN kemik skorlamasi, VEGF ve RANKL arasindaki korelasyon durumu

Grup		N	r*	p
Sham	RANKL & VEGF	5	0,632	0,253
	RANKL & ALLEN Kemik Skorlamasi	5	0,574	0,312
	VEGF & ALLEN Kemik Skorlamasi	5	0,803	0,102
DKM	RANKL & VEGF	5	-0,658	0,227
	RANKL & ALLEN Kemik Skorlamasi	5	0,444	0,454
	VEGF & ALLEN Kemik Skorlamasi	5	-0,148	0,812
DKM+LAS	RANKL & VEGF	6	-0,203	0,700
	RANKL & ALLEN Kemik Skorlamasi	6	-0,194	0,713
	VEGF & ALLEN Kemik Skorlamasi	6	-0,029	0,956
DKM+SAS	RANKL & VEGF	7	-0,580	0,172
	RANKL & ALLEN Kemik Skorlamasi	7	-0,402	0,371
	VEGF & ALLEN Kemik Skorlamasi	7	-0,150	0,749

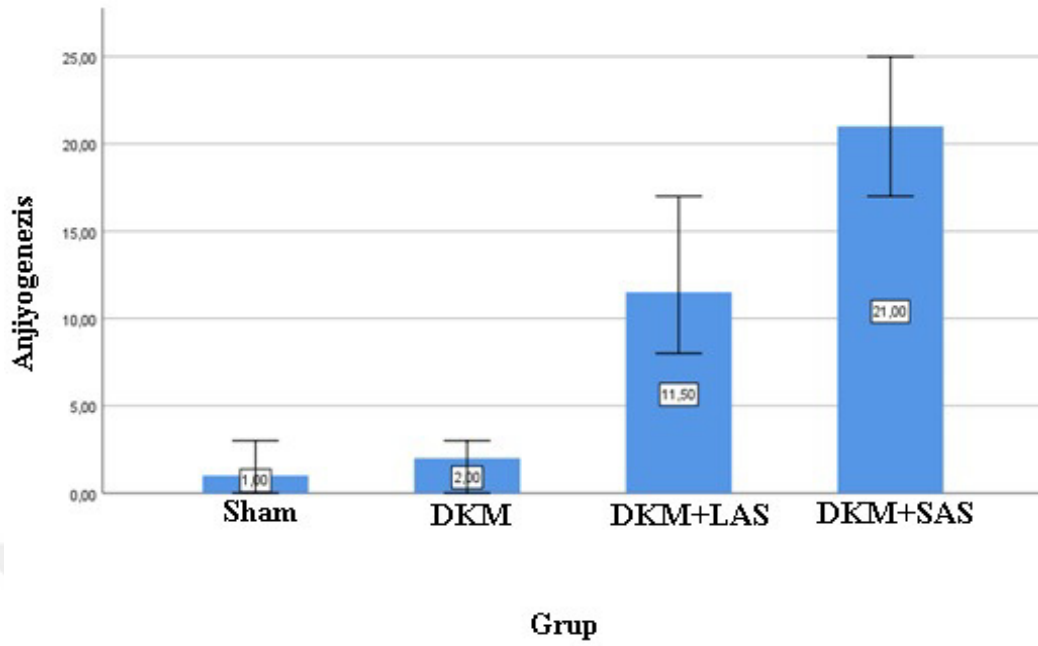
*Spearman korelasyon katsayisi

Yeni olusan kemik kalitesi acisindan, DKM+SAS grubundaki olgularin Allen kemik skorlamasi Sham ve DKM gruplarina gore anlamlı derecede daha yuksek bulunmustur ($p<0,05$). Sham grubu-DKM grubu, Sham grubu-DKM+LAS grubu, DKM grubu-DKM+LAS grubu ve DKM+LAS grubu-DKM+SAS grubu ikililerinin arasında anlamlı düzeyde fark bulunamamıştır. Arı sütü lokal ve sistemik uygulamaları kemik kalitesini kontrol gruplarına göre arttırmasına rağmen, bu artış sadece sistemik uygulamada istatistiksel olarak anlamlı bulunmustur ($p<0,05$) (Grafik 4.1).



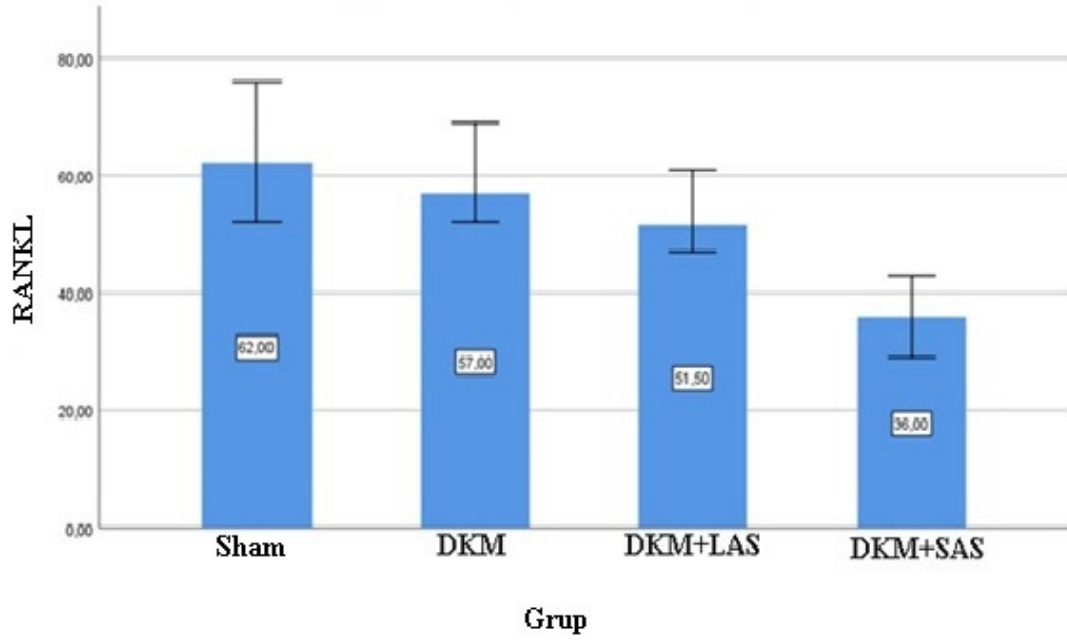
Grafik 4.1: ALLEN kemik iyileşme skorlamasının gruplara göre değişimi

Defekt bölgesinde meydana gelen anjiyogenezis için Anti-VEGF ile boyanan kapillerlerin değerlendirilmesine göre; DKM+SAS grubundaki olgular Sham ve DKM grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Sham grubu-DKM grubu, Sham grubu-DKM+LAS grubu, DKM-DKM+LAS grubu ve DKM+LAS-DKM+SAS grubu arasında anlamlı düzeyde fark bulunamamıştır. Arı sütü lokal ve sistemik uygulamaları kontrol gruplarına göre damarlanmayı arttırmasına rağmen sadece sistemik uygulamadaki artış anlam ifade etmektedir ($p<0,05$) (Grafik 4.2).



Grafik 4.2: VEGF ile boyanan kapillerlerin gruplara göre değişimi

Kemik yıkımında etkili olan RANKL'ı eksprese eden osteoblastların sayımına göre; Sham ve DKM grubundaki olgular DKM+SAS grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Sham grubu-DKM grubu, Sham grubu-DKM+LAS grubu, DKM grubu-DKM+LAS grubu ve DKM+LAS grubu-DKM+SAS grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Arı sütü lokal ve sistemik uygulamaları RANKL ekspresyonunu kontrol gruplarına göre azaltmasına rağmen sadece sistemik uygulamada anlamlı fark görülmüştür ($p<0,05$) (Grafik 4.3).



Grafik 4.3: RANKL ile boyanan osteoblastların gruplara göre değişimi

5. TARTIŞMA

Biyoteknolojideki büyük gelişmelere rağmen, kraniyo-maksillofasiyal iskelet düzensizlikleri ve deformiteleri oral ve maksillofasiyal cerrahlar için rekonstrüktif zorluklar oluşturmaya devam etmektedir. Konjenital ve edinsel anomaliler, travma, enfeksiyon ve hastalıklar sıklıkla kraniyo-maksillofasiyal kompleksin kemik defektleri ile sonuçlanır. Bu defektlerin şekil ve fonksiyonlarının rekonstrüksiyonu uzun zamandan beri cerrahlar için ilgi alanı olmuştur. Rekonstrüksiyonun zorluklarıyla karşı karşıya kaldığımızda temel cerrahi amaçlar; kemik devamlılığını sağlamak, yeterli kemik hacmi oluşturmak, greft rezorpsiyonunu önlemek, yumuşak doku defektlerini düzeltmek, yüz konturunu, estetiği ve fonksiyonu yeniden kurmak olmalıdır. Bu hedefler doğrultusunda rekonstrüksiyon merkezlerinde kemik otogreftleri, allogreftler ve vaskülarize kemik greftleme teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır (223). Kemik büyümesinin ve rejenerasyonun fizyolojik faktörleri kemik transplantasyonunu birçok deneysel ve klinik çalışmanın konusu haline getirmiştir.

Hollandalı cerrah Van Meekeren, 1968 yılında bir askerin kafatasında olan travmatik defekti başarıyla onararak ilk kemik greft prosedürünü gerçekleştirmiştir. İlk klinik otogreft, 1821'de Von Walter tarafından trepanotomiden sonra kafatasının onarılması için kullanılmıştır. İlk allogreft, 1880'de Mac Ewan'ın raşitizm hastası bir çocuğun enfekte humerusunu vaskülarize olmayan bir tibia grefti ile başarılı bir şekilde rekonstrükte ederek gerçekleştirilmiştir. Mueller ve Koenig (1890), kompozit kalvaryum kemik grefti kullanarak kraniyo-maksillofasiyal defektleri rekonstrükte eden ilk kişilerdir. Yüzyılın başından bu yana sayısız yayın, modern kemik greftleme prosedürlerinin klinik ve biyolojik temellerini tasvir etmektedir (224).

Otojen kemik diğer tüm rekonstrüktif tekniklere göre altın standart olarak kabul edilmektedir. Günümüzde otojen kansellöz kemik greftleri en öngörülebilir ve başarılı klinik sonuçları vermektedir (225). Kemik greftlerinin çeşitli fizyolojik

özellikleri başarıyı doğrudan etkiler. Bu özellikler; osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon kavramlarını içerir (224).

Osteogenezis, greftin yeni kemik üretebilme yeteneğidir ve greft içindeki canlı hücrelerin varlığına bağlıdır. Osteojenik greft materyalleri, kemik hücreleri (osteokompetan hücreler) veya o hücrelere diferansiye olma potansiyeline sahip hücreler (osteoprogenitör hücreler) içerir. Osteogenesis, taze otolog kemik ve kemik iliği hücreleriyle ilişkili benzersiz bir özelliktir. İlginçtir ki çalışmalar, bu transplante edilen hücrelerin aslında sadece birkaçının greft alanında canlı kaldığını gösterir (226).

Osteokondüksiyon, greftin kemik iyileşmesi için bir çatı görevi gördüğü fiziksel özelliğidir. Bu yapı neovaskülarizasyon ve osteoprogenitör hücrelerin çevreden sızmasıyla kemik oluşumuna izin verir. Osteokondüktif özellikler otojen kansellöz kemik, allogreft, demineralize kemik matrisi, hidroksiapatit, kollajen ve kalsiyum fosfat yapılarında bulunur (224).

Osteoindüksiyon, greft materyalinin biyokimyasal transformasyon ve kök hücrelerinin kemik üreten hücrelere uyarılması yoluyla kemik oluşumunu indüklemekle yeteneğidir. KMP ve DKM temel osteoindüktif maddelerdir (227). Ototreftlere benzer şekilde allogreftler de osteoindüktif özellik gösterir.

Ototreft ve allogreft kraniyo-maksillofasiyal cerrahide sıklıkla kullanılan non-vaskülarize kemik greft tipleridir. Ototreft, bir bireyin vücudunun bir bölümünden diğerine nakledilir. Ototreftlerin avantajları arasında osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikler, biyomekanik stabilite, hastalık transferi olmaması ve minimal antijenite bulunur (224). Otojen kemik greftinin etkililiğine rağmen, grefti yeterli miktarda sağlamak için yalnızca birkaç donör bölgesi uygundur. Dezavantajları arasında; aynı zamanda ayrı bir cerrahi alan ihtiyacı, çalışma süresinin ve kan kaybının artması, verici alan komplikasyonları ile ilişkili riskler ve yetersiz miktarda kemik grefti eldesi gibi durumlar bulunmaktadır (228).

Allogreft, otojen kemik greftlerine alternatif bir biyomateriyal tipidir. Bunlardan en çok bilinen ve kullanılanları; taze dondurulmuş, dondurulmuş kurutulmuş, demineralize kemik greftleridir. Bir allogreft, aynı türün genetik olarak farklı üyelerinden nakledilen dokudur. Allogreftler immünolojik red, hastalık bulaşma riski, enfeksiyon riski ve otogreftlere göre daha düşük biyolojik potansiyele sahip olma gibi zayıf özelliklere sahiptir (229). Allogreftlerin enfeksiyon hastalıklarının taşınma riskini önlemek için uygulanan sterilizasyon yöntemleri materyalin biyolojik özelliklerinden fedakârlık gerektirir.

Otojen ve allojen greftlerin dezavantajları nedeniyle son yıllarda ksenogreftler üzerinde çalışılmıştır. Ksenogreftler hayvanlardan elde edilip bütün organik komponentleri uzaklaştırılır. İnsan kansellöz kemiğine yapısal olarak çok benzeyen ve en sık kullanılan sığır kaynaklı şeklidir (128). Sığır kaynaklı ksenogreftler osteokondüksiyon yoluyla işlev görür. Ksenogreftlerin yavaş rezorbsiyon oranına sahip olduğu ve bu yüzden kemik oluşumunun yavaş olduğu gösterilmiştir (83).

Sentetik olan, otojen greft risklerini taşımayan ve kullanım kolaylığı olan alloplastik greftler klinik kullanımda iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkar. Bu greft tipi kemiğin inorganik yapısına benzeyen sentetik yapı içerir. Kolay elde edilebilirlik gibi avantajlarının yanında yabancı cisim reaksiyonu göstermek gibi dezavantajları vardır. Son yıllarda oral ve maksillofasiyal cerrahide bu konuda sıkça çalışmalar yapılmaktadır.

Biyomateriyallerin bu dezavantajları nedeniyle osseoz yapıya katılmalarında yüksek başarıyı sağlamak için birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Literatürde defekt iyileşmesini hızlandırmak ve greft etkinliğini arttırmak için bifosfonatlar, statinler, lazer, antibiyotikler, ozon, biyoaktif büyüme materyalleri (KMP, transforming growth faktör alfa vb.), TZP (trombositten zengin plazma), TZF (trombositten zengin fibrin) gibi ek morbiditeye neden olmayan ve istenildiği kadar elde edilebilen biyomalzemeler ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmalarda kullanılan bu

materyallerin seçimindeki temel unsur kemik iyileşmesinde gerçekleşen hücresel olayları etkileyebilme özelliğidir.

Kırık oluştuktan sonra, bölge stabilitesini kaybederek arteriyal vazokonstriksiyonla birlikte hipoksi gelişir. Takiben geçici bir iskemik periyod, arteriyal vazodilatasyon ve kırık bölgesinde reperfüzyonda bir artış olur. Hemen sonra inflamatuvar, onarım ve remodelasyon fazlarını içeren iyileşme başlar. Başlangıç fazında inflamatuvar hücreler (lökosit, makrofaj ve mast hücreleri) kırık bölgesine ulaşır. Polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu ile bölgede serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Serbest radikaller DNA, karbonhidrat, protein, enzim ve lipid gibi önemli bileşenlere olumsuz etki ederek hücre hasarı ve hücre ölümünü neden olur. Kanseri, yaşlanma, sigaraya bağlı hastalıklara neden oldukları ve yara iyileşmesi, granülasyon dokusu, kollajen, kırık ve kırık iyileşmesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (230,231). Çoğu araştırmada özellikle antioksidanlar gibi yeni materyaller kullanılmış ve antioksidanların osteoblastik aktiviteyi ve kemik metabolizmasını arttırdığı gösterilmiştir (232).

Apis mellifera cinsi işçi arıların mandibular ve hypopharyngeal bezlerinden sarımsı renkte salınan arı sütü, kraliçe arıların uzun süre yaşaması için gerekli olan bir besindir. Yapılan çalışmalarda arı sütünün serbest oksijen radikallerini temizleme özelliği olan doğal bir antioksidan olduğu belirtilmektedir (232,233). Arı sütü serbest amino asitler, proteinler, şekerler, yağ asitleri (esas olarak 10-hidroksi-2-desenoik asit; 10-HDA), mineraller (çoğunlukla demir ve kalsiyum) ve vitaminler (esas olarak tiamin, niasin, riboflavin) gibi biyolojik aktiviteye sahip birçok önemli bileşiği içerir. Arı sütünün yaşlanmayı geciktirici, yorgunluk giderici, antialerjik, antitümör, antihipersolesterolemik, antihipertansif ve anti-inflamatuvar etkiler gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Literatür incelendiğinde arı sütünün kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini inceleyen yeterli çalışma bulunmamaktadır. Arı sütünün antioksidan ve yumuşak doku yara iyileşmesini hızlandırıcı etkileri bilimsel çalışmalarla desteklenmesi nedeniyle kemik iyileşmesi üzerine de olumlu etkilerinin olabileceği düşünülerek böyle bir çalışmanın yapılması planlanmıştır.

Kemik doku mühendisliği ve osteoindüktif biyomateryal geliştirilmesinde çeşitli hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bu alandaki tecrübeler göre ideal hayvan modeli; büyük ölçüde tekrarlanabilir olmalı, birkaç türdeki materyal veya stratejilerin değerlendirilmesi için kullanılabilmesi, ilgili klinik durum ile bağlantılı olmalı, çoklu analiz tiplerine izin vermeli ve planlanan deney sonunda hayvanda düşük derecede morbidite ve mortaliteye neden olmalıdır. Hayvan modellerini değerlendirirken göz önünde bulundurulması gereken diğer pratik faktörler; uygun istatistiksel güçle veri üretmek için gerekli zaman, maliyet ve deneysel adımları gerçekleştirmek için gerekli yetkinliktir. Teorik olarak ortotopik hayvan modelleri, biyomateryal veya non-union uygulama stratejilerinin değerlendirilmesinde klinik olarak en uygun yöntemdir. Kemik defektlerinin hayvan modelleri için fare, sıçan, tavşan, köpek, domuz, koyun ve keçi gibi birçok tür kullanılmıştır; ancak araştırmaların büyük bir kısmı tekrarlanabilirlik, verimlilik ve ekonomik faktörler nedeniyle kemirgen modelleri üzerinde yoğunlaşmıştır. İnsanlara ait hastalıkların araştırılmasında sıçanlar, fare ve diğer model organizmalara göre daha fazla avantaja sahip olup, medikal araştırmalarda kullanılan en yaygın organizmadır. Sıçan modellerinde fizyolojik olaylar kolay izlenir, fazla miktarda veri toplanabilir ve insan organizmasına daha yakın çalışma sağlanır. Yaptığımız çalışmada temin edilebilme kolaylığı, ucuz olmaları, büyük hayvanlara göre daha kolay manipüle edilmeleri, daha fazla örnek alınabilme imkânı sunmaları, fizyolojileri hakkında yeterli kaynak bulunması, enfeksiyona olan dirençleri gibi avantajları nedeniyle rat tercih edilmiştir. (234). Memeli dişi hayvanların hormonal farklılıkları nedeniyle değişken metabolizmaları vardır. Bu faktörler düşünülerek çalışmamızda erkek rat tercih edilmiştir. Yaş farklılıklarına bağlı oluşabilecek osteojenik potansiyel değişiklikleri (235) ve yetişkin olmayan ratlarda kemik iyileşmesinden ziyade kemik büyümesinin değerlendirilebilmesi (236) nedeniyle çalışmada 8 haftalık yetişkin denekler kullanılmıştır.

Anatomik olarak femur, omurga, mandibula ve kalvaryum gibi kemirgen iskeletinin birçok alanı ortotopik defekt bölgesi olarak kullanılabilir (237,238). Son 25 yılda kalvaryal defekt, kemik replasman materyallerini ve kemik rejeneratif terapileri (hücre, protein veya gen bazlı yaklaşımlar) test etmek için iyi bir in-vivo

model olarak kullanılmıştır. Rat kalvaryal kritik boyut defekti (KKBD), kemik iyileşmesinin değerlendirilmesi için en sık kullanılan deneysel modellerden biridir. Kafatasının biyolojik olarak inert olması, defekt boyutunun standardize edilebilmesi, cerrahi olarak kolay ulaşım, dura mater ve üzerini kaplayan derinin varlığı ile implante edilen biyomateryale destek olma, histopatolojik preparatların hazırlanabilirliğinin kolay olması ve kraniofasiyal bir kemik olması gibi avantajlara sahiptir (221). Kalvarya gibi ortotopik kemik alanlarının iyileşmesinde kas, deri altı gibi ektopik bölgeler kemik yapımının indüklenmesinde daha uygun fizyolojik koşul sunar. Ayrıca, alttaki dura materin defekt iyileşmesinde ve osteojenik hücrelerin sentezinde önemli rol oynadığı da bilinmektedir. Belirtilen avantajlarının yanında; defekt iyileşmesinin temelde intramembranöz kemikleşme ile alakalı olması ve maksillofasiyal cerrahideki alanımız olan mandibulanın embriyolojik olarak intramembranöz yolla gelişmesi, çalışmamızdaki kritik boyutlu defektler için intramembranöz gelişme gösteren parietal kemiğin seçilmesinde etkili olmuştur.

Rat kalvaryumunda yapılan deneysel çalışmalarda objektif sonuçlar almak için, oluşturulan defekt boyutu spontan kemikleşecek büyüklükte olmamalıdır. Kemik defektlerinin iyileşmesi defektin boyutu ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmek için kritik boyut defekt kavramı ortaya çıkmıştır. ‘Kritik Boyut Defekt (KBD)’ terimi ilk kez Schmitz & Hollinger (1986) tarafından ‘Canlının yaşamı boyunca spontan düzelemeyecek en küçük boyutlu kemik içi yara’ olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, çoğu prelinik araştırmanın değerlendirme süre sınırı olduğu için, Gosain ve ark. (2000) tanımın ‘Araştırmanın süresi boyunca iyileşemeyen defekt’ olması gerektiğini savunmaktadırlar. Kritik boyut defektini etkileyen faktörler; deneğin türü, deneğin yaşı, defektin anatomik lokalizasyonu, defektin boyutu ve intakt periostdur (239). Ratlarda kalvaryal KBD en sık kullanılan çalışma modelleri arasında olmasına rağmen, kritik olarak kabul edilen defekt çapıyla ilgili tartışmalar halen devam etmektedir. Literatürde kritik olarak kabul edilen farklı defekt boyutları bildirilmiştir; en sık olarak 5.0 ve 8.0 mm çaplı defektler kullanılmıştır.

Tagaki ve Urist 6 aylık Sprague Dawley ratlarda 8 mm çapında kalvaryal defektler oluşturmuşlar ve 4. haftada defektlerin 5 mm'ye indiğini ve 12. hafta sonunda daha fazla iyileşmenin görülmediğini belirtmişlerdir (240). Mulliken ve Glowacki 28 günlük Charles River ratlarında parietal kemikte 4 mm çapında defektler oluşturmuşlar ve bu defektlerin 6. ay sonunda tamamen iyileşemediğini, buna karşılık demineralize kemik tozu konulan defektlerin 2. haftada kemik iyileşmesi bulguları gösterdiğini belirtmişler ve ratlarda 4 mm çapındaki defekt miktarını KBD olarak tanımlamışlardır (241). Scott ve ark. (2012), rat kalvaryumunda yaptıkları KBKD'lerde asellüler progenitör hücreli periosteumun iyileşmeye etkisini araştırdıkları çalışmalarında, KBD'yi 5 m olarak rapor etmişlerdir (242). Son yıllarda yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda ratların maksillofasiyal bölgesinde yapılmak istenen KBD'lerde 5 mm çapın yeterli olduğu kabul görülmektedir (Ün, 2013; Taşdemir, 2011; Baldık ve ark. 2000)(ratlarda deneysel...). 5 mm'lik KBD'nin hem deney hem de kontrol defektlerinin aynı denekte açılmasına imkan sağlayarak farklı hayvanlar arasındaki değişkenlikten kaynaklanan risklerin ortadan kalkması, çalışma için gerekli hayvan sayısının azaltılması, intraoperatif hemorajiye ve nörolojik komplikasyonlara neden olan sagittal sinüsün yaralanma olasılığının olmaması gibi avantajları vardır. Literatürde kullanılan boyutların incelenmesi sonrası ve denek sayısını azaltmak için sham ve kontrol grubu defektlerini aynı rat üzerinde bilateral oluşturmak istememiz nedeniyle kritik defekt boyutu 5mm olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda oluşturulan defektlerin rekonstrüksiyonunda allojen greft ailesine ait DKM kullanılmıştır. Kemik defektlerinin doldurulmasında kullanılan greft materyallerinde aranan başlıca özellikler; tek bir cerrahi işlemle elde edilebilme, antijenik özelliğinin olmaması, revaskülarizasyon, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenezisi kolaylaştırabilme, defekte stabilite ve destek sağlama, kolayca şekil verilebilme, termal olarak nonkondüktif olma, radyolüsent bir görünüm verme ve uzun süre saklanabilmedir (243). Günümüzde osteoindüksiyon sadece BMP içeren DKM ve otojen kemik greftlerinde görülmektedir. Seyretilik (0.5N) hidroklorik asit ile kalsiyum hidroksiapatitin kemikten uzaklaştırılması sonucunda elde edilen DKM, kollajen-nonkollajenik proteinler (osteokalsin,

osteonectin, osteopontin vb.) ve birçok büyüme faktörünü içerir. Bu büyüme faktörlerinin mitojenik, anjiojenik ve hücre differansiyasyonu gibi fonksiyonları kemik fraktürlerinin iyileşmesi ve yeni kemik oluşumu için temel gereksinimlerdir (116). Halen en iyi greft materyali otojen kemik olmakla birlikte, bu greft materyallerinin birçok dezavantajından dolayı daha ideal greft materyali arayışları devam etmektedir. DKM oral ve maksillofasiyal cerrahide otojen greftlere alternatif olarak yaygın kullanılan bir greft türüdür. DKM kemik oluşumunu başlatan bir bileşik olup, mezenkimal hücreleri kondroblast, osteoblast ve hematositoblastlara dönüştürerek enkontral kemik oluşturmaktadır (116). Hem osteokondüktif hem de osteoindüktif özellikler içeren DKM günümüz pratiğinde birçok çalışmada kemik rejenerasyonu kolaylaştırmak amacıyla ve yeni kemik defektlerinin tamirinde kullanılmaktadır. Ayrıca kist ve tümör defektleri, kırık tamiri ve mal-unionda rutin kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmektedir (244,245).

Kemik iyileşmesi serbest oksijen radikallerini uyaran inflamasyon ve iskemi ile ilişkilidir (246). Kemik kırıklarında ilk olarak kırık bölgesinde arteriyel vazokonstriksiyon oluşmaktadır. Daha sonra geçici bir iskemi, arteriyel vazodilatasyon ve bölgede reperfüzyon artışı meydana gelmektedir (230). Norazlina ve ark. (247), serbest radikallerin osteoblastlar üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini bildirmektedirler. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve etki mekanizmaları ele alındığında kırık iyileşmesi üzerine de olumsuz etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (248). Bir serbest radikal bağımsız varolma yeteneğine sahip bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküler tür olarak tanımlanır (249,250). Serbest oksijen radikalleri dokularda subselüler anormalliklere neden olur. İskemi sonrası reperfüzyon aşamasında iskemik dokularda üretilebilir ve hasarın en azından bir kısmını oluşturabilir. Oksijen türevi serbest radikallerin lipid peroksidasyonu yoluyla hücre zarı hasarına yol açıp hücre ölümü ile sonlanan bir zincir reaksiyonunu başlattığı düşünülmektedir (251,252). Serbest radikal oluşumu ile ilişkili hücre hasarı, ya temizleyici sistemlerin bozulduğu durumlarda, ya da koruyucu antioksidan sistemleri tüketen iskemik hallerde görülür (253). Lipid peroksidasyonu sitolojik hasar için en iyi göstergelerden biridir ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ile gösterilebilir. Daha yüksek değerler serbest radikal

konsantrasyonunun fazla olduğunu gösterir (252). Lipid peroksidasyonunun osteoklast stimölasyonu yoluyla kemik rezorpsiyonunu artırdığı da bilinmektedir (248).

Oksidatif stres, reaktif doku yaralanmasına neden olan oksijen türlerinin arttığı oksidatif olaylar zincirini tanımlar. Reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve yaşlanmanın patogenezindeki rolleri nedeniyle oldukça ilgi görmektedir (254). Bir serbest oksijen radikali osteoblast, osteoklast ve osteositlerin oluşumunu ve hayatta kalmasını önemli derecede etkiler. Osteoklastlar tarafından üretilip kemik bozulmasına doğrudan katkısı olan süperoksidin neden olduğu kemik rezorpsiyonunda rol oynar. Ayrıca, osteoklast formasyonu ve aktivitesini doğrudan teşvik edebilir. Çoğu çalışmada, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu doku hasarını iskemi-reperfüzyon mekanizmasına bağlanmıştır (255,256). Bu nedenle, bazı çalışmalarda kırık iyileşmesi ile reaktif oksidan türleri arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (246,257). Turgut ve ark. (258), kırık iyileşmesinin 7. ve 14. günlerinde MDA düzeylerinde belirgin bir artış olduğunu vurgulamışlar ve oksidatif stres yaralanmasının inflamasyon ve kallus oluşumu sırasında önemli olabileceği sonucuna varmışlardır. Sıçanlarda mandibular kemik kırığı sonrasında kırık iyileşmesinin hücresel fibröz (1 hafta) ve kondroid kalus (2 hafta) aşamalarında yüksek MDA değerleri kaydedilmiştir ve kırıktan 4 hafta sonra birincil kemik kallus evresinde bu MDA değerlerinin azaldığı görülmüştür (246). Benzer şekilde, Yeler ve ark. sıçanlarda kırık iyileşmesi sürecinde yüksek miktarda serbest oksijen radikali oluştuğunu ve bu radikallerin kırıktan sonraki ilk ayda etkili olmaya devam ettiğini bildirmişlerdir (259).

Doğal kırık iyileşmesi (1) inflamatuvar evre , (2) kallus oluşumu evresi ve (3) remodeling olmak üzere üç farklı evreye sahiptir (260). İnflamatuvar evre, kırık hematomunun oluşumu ile karakterize olup, onarım işlemi için gerekli olan hücrelerin modölasyonunu ve indüksiyonunu sağlar. İnflamasyon 48 saat içinde başlar ve kırıkta ve kemik oluşana kadar sürer. Kırık bölgesine ulaşan ilk hücreler polimorfonükleer lökositler, makrofajlar ve mast hücreleridir (260,261). Kallus

oluşumu aşamasında kırık hematoma hızla inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, kollajen ve kılcal damarlardan oluşan granülasyon dokusu ile yer değiştirir (261). Turgut ve ark. (258) kırık iyileşmesinin ilk üç gününü iskemi-reperfüzyon mekanizmasının iskemik periyoduyla, ikinci ve üçüncü haftalarını diğer dokularda görüldüğü gibi reperfüzyon periyoduyla ilişkilendirmişlerdir. Kırık hematoma, iyileşmenin erken döneminde antioksidan etkiye sahip aşırı hiyalüronik asit içerdiğinden, kırık iyileşmesinin ilk günü boyunca MDA düzeylerinin aşırı yüksek olmadığını bildirmişlerdir. Kallus oluşumu döneminde MDA düzeylerinin belirgin bir şekilde yükseldiği ve bu artışa muhtemelen önceki göreceli iskemiye reaksiyon olarak gelişen artmış vaskülarizasyon ve oksijenasyonun neden olduğu vurgulanmıştır. Yeler ve ark. (259) sıçanlarda kırık iyileşmesi sürecinde eritrosit MDA düzeyini ölçmüş ve kırık iyileşmesinin ilk ayında, deney grubunun düzeyleri kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Çalışmalarının sonunda, endojen antioksidan savunma mekanizmalarının kırık iyileşmesinin ilk ayında oksidatif stresin üstesinden gelmek için yetersiz olabileceği ve oksijen kaynaklı olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için kırık iyileşmesi sırasında antioksidan tedavinin faydalı olacağı sonucuna varmışlardır. Yukarıdaki çalışmalara bağlı olarak, bazı antioksidanların kırık iyileşmesindeki olası rolleri de araştırılmıştır (246,262).

Türk ve ark. (262) sıçan modelinde antioksidan alfa-tokoferolün erken ve geç faz kırık iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmışlar ve MDA konsantrasyonlarının 15 ve 45. günlerde alfa-tokoferol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük olduğunu ve 60. günde 15. gün değerlerinin tekrarlandığını görmüşlerdir. Bu nedenle, alfa-tokoferolün kırık iyileşmesinin hem erken hem de geç fazı üzerinde pozitif etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. İma-Nirvana ve ark. (263), doğal antioksidan olan E vitamininin kemik rezorpsiyonu ve kaybını azalttığını bildirmişlerdir. Sergeev ve ark. (264), yetersiz vitamin E ile beslenen ratlarda kalsiyum emiliminin ve kemiklerdeki kalsiyum depolanmasının azaldığını vurgulamışlardır. Morton ve ark. (265), serbest radikal toplayıcısı olan Vitamin C'nin kemik mineral yoğunluğunda olumlu etkileri olduğunu belirtmişlerdir.

Arı sütü günümüzde son derece etkili bir doğal antioksidan ve güçlü bir serbest radikal temizleyicisi olarak dikkat çekmektedir (266,267). Yeni yapılan bir çalışmada membran anyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, ters fazlı yüksek performanslı likid kromatografisi ve ultrafiltrasyon yoluyla arı sütü hidrolizattan 29 antioksidatif peptid ayrılmıştır. Bu peptidlerden 2-4 amino asitli olan 12 tanesinin (Phe-Arg, Ala-Leu, Lys-Phe, Ile-Arg, Phe-Lys, Arg-Tyr, Tyr-Asp, Lys-Leu, Lys-Tyr, Lys-Asn-Tyr-Pro ve Tyr-Tyr, Leu-Asp-Arg) serbest radikal temizleme aktivitesinin hidroksil grupları tarafından yapıldığı görülmüştür. Örneğin, AS'deki üç tirozildipeptid (Tyr-Tyr, Lys-Tyr ve Arg-Tyr) serbest radikallerin fenolik hidroksil grubundan hızlı bir şekilde bir hidrojen atomu çekerek işlev görür. Bu peptitlerin antioksidan etkilerinin reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme yeteneklerinin bir kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (268).

Silici ve ark. (267) yaptıkları çalışmada sisplatin ile tedavi edilen sıçanlara arı sütü uygulamışlar ve testiküler dokuda süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon-peroksidaz aktivitelerinin ve malondialdehit seviyelerinin düştüğünü görmüşlerdir. Bir başka çalışmada arı sütünün fumonisin kaynaklı oluşan oksidatif stresi belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir (186). Veriler, AS'nin süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil hidrat (DPPH) radikalleri gibi serbest radikalleri temizleyebildiğini göstermiştir (269). AS'nin farelerin serum ve böbrek dokusunda oksidatif stresin bir belirteci olan 8-hidroksi-2 deoksiguanozinin seviyelerini belirgin bir şekilde düşürdüğü ileri sürülmüştür (10). AS uygulamasının MDA üretiminin inhibisyonu ve glutatyon seviyelerinin düzenlenmesiyle kadmiyumun indüklediği oksidatif hasara ve genotoksisiteye karşı önemli derecede koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (270). Buna ek olarak, karbon tetraklorür ve sisplatin ile maruz bırakılan karaciğer ve böbrek dokularında AS, oksidatif strese karşı koruyucu bir rol oynamıştır. Bu etki azalmış MDA üretimi ve glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPX), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi temel hücre antioksidan enzimlerinin önemli artan aktiviteleri ile ilişkilidir (157,267). Ayrıca, AS'nin azaltılmış oksidatif stres yoluyla farelerin ömrünü uzattığı belirtilmektedir (10). Guo ve ark. (233) AS'nin in-vivo ve in- vitro çalışmalarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Dahası, Jamnik

ve ark. (271) AS uygulamasının *Saccharomyces cervisiae* maya hücrelerindeki hücre içi oksidatif stresi iyileştirdiğini ve SOD üretimi üzerinde pozitif etki yaptığını gözlemlemişlerdir. AS parasetamol ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanların karaciğer dokusunda MDA düzeyini azaltıp GSH-Px aktivitesini arttırmıştır (272).

AS ve panthenol içeren Pedyphar merhem yara içinde enfeksiyonu ortadan kaldıran ve diyabetik ayak ülserlerinde iyileşmeyi sağlayan alkalın bir ortam oluşturmaktadır (273). AS'den izole edilen antimikrobiyal peptit royalisin, yaraları enfeksiyona karşı korumada önemli rol oynamaktadır (274). Bazı raporlar, AS'nin streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda granülasyon dokusunda eksüda ve kollajen oluşumunu azaltarak anti-inflamatuar etkiye sahip olduğunu göstermektedir. AS ayrıca, desquame deri lezyonlarının iyileşme süresini önemli ölçüde azaltmıştır (275). Bir klinik çalışmada, AS'nin ülsere diyabetik ayak hastalarında yara iyileşmesini hızlandırdığı ve diğer standart tedavilerle birlikte kullanıldığında daha yararlı olduğu gösterilmiştir (276). Cilt yanıklarında kullanılan krem ve merhemler genellikle %0.05 ile 1 oranında arı sütü içermektedir (277). Yara içine 5-30 mg/ml arı sütü enjeksiyonu ile derinin yeniden geliştiği bildirilmiştir (278). Arı Sütü T1-T2 savunma hücrelerini sayısal ve niteliksel olarak arttırarak bağışıklık sistemini güçlendirmektedir (9). Lösemi nedeniyle kemoterapi ve radyoterapi alan çocuklarda arı sütünün kandaki beyaz küre, nötrofil ve lenfositlerin artmasına neden olduğu saptanmıştır (279). Ratlarda enjeksiyon yolu ile kullanıldığında hemoglobin ve eritrosit miktarı artmaktadır (278). Deneysel çalışmalarda, AS'nin anti-inflamatuar ve serum glikoz düzeylerini düşürme gibi farklı dokular üzerinde koruyucu etkileri (233,280), periodontal ligament üzerinde anti-inflamatuar ve osteoindüktif etkisi (16), kemoterapi alan hastalarda topikal uygulamaların ağız içi yumuşak doku yara iyileşmesine olumlu etkileri (281) olduğu gösterilmiştir. PUBMED tabanlı literatür araştırmamızda arı sütünün farmakolojik açıdan çok farklı özellikleri deneysel çalışmalarla kanıtlanmasına rağmen, kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen yeterli çalışma bulunmamaktadır. Kritik boyut defektlerin greft ile rekonstrüksiyonunda lokal ve sistemik arı sütü uygulamalarının yapıldığı başka bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu nedenle özgün nitelik taşımaktadır.

Arı sütü gibi diğer bir arı ürünü olan propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada %2.5 konsantrasyonunda 0.5cc arı sütü intramuskular olarak tek doz kırık bölgesine uygulanmıştır. 7,14,21 ve 28. günlerde alınan sonuçlara göre propolis kırık iyileşmesini hızlandırmış ve kemik kalitesini arttırmıştır. H.O. Kazancıoğlu ve ark. oluşturdukları rat modelinde propolis içeriğinde bulunan antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser etkilerinden sorumlu olan CAPE (Caffeic acid phenethyl ester)'yi 5mm çaplı defektlere jelatin sünger yardımıyla lokal olarak ve ayrıca sistemik uygulayarak kemik iyileşmesine etkisini incelemiştir (282). 100 mmol/kg lokal ile 10 mmol/kg sistemik uygulamaları ile 28. gün sonunda CAPE'nin kemik iyileşmesini anlamlı derecede etkilediği vurgulanmıştır. Uçan ve ark.(283), yaptığı çalışmada CAPE günlük intraperitoneal (10µm) uygulanıp defekt bölgeleri bazı gruplarda boş bırakılıp bazıları β-trikalsiyum fosfat/hidroksil apatit ile greftlenmiştir. 7,15 ve 30. günlerin değerlendirilmesine göre CAPE'nin kırık iyileşmesinin geç döneminde daha etkili olduğu görülmüştür. AS gibi apiterapi ürünü olan propolis ve içeriğinin kemik iyileşmesine olan olumlu etkilerinin kanıtlanması hipotezimize güç kazandırmıştır.

Kafadar ve ark. (15), ooferektomi yapılan sıçan modelinde osteoporoza bağlı kemik kaybını azaltmak için arı sütü ve arı poleni kullanmışlardır. Deney gruplarında günlük 50mg/kg arı sütü ve 50mg/kg arı poleni gavaj yoluyla 12 hafta verildikten sonra alınan sonuçlara göre; kemik dokudaki kalsiyum ve fosfor düzeyleri arı sütü ve arı poleni uygulanan gruplarda anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur. İn-vitro diş avulsiyon modelinde arı sütünün periodontal ligament fibroblastların canlılığı ve fonksiyonu üzerindeki etkisini araştırmanın amaçlandığı çalışmada arı sütü 100µg/ml, 500µg/m ve 900µg/ml oranlarda kullanılmış, Hank's solüsyonu ve süt ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, AS solüsyonunun doza bağlı olarak Hank's solüsyonuna göre periodontal ligament fibroblast canlılığını daha yüksek oranda koruduğunu göstermektedir (284). Fare periodontal ligamentinde osteojenik ve sementojenik hücreler olan MPDL22 hücreleri üzerinde arı sütünün mineralizasyona etkisi incelenmiştir. Arı sütü uygulanan grupta osteopontin, osteokalsin ve osterix mRNA ekspresyonunda ve mineralize nodül formasyonunda önemli ölçüde artış görülerek osteoindüktif etki vurgulanmıştır. Yine aynı çalışmada P.gingivalis

lipopolisakkaritleriyle uyarılan MPDL22 hücrelerinden inflamatuvar sitokin salınımına etkisine bakılmış ve antienflamatuvar etki gözlenmiştir. Arı sütünün periodontal hastalıklarda osteoindüktif ve antienflamatuvar etki göstererek koruyucu ve tedavi edici olabileceği sonucuna varılmıştır (16). Arı sütünün farelerde 0,01mg/ml, 0.1mg/ml ve 1mg/ml oranında kullanıldığı diğer çalışmada Tip1 prokollajen gen ekspresyonunda ve osteoblast aktivitesinde artışla birlikte kemik formasyonunda artış gözlemlenmiştir (17).

Kemik iyileşmesinin histolojik olarak değerlendirildiği çalışmalarda örneklerin incelenmesi için farklı sakrifikasyon zamanları seçilmiştir. Genellikle ilk 14 günlük süreyi içeren iyileşmenin erken dönemi veya 30-60 günlük süreyi kapsayan iyileşmenin geç dönemi tercih edilmiştir. Kırık oluşumu ile birlikte o bölgede yangı da başlar ve yaklaşık olarak bu süreç 2-3 hafta devam eder. Yangı, kallus formasyonunda önemli rol oynar ve kırıkta ya da kemik şekillenene kadar devam eder (285). Fibrin ağları ve kollajenlerin oluşturduğu genç granülasyon dokusuna osteoblastlar ve kondroblastlar da gelerek yumuşak fibröz kallus oluşur. Osteoid sentezi ve hidroksiapatit tuzlarının çökmesiyle ön kallus oluşur. Kan damarları medullada yeniden şekillenir ve kırık uçları arasındaki stabilite artar. Ön kallusun yerine kemiksi kallus geçer ve kemik kaynaması tamamlanır. Bu süreç yaklaşık 6-8 haftada gerçekleşir. Kallus köprüleri oluştuktan sonra remodelling süreci başlar (285-287). Bu nedenle, çalışmamızdaki sakrifikasyon zamanı kemikleşmenin yaklaşık olarak tamamlandığı 8. hafta olarak belirlenmiştir.

Literatüre bakıldığında çalışmamıza benzer kemik iyileşmesinin değerlendirildiği sadece tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada cerrahi destekli hızlı maksiller sütür genişletmesinde kısa ve uzun dönem sistemik arı sütü uygulamalarının kemik formasyonuna etkisi incelenmiştir (288). Çalışmada arı sütü kısa dönem olarak sadece ekspansiyon ve retansiyon periyodunda (17 gün) , uzun dönemde ise ekspansiyon öncesi, ekspansiyon evresinde ve retansiyon periyodunda (57 gün) verilmiştir. Sistemik gavaj için 50 mg/ml (%5) oranında günlük 100 mg/kg doz tercih edilmiştir. Farklı çalışmaların sistemik gavaj uygulamalarında genellikle günlük 10-50-100-300 ve 1000 mg/kg miktarlarında arı sütü kullanılmıştır. Bizim

çalışmamızda ise 100 mg/kg arı sütü 2 ay boyunca gavaj yoluyla uygulanmıştır. Sürenin uzun olması nedeniyle günlük tek seferlik uygulamaların daha uygun olacağı ve tek seferlik gavajda normal beslenmesine devam eden ratın mide kapasitesinin 0.5 ml solüsyonu tolere edebileceği düşüncesiyle saf olarak elde edilen arı sütü 50 mg/ml (%5) oranında seyreltilmiştir. Arı sütünün seyreltilmesi için çalışmalarda phosphate-buffered saline (PBS), steril salin ve distile su kullanılmıştır (157,288). Çalışmamızda %5 oranının elde edilmesi için distile su tercih edilmiştir. Farklı çalışmalarda çeşitli büyüme hormonları ve bifosfanatların biyomateryaller ile lokal olarak defekt bölgesine uygulanıp etkilerinin incelenmesi ve olumlu cevaplar alınması nedeniyle, arı sütünün de lokal olarak etkili olabileceği düşünülerek diğer deney grubunda arı sütü lokal uygulaması yapılmıştır.

Toker ve ark.(289), rat kalvaryal defekt modelinde alendronatın kemik iyileşmesine etkisini incelemişlerdir. Deney gruplarında lokal alendronat 1 mg/ml oranında 5 dk otojen greft ile karıştırıldıktan sonra defekte uygulanmıştır. Sistemik alendronat ise defektler yine otojen greft ile doldurulduktan sonra 0.01mg/kg şeklinde 8 hafta boyunca uygulanmıştır. 8 hafta sonunda osteoblast sayısı, lameller kemik formasyonu ve yeni oluşan kemik histolojik olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar alendronat uygulanan gruplarda (lokal ve sistemik) kemik iyileşmesinin daha iyi olduğunu göstermiştir.

Toker ve ark. (290) yaptığı diğer bir alendronat çalışmasında lokal ve sistemik uygulama sentetik greft ile yapılmıştır. 8 hafata sonra alınan örnekler osteoklast sayısı, osteoblast sayısı, yeni kemik alanı ve kemik formasyonu parametrelerine göre histolojik olarak incelenmiştir. Çalışmanın sınırları içinde, alendronatın sistemik veya lokal uygulamasının, kemik rejenerasyonunu sentetik greft uygulanan grupta önemli derecede arttırdığını ve sistemik uygulamanın lokal uygulamaya göre daha etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Turhan ve ark. (291) çalışmalarında deneysel rat segmenter kemik defekti modellerinde TZP'yi DKM ile kombine ve her iki materyali tek başına kullanarak kemik iyileşmesine etkilerini incelemişlerdir. 10. haftada yapılan değerlendirmede

kontrol grubuna göre TZP'nin DKM kadar etkili olduğu fakat birlikte kullanımında aynı etkinin gözlemlenemediği görülmüştür.

Bizim yaptığımız çalışmada, oluşturduğumuz rat kalvaryal kritik boyut kemik defektlerine DKM ile birlikte lokal ve sistemik uygulanan arı sütünün kemik iyileşmesine etkisi incelenmiştir. Sham grubu ve yalnızca DKM' nin uygulandığı kontrol grubu için aynı rat üzerinde bilateral kaviterler hazırlanarak denek sayısının azaltılması amaçlanmıştır. 8 hafta sonra alınan örneklerin histolojik incelemesi yeni oluşan kemik kalitesi, anjiyogenezis ve RANKL eksprese eden osteoblast sayıları parametrelerine göre yapılmıştır.

Lokal ve sistemik arı sütü uygulanan gruplarda sham ve kontrol grubuna göre yeni kemik kalitesi ve anjiyogenezis değerlerinde artış, RANKL ekspresyonu yapan osteoblast sayılarında azalma görülmüştür. Buna rağmen, ilgili parametrelerde sadece DKM+SAS-Sham ve DKM+SAS-DKM arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışmamızdaki sistemik etki sonucu Özkan ve ark.(288)'nin yaptığı hızlı maksiller sütür genişletmesindeki arı sütünün etkisini destekler niteliktedir. Bu sonuçlara göre arı sütü sadece sistemik formuyla kemik iyileşmesine anlamlı katkı sağlamış lokal uygulama şekliyle anlamlı etki gösterememiştir.

Sistemik arı sütü ile tedavi edilen grupta VEGF ile pozitif işaretlenen kapiller değerleri kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış yakalamıştır. Anjiyogenez, kırık oluştuktan sonra tüm kemik remodeling sürecinde merkezi bir rol oynamaktadır (292). Anjiyogenez kontrol altına alan iki ana hormonal yol VEGF yolu ve Anjiyopoietin yoludur (293). Bunlardan en önemlisi VEGF yoludur. İnsan VEGF'inin en önemli izomerleri VEGF121, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206'dır. Çeşitli in-vitro çalışmalarda VEGF'in arterler, venler ve lenfatik damarlardan türetilen vasküler endotel hücrelerinin gelişimini teşvik etme özelliği kanıtlanmıştır (294). De Palma'ya göre kemik gelişimi kallusun damarlanmasıyla başlar. Anjiyogenez, endokondral kemikleşmede avasküler kırık dokunun kademeli olarak vasküler kemik dokusuna dönüştürülmesinde önemli bir role sahiptir (294). Epifiz bezindeki hipertrofik kondrositler, metafizik damarların kırık dokuya

invazyonunu arttıran VEGF'i eksprese ederek yeni kemik oluşumu sağlar (295). İyileşme bölgesindeki anjiyogenezis sahadaki damarların tomurcuklanmasıyla olur. Damarsal beslenme yeterli olursa osteoblastlar kallus içindeki matriksin oluşmasını sağlar. Dolayısıyla sert kallus oluşumu için damarlanma, damarlanmanın sağlanabilmesi için osteoidin mineralizasyonu şarttır. VEGF'in sadece endokondral ossifikasyonla değil, aynı zamanda intramembranöz ossifikasyonla da ilgili olduğu düşünülmektedir (296). Bu döngü içinde, çalışmamızda deney grubunda sistemik yol ile elde edilen kapiller artışı, kontrol gruplarına kıyasla anjiyogenez ve kemik yapımında bir artış olduğunu ve arı sütünün bölge kemik oluşumunu pozitif yönde etkilediğini göstermektedir.

Sistemik arı sütü uygulanan grupta Allen kemik iyileşme skorlamaları kontrol gruplarına göre anlamlı derecede bir artış göstermiştir. Kontrol gruplarında fibröz doku ağırlıklı olup, sistemik arı sütü grubunda spongios ve kompakt kemik alanlarının daha yoğun olması, sistemik arı sütünün kemik iyileşmesini desteklediğinin diğer bir göstergesidir. Ayrıca, Sham grubunda 5 mm şeklinde açılıp herhangi bir materyal uygulanmadan boş bırakılan kavitelerde Allen sınıflamasına göre fibröz iyileşme görülmesi seçtiğimiz defekt boyutunun kritik boyut kavramına uyduğunu göstermektedir.

Osteoprotegerin (OPG), Reseptör aktivatör nükleer kappa B (RANK) ve Reseptör aktivatör nükleer kappa B Ligand (RANKL) proteinleri, kemik metabolizması da dahil olmak üzere çeşitli hücrel süreçlerin mediyatörleridir ve özellikle kemik remodeling aktivitesinin anahtar düzenleyicileridir (146). Osteoklastların gelişimi RANKL, OPG ve TNF- α gibi osteoblastlar tarafından sentezlenen sitokinlerle kontrol edilir (Bkz. Şekil 2.2) (146). RANKL (TRANCE / OPGL / ODF olarak da bilinir), osteoblastların yüzeyinde eksprese edilir ve osteoklastogenezde RANK aracılığıyla osteoklast progenitörleri için sinyal sağlayarak merkezi bir rol oynar (297). RANK aracılığıyla sinyal iletimi, osteoklast farklılaşmasına ve fonksiyonel aktivasyona yol açar (297,298). Kemik formasyonunu indükleyen OPG, RANKL'yi bağlama ve osteoklast kemik rezorpsiyonu aktivitesini uyaran pre-osteoklastlar üzerindeki RANKL/RANK reseptör etkileşimini bloke

ederek RANKL için tuzak reseptör görevi görür (298). Kemik remodelingi OPG'nin RANKL'a göreceli oranı ile değerlendirilebilir (299). OPG, RANK ve RANKL proteinleri arasındaki iletişimdeki herhangi bir dengesizlik, oluşan mineralize dokunun kalitesinde değişikliğe neden olabilir. RANKL seviyesi yükseldiğinde, osteoklast öncülerindeki RANK ile bağlanarak, dengeyi osteoklast formasyonu ile kemik rezorpsiyonu lehine değiştirmektedir. OPG ve RANKL ekspresyonu osteoblastlar tarafından gelişimsel olarak düzenlenir. Osteoblast farklılaşması sırasında OPG artarken RANKL ekspresyonu, osteoblast farklılaşması derecesi ile ters orantılıdır (300). Yapılan çalışmalarda spesifik anti-RANKL antikoru olan denosumabın kemik rezorpsiyonunu hızlı ve önemli oranda azalttığı gösterilmiştir. RANKL'ın inhibisyonu osteoporoz ve diğer ilişkili hastalıklarda yeni bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilir (301). Çalışmamızda RANKL eksprese eden osteoblast sayıları sistemik arı sütü grubunda kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar sistemik uygulamanın dengeyi rezorpsiyon yerine formasyon yönünde değiştirerek kemik iyileşmesini desteklediğini göstermektedir.

Lokal uygulama sistemik uygulamaya benzer etkiler oluştururken, bu etki anlamlı bulunmamıştır. Nobre ve ark.(302) bifosfanatların kemik tarafından tutulup, emildikten sonra yavaş yavaş salınarak periosttaki osteoprogenitör hücreleri stimule ettiğini ve bu sayede lokal uygulamaların etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, arı sütünün kemikte tutulum gibi bilinen bir özelliği olmaması nedeniyle lokal uygulamanın etkili olmadığı görüşündeyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ratların parietal kemiğinde oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerine Demineralize kemik matriksi (DKM) ile lokal ve sistemik uygulanan arı sütünün kemik iyileşmesine etkilerinin histopatolojik olarak değerlendirildiği bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir;

1. Defekt bölgesinde oluşan yeni kemik kalitesinin değerlendirilmesine göre arı sütünün sistemik uygulandığı grupta bölge daha çok trabeküler kemik ile dolmuş ve fibröz doku daha az yer almıştır. Lokal ve sistemik uygulamada kontrol gruplarına göre kemik kalitesinde artış olmasına rağmen sadece sistemik uygulamada anlamlı fark bulunmuştur.
2. Bölgedeki anjiyogenezis (damarlanma) lokal ve sistemik uygulamalarla artmış, ama sonuçlar sadece sistemik uygulamadaki artışın anlamlı olduğunu göstermiştir.
3. RANKL eksprese eden osteoblast değerleri sistemik arı sütü grubunda kontrol gruplarına göre anlamlı derecede azalma göstermiştir. Sistemik arı sütü uygulanan grupta rezorpsiyon yerine formasyonun daha baskın rol oynadığı görülmüştür. Lokal uygulamanın kontrol gruplarına göre anlamlı bir etkisi olmamıştır.

Literatür kapsamlı incelendiğinde çalışmamız arı sütü ve DKM birlikte kullanılarak kemik doku üzerinde yapılmış ilk çalışmadır. Çalışmamız geleneksel tıpta uzun yıllardır kullanılmakta olan arı sütünün, maksillofasiyal bölge kemik defekti iyileşmesini hızlandırmak için de kullanılabileceği yönünde benzer çalışmalara öncü olabilir. Kemik iyileşmesi üzerinde arı sütü ile yapılmış yeterli sayıda çalışma bulunmadığı için arı sütünün uygulama programı (uygulama dozu, uygulama süresi ve uygulama rejimi), üzerinde durulması gereken konular arasındadır. Arı sütünün lokal uygulaması için defekt bölgesine taşınıp yeterli doz ve sürede kalabilmesi için farklı taşıyıcı sistemler kullanılarak da çalışmalar yapılmalıdır. Sistemik uygulama ile görülen etkinin desteklenmesi, bu etkiye özel arı

sütü kimyasallarının ve bunlarla ilişkili biyolojik aktivitelerinin tespiti ve en ideal uygulama programı için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



7. KAYNAKLAR

1. **Murugan R, Ramakrishna S.** Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue engineering* **2007**; 13(8):1845-1866.
2. **Clokier CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK.** Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *Journal of Craniofacial Surgery* **2002**; 13(1):111-121.
3. **Mokbel N, Serhal CB, Matni G, Naaman N.** Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral and maxillofacial surgery* **2008**; 12(2):73-78.
4. **Gielkens PF, Schortinghuis J, De Jong JR, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RR.** Vivosorb®, Bio-Gide®, and Gore-Tex® as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clinical oral implants research* **2008**; 19(5):516-521.
5. **Rokn AR, Khodadoostan MA, Ghahroudi AARR, Motahhary P, Fard MJK, De Bruyn H, Afzalifar R, Soolar E, Soolari A.** Bone formation with two types of grafting materials: a histologic and histomorphometric study. *The open dentistry journal* **2011**; 5:96.
6. **Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt D, Buser D.** Comparative Study of Biphasic Calcium Phosphates with Different HA/TCP Ratios in Mandibular Bone Defects. Long-Term Histomorphometric Study in Minipigs. **2008**. Trans Tech Publ. p 1241-1244.
7. **Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S.** Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *Journal of pharmacological sciences* **2007**; 104(4):384-386.
8. **Brouwers E, Ebert R, Beetsma J.** Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *Journal of Apicultural Research* **1987**; 26(1):11-23.
9. **Šver L, Oršolić N, Tadić Z, Njari B, Valpotic I, Bašić I.** A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **1996**; 19(1):31-38.
10. **Inoue S-i, Koya-Miyata S, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M.** Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. *Experimental gerontology* **2003**; 38(9):965-969.
11. **Lercker G, Capella P, Conte L, Ruini F, Giordani G.** Components of royal jelly II. The lipid fraction, hydrocarbons and sterols. *Journal of Apicultural Research* **1982**; 21(3):178-184.
12. **Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M.** Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2004**; 68(1):138-145.
13. **Erem C, Deger O, Ovali E, Barlak Y.** The effects of royal jelly on autoimmunity in Graves' disease. *Endocrine* **2006**; 30(2):175-183.
14. **Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K.** A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of biological chemistry* **1990**; 265(19):11333-11337.
15. **Kafadar İH, Güney A, Türk CY, Oner M, Silici S.** Royal jelly and bee pollen decrease bone loss due to osteoporosis in an oophorectomized rat model. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* **2012**; 23(2):100-105.

16. **Yanagita M, Kojima Y, Mori K, Yamada S, Murakami S.** Osteoinductive and anti-inflammatory effect of royal jelly on periodontal ligament cells. *Biomedical Research* **2011**; 32(4):285-291.
17. **Narita Y, Nomura J, Ohta S, Inoh Y, Suzuki K-M, Araki Y, Okada S, Matsumoto I, Isohama Y, Abe K.** Royal jelly stimulates bone formation: physiologic and nutrigenomic studies with mice and cell lines. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2006**; 70(10):2508-2514.
18. **Caverzasio J, Palmer G, Bonjour J-P.** Fluoride: mode of action. *Bone* **1998**; 22(6):585-589.
19. **Russell RGG.** Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics* **2007**; 119(Supplement 2):S150-S162.
20. **Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ.** Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone* **2008**; 42(5):848-860.
21. **Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R.** Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures* **1996**; 45:371.
22. **Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R.** Bone biology. Part II. Formation form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Journal of Bone and Joint Surgery-Series A* **1995**; 77(8):1276-1289.
23. **Recker RR, Barger-Lux J.** Embryology, anatomy, and microstructure of bone. *Disorders of bone and mineral metabolism New York: Raven* **1992**; 219.
24. **Baron R.** General principles of bone biology. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* **2003**:1-8.
25. **Robey G.** Extracellular matrix and biomineralization of bone. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* **2003**:38-46.
26. **Jee WS.** Integrated bone tissue physiology: anatomy and physiology. *Bone mechanics handbook* **2001**.
27. **Seeman E, Delmas PD.** Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *New England Journal of Medicine* **2006**; 354(21):2250-2261.
28. **Cowin SC.** Bone mechanics handbook: CRC press. **2001**.
29. **Väänänen HK, Zhao H.** Osteoclast function: biology and mechanisms. *Principles of bone biology* **2002**; 1:127-139.
30. **Hermey D, Marks S.** The structure and development of bone. *Principles of Bone Biology* **1996**:3-14.
31. **Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM.** RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual review of immunology* **2002**; 20(1):795-823.
32. **Perez Amodio S.** Novel roles of bone lining cells in bone remodeling. **2005**.
33. **Kapanen A.** Biocompatibility of orthopaedic implants on bone forming cells. **2003**.
34. **Proussaefs P, Lozada J, Kleinman A, Rohrer MD.** The use of ramus autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation and implant placement: a pilot study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **2002**; 17(2).
35. **Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J.** Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science* **2008**; 73(9).
36. **Holtrop M.** Light and electron microscopic structure of bone-forming cells. *Bone* **1990**; 1:1-39.
37. **Pritchard J.** The osteoblast. *Boume, The biochemistry and physiology of bone* **1972**; 1.
38. **Katagiri T, Takahashi N.** Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral diseases* **2002**; 8(3):147-159.

39. **Wan M, Cao X.** BMP signaling in skeletal development. *Biochemical and biophysical research communications* **2005**; 328(3):651-657.
40. **Karsenty G, Wagner EF.** Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell* **2002**; 2(4):389-406.
41. **Hayden J, Mohan S, Baylink D.** The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* **1995**; 17(2):S93-S98.
42. **Parfitt AM.** The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation* **1983**:143-223.
43. **Martin R.** Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone* **2000**; 26(1):1-6.
44. **Becker C.** Pathophysiology and clinical manifestations of osteoporosis. *Clinical cornerstone* **2008**; 9(2):42-50.
45. **Lerner U.** Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research* **2016**.
46. **Briggs A, Greig A, Wark J.** The vertebral fracture cascade in osteoporosis: a review of aetiopathogenesis. *Osteoporosis International* **2007**; 18(5):575-584.
47. **Marcus R, Feldman D, Nelson D, Rosen CJ.** Fundamentals of osteoporosis: Academic Press. **2009**.
48. **Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG.** Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **2008**. Elsevier. p 459-466.
49. **Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA.** Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry* **2003**; 88(5):873-884.
50. **Le A, Mclau T, Hu D, Helms J.** Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *Journal of Orthopaedic Research* **2001**; 19(1):78-84.
51. **Banta JV, Schreiber RR.** Hyperplastic callus formation in osteogenesis imperfecta simulating osteosarcoma. *JBJS* **1971**; 53(1):115-122.
52. **Shelfbine SJ, Augat P, Claes L, Simon U.** Trabecular bone fracture healing simulation with finite element analysis and fuzzy logic. *Journal of biomechanics* **2005**; 38(12):2440-2450.
53. **Kalfas IH.** Principles of bone healing. *Neurosurgical focus* **2001**; 10(4):1-4.
54. **Einhorn TA.** The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research* **1998**; 355:S7-S21.
55. **Kou PM, Babensee JE.** Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *Journal of biomedical materials research Part A* **2011**; 96(1):239-260.
56. **Sorokin L.** The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature reviews Immunology* **2010**; 10(10):712.
57. **Duffield JS.** The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical science* **2003**; 104(1):27-38.
58. **Burr DB.** Targeted and nontargeted remodeling. *Bone* **2002**; 30(1):2-4.
59. **Sandhu SK, Hampson G.** The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. *Journal of clinical pathology* **2011**; 64(12):1042-1050.
60. **Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL.** Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **2003**; 423(6937):337.
61. **Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L.** Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microscopy research and technique* **2003**; 61(6):504-513.
62. **Mohan S, Baylink DJ.** Bone growth factors. *Clinical orthopaedics and related research* **1991**; 263:30-48.

63. **Khoury F, Buchmann R.** Surgical therapy of peri-implant disease: a 3-year follow-up study of cases treated with 3 different techniques of bone regeneration. *Journal of periodontology* **2001**; 72(11):1498-1508.
64. **Esposito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P.** Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev* **2008**; 3(3).
65. **Hallman M, Thor A.** Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontology 2000* **2008**; 47(1):172-192.
66. **Sheikh Z, Javaid M, Abdallah M.** Bone replacement graft materials in dentistry. *Dental Biomaterials (Principle and Its Application)* **2013**.
67. **Ornitz DM, Marie PJ.** FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development* **2002**; 16(12):1446-1465.
68. **Crea A, Deli G, Littarru C, Lajolo C, Orgeas GV, Tatakis DN.** Intrabony defects, open-flap debridement, and decortication: A randomized clinical trial. *Journal of periodontology* **2014**; 85(1):34-42.
69. **Chin M, Toth BA.** Distraction osteogenesis in maxillofacial surgery using internal devices: review of five cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **1996**; 54(1):45-53.
70. **Tolman DE.** Reconstructive procedures with endosseous implants in grafted bone: a review of the literature. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **1995**; 10(3).
71. **Kramer FJ, Dempf R, Bremer B.** Efficacy of dental implants placed into fibula-free flaps for orofacial reconstruction. *Clinical oral implants research* **2005**; 16(1):80-88.
72. **McAllister BS, Gaffaney TE.** Distraction osteogenesis for vertical bone augmentation prior to oral implant reconstruction. *Periodontology 2000* **2003**; 33(1):54-66.
73. **Misch CM.** Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **1997**; 12(6).
74. **Urist M.** Bone transplants and implants. *Fundamental and clinical bone physiology* **1980**.
75. **Goldberg VM.** Natural history of autografts and allografts. *Bone implant grafting*: Springer. **1992**:9-12.
76. **Cornell CN.** Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthopedic Clinics* **1999**; 30(4):591-598.
77. **Mastrogriacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R.** Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* **2006**; 27(17):3230-3237.
78. **Boyne P.** Bone induction and the use of HTR polymer as a vehicle for osseous inductor materials. *Compendium (Newtown, Pa) Supplement* **1988**(10):S337-341.
79. **Sheikh Z, Sima C, Glogauer M.** Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation. *Materials* **2015**; 8(6):2953-2993.
80. **Botticelli D, Berglundh T, Buser D, Lindhe J.** The jumping distance revisited. *Clinical Oral Implants Research* **2003**; 14(1):35-42.
81. **Cypher TJ, Grossman JP.** Biological principles of bone graft healing. *The Journal of foot and ankle surgery* **1996**; 35(5):413-417.
82. **Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA.** Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical orthopaedics and related research* **1996**; 329:300-309.
83. **Draenert F, Huetzen D, Neff A, Mueller W.** Vertical bone augmentation procedures: basics and techniques in dental implantology. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2014**; 102(5):1605-1613.

84. **Khoury F.** Augmentation of the sinus floor with mandibular bone block and simultaneous implantation: a 6-year clinical investigation. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **1999**; 14(4).
85. **Simion M, Jovanovic SA, Tinti C, Benfenati SP.** Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. *Clinical Oral Implants Research* **2001**; 12(1):35-45.
86. **Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam F.** Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *International journal of oral and maxillofacial surgery* **2004**; 33(2):157-163.
87. **Miloro M, Ghali G, Larsen P, Waite P.** Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery: PMPH-USA. **2004**.
88. **Boyce T, Edwards J, Scarborough N.** Allograft bone. *Orthopedic Clinics* **1999**; 30(4):571-581.
89. **Tomford WW.** Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *JBJS* **1995**; 77(11):1742-1754.
90. **Control CfD, Prevention.** Update: allograft-associated bacterial infections--United States, 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* **2002**; 51(10):207.
91. **Control CfD, Prevention.** Septic arthritis following anterior cruciate ligament reconstruction using tendon allografts--Florida and Louisiana, 2000. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* **2001**; 50(48):1081.
92. **Block MS.** Horizontal ridge augmentation using particulate bone. *Atlas of the oral and maxillofacial surgery clinics of North America* **2006**; 14(1):27-38.
93. **Oxlund H, Andersen N, Ørtoft G, Ørskov H, Andreassen T.** Growth hormone and mild exercise in combination markedly enhance cortical bone formation and strength in old rats. *Endocrinology* **1998**; 139(4):1899-1904.
94. **Simion M, Trisi P, Piattelli A.** Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **1994**; 14(6).
95. **Valentini P, Abensur D.** Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): a clinical study of 20 patients. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **1997**; 17(3).
96. **Cochran DL, Douglas HB.** Augmentation of osseous tissue around nonsubmerged endosseous dental implants. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **1993**; 13(6).
97. **Al Ruhaimi KA.** Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **2001**; 16(1).
98. **Dias RR, Sehn FP, Santana Santos T, Silva ER, Chaushu G, Xavier SP.** Corticocancellous fresh-frozen allograft bone blocks for augmenting atrophied posterior mandibles in humans. *Clinical oral implants research* **2016**; 27(1):39-46.
99. **Macedo LGS, Mazzucchelli-Cosmo LA, Macedo NL, Monteiro ASF, Sendyk WR.** Fresh-frozen human bone allograft in vertical ridge augmentation: clinical and tomographic evaluation of bone formation and resorption. *Cell and tissue banking* **2012**; 13(4):577-586.
100. **Shetty V, Han T.** Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dental clinics of North America* **1991**; 35(3):521-530.
101. **Mellonig J.** Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery. *Dental Clinics of North America* **1991**; 35(3):505-520.

102. **Friedlaender GE, Strong D, Sell K.** Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *JBJS* **1976**; 58(6):854-858.
103. **Quattlebaunr JB, Mellonig JT, Hensel NF.** Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects. *Journal of periodontology* **1988**; 59(6):394-397.
104. **Turner DW, Mellonig JT.** Antigenicity of freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects. *Journal of periodontal research* **1981**; 16(1):89-99.
105. **Committee on Research S.** Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration. *Journal of periodontology* **2001**; 72(6):834.
106. **Mellonig JT.** Human histologic evaluation of a bovine-derived bone xenograft in the treatment of periodontal osseous defects. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **2000**; 20(2).
107. **Lyford RH, Mills MP, Knapp CI, Scheyer ET, Mellonig JT.** Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **2003**; 23(5).
108. **Bolander ME, Balian G.** The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *JBJS* **1986**; 68(8):1264-1274.
109. **Schwartz Z, Mellonig J, Carnes Jr D, Fontaine JDL, Cochran D, Dean D, Boyan B.** Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *Journal of periodontology* **1996**; 67(9):918-926.
110. **Hopp SG, Dahners LE, Gilbert JA.** A study of the mechanical strength of long bone defects treated with various bone autograft substitutes: an experimental investigation in the rabbit. *Journal of Orthopaedic Research* **1989**; 7(4):579-584.
111. **Urist MR, Iwata H, Strates BS.** Bone morphogenetic protein and proteinase in the guinea pig. *Clinical orthopaedics and related research* **1972**; 85:275-290.
112. **Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunkapiller M, DeLange R.** Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**; 81(2):371-375.
113. **Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A.** Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant dentistry* **2006**; 15(2):197-207.
114. **Shigeyama Y, D'errico JA, Stone R, Somerman M.** Commercially-prepared allograft material has biological activity in vitro. *Journal of periodontology* **1995**; 66(6):478-487.
115. **Urist MR, Silverman BF, Düring K, Dubuc FL, Rosenberg JM.** 24 The Bone Induction Principle. *Clinical orthopaedics and related research* **1967**; 53:243-284.
116. **Finkemeier CG.** Bone-grafting and bone-graft substitutes. *JBJS* **2002**; 84(3):454-464.
117. **Bostrom M, Yang X, Kennan M, Sandhu H, Dicarlo E, Lane J.** An unexpected outcome during testing of commercially available demineralized bone graft materials: how safe are the nonallograft components? *Spine* **2001**; 26(13):1425-1428.
118. **Dickman CA.** Osteoinductive Demineralized Bone: What's the Risk? : LWW; 2001.
119. **Senn N.** On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *The American Journal of the Medical Sciences* **1889**; 98(3):219-247.
120. **Thaller SR, Hoyt J, Borjeson K, Dart A, Tesluk H.** Reconstruction of calvarial defects with anorganic bovine bone mineral (Bio-Oss) in a rabbit model. *Journal of Craniofacial Surgery* **1993**; 4(2):79-84.
121. **Wallace SS, Froum SJ, Tarnow DP.** Histologic evaluation of sinus elevation procedure: a clinical report. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **1996**; 16(1).

122. **McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, Buck D, Hollinger JO, Lynch SE.** Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **1999**; 14(3).
123. **Emmings FG.** Chemically modified osseous material for the restoration of bone defects. *Journal of periodontology* **1974**; 45(5):385-390.
124. **Felice P, Checchi V, Pistilli R, Scarano A, Pellegrino G, Esposito M.** Bone augmentation versus 5-mm dental implants in posterior atrophic jaws. Four-month post-loading results from a randomised controlled clinical trial. *Eur J Oral Implantol* **2009**; 2(4):267-281.
125. **Guillemin G, Patat JL, Fournie J, Chetail M.** The use of coral as a bone graft substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **1987**; 21(5):557-567.
126. **Yukna RA.** Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. *Journal of periodontology* **1994**; 65(2):177-185.
127. **Piattelli A, Podda G, Scarano A.** Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. *Biomaterials* **1997**; 18(8):623-627.
128. **Hench LL.** Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **1998**; 41(4):511-518.
129. **Hislop W, Finlay P, Moos K.** A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **1993**; 31(3):149-153.
130. **Tamimi F, Sheikh Z, Barralet J.** Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. *Acta biomaterialia* **2012**; 8(2):474-487.
131. **Strub J, Gaberthüel T, Firestone AR.** Comparison of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. *Journal of periodontology* **1979**; 50(12):624-629.
132. **Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK.** Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *Journal of oral and maxillofacial surgery* **1996**; 54(4):420-432.
133. **Ronda M, Rebaudi A, Torelli L, Stacchi C.** Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. *Clinical oral implants research* **2014**; 25(7):859-866.
134. **Shalash MA, Rahman HA, Azim AA, Neemat AH, Hawary HE, Nasry SA.** Evaluation of horizontal ridge augmentation using beta tricalcium phosphate and demineralized bone matrix: a comparative study. *Journal of clinical and experimental dentistry* **2013**; 5(5):e253.
135. **Klein C, Driessen A, De Groot K, Van Den Hooff A.** Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **1983**; 17(5):769-784.
136. **Wagner JR.** Clinical and histological case study using resorbable hydroxylapatite for the repair of osseous defects prior to endosseous implant surgery. *J Oral Implantol* **1989**; 15(186):92.
137. **Ricci JL, Blumenthal NC, Spivak J, Alexander H.** Evaluation of a low-temperature calcium phosphate particulate implant material: Physical-chemical properties and in vivo bone response. *Journal of oral and maxillofacial surgery* **1992**; 50(9):969-978.
138. **Frame J.** A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of oral surgery (American Dental Association: 1965)* **1980**; 38(3):176-180.
139. **Figliuzzi M, Mangano FG, Fortunato L, De Fazio R, Macchi A, Iezzi G, Piattelli A, Mangano C.** Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with custom-made, computer-aided design/computer-aided manufacturing porous hydroxyapatite scaffolds. *Journal of Craniofacial Surgery* **2013**; 24(3):856-859.
140. **Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley G, Senarath-Yapa K, Zielins E, Paik K, Longaker M, Wan D.** Biomaterials for craniofacial bone engineering. *Journal of dental research* **2014**; 93(12):1187-1195.

141. **Wan DC, Nacamuli RP, Longaker MT.** Craniofacial bone tissue engineering. *Dental Clinics* **2006**; 50(2):175-190.
142. **Schepers E, Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R.** Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *Journal of oral rehabilitation* **1991**; 18(5):439-452.
143. **MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P.** In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. *Journal of Clinical Periodontology* **1999**; 26(4):239-245.
144. **Froum S, Cho S-C, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D.** Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *Journal of periodontology* **2002**; 73(1):94-102.
145. **Maria SM, Prukner C, Sheikh Z, Mueller F, Barralet J, Komarova SV.** Reproducible quantification of osteoclastic activity: characterization of a biomimetic calcium phosphate assay. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2014**; 102(5):903-912.
146. **Tamimi F, Torres J, Bassett D, Barralet J, Cabarcos EL.** Resorption of monetite granules in alveolar bone defects in human patients. *Biomaterials* **2010**; 31(10):2762-2769.
147. **Gehrke S, Famà G.** Buccal dehiscence and sinus lift cases—predictable bone augmentation with synthetic bone material. *Implants* **2010**; 11:4.
148. **Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ.** Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss® and a novel β -TCP/DCPD granulate. *Journal of clinical periodontology* **2006**; 33(12):922-928.
149. **Tamimi F, Torres J, Kathan C, Baca R, Clemente C, Blanco L, Cabarcos EL.** Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules. *Journal of biomedical materials research Part A* **2008**; 87(4):980-985.
150. **SARAL Ö, KOLAYLI S.** ARI ÜRÜNLERİNİN KARACİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ ROLÜ NEDİR? *ULUDAĞ ARICILIK DERGİSİ/ULUDAG BEE JOURNAL*:147.
151. **Mărghitaş L.** Produsele apicole și principalele lor însușiri terapeutice. *Albinele și produsele lor LA Mărghitaş*, 2nd ed, Ceres, Bucharest, Romania **2008**:280-378.
152. **Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, Almeida-Muradian L.** Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* **2009**; 1(1):1-6.
153. **Bogdanov S.** Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. *Lipids* **2011**; 3(8):8-19.
154. **Sahinler N.** Ari Ürünleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* **2000**; 5(1-2):139-148.
155. **LEE A-L, YEH M-I, WEN H-M, CHERN J-C, LIN J, HWANG W-I.** The application of capillary electrophoresis on the characterization of protein in royal jelly. *Journal of Food and Drug Analysis* **1999**; 7(1).
156. **Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M.** Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2011**; 2011.
157. **Lercker G, Caboni M, Vecchi M, Sabatini A, Nanetti A.** Caratterizzazione dei principali costituenti della gelatina reale. *Apicoltura* **1993**; 8(8):27-37.
158. **Caboni M, Sabatini A, Lercker G.** La gelatina reale: origine, proprietà e composizione. *Apoidea* **2004**(21):72-79.
159. **Serra Bonvehi J.** Sugars, acidity and pH of royal jelly. **1992**.
160. **Stocker A, Schramel P, Kettrup A, Bengsch E.** Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2005**; 19(2):183-189.
161. **Schmidt J, Buchmann S.** Other products of the hive. *The Hive and the Honey Bee*, Hamilton, Illinois **1992**:928-977.

162. **Nagai T.** Properties and functions on gluconic acid and its salts. *Honeybee Science-Tamagawa University (Japan)* **2001**.
163. **Kim J, Son J, Oh H.** Analysis of organic acids in honey and royal jelly. *Korean Journal of Apiculture (Korea Republic)* **1989**.
164. **Schmitzova J, Klaudiny J, Albert Š, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, Judova J, Šimúth J.** A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **1998**; 54(9):1020-1030.
165. **Šimúth J.** Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie* **2001**; 32(1):69-80.
166. **Okamoto I, Taniguchi Y, Kunikata T, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M.** Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sciences* **2003**; 73(16):2029-2045.
167. **Miyamoto M, Tsumura K, Kimura M, Okihara S, Sugimoto H, Yamada H, Kimura Y.** N-glycans bearing beta-1, 3-galactosyl residue in royal jelly glycoproteins. 2004. OXFORD UNIV PRESS INC JOURNALS DEPT, 2001 EVANS RD, CARY, NC 27513 USA. p 1122-1122.
168. **Matsui T, Yukiyoishi A, Doi S, Ishikawa H, Matsumoto K.** Enzymatic hydrolysis of ethanol-insoluble proteins from royal jelly and identification of ACE inhibitory peptides. *JOURNAL OF THE JAPANESE SOCIETY FOR FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI* **2006**; 53(4):200-206.
169. **Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S.** AMP N1-Oxide, a Unique Compound of Royal Jelly, Induces Neurite Outgrowth from PC12 Vells via Signaling by Protein Kinase A Independent of that by Mitogen-Activated Protein Kinase. *Evidence-based complementary and alternative medicine* **2010**; 7(1):63-68.
170. **Wei W, Wei M, Kang X, Deng H, Lu Z.** A novel method developed for acetylcholine detection in royal jelly by using capillary electrophoresis coupled with electrogenerated chemiluminescence based on a simple reaction. *Electrophoresis* **2009**; 30(11):1949-1952.
171. **Vitteck J, Slomiany B.** Testosterone in royal jelly. *Experientia* **1984**; 40(1):104-106.
172. **Liu J-R, Yang Y-C, Shi L-S, Peng C-C.** Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**; 56(23):11447-11452.
173. **Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E.** New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review. *Journal of dietary supplements* **2017**:1-19.
174. **Mateescu C.** Apiterapia sau cum să folosim produsele stupului pentru sănătate: Fiat Lux. **2005**.
175. **Hashimoto M, Kanda M, Ikeno K, HAYASHI Y, NAKAMURA T, OGAWA Y, FUKUMITSU H, NOMOTO H, FURUKAWA S.** Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2005**; 69(4):800-805.
176. **Hattori N, Ohta S, Sakamoto T, Mishima S, Furukawa S.** Royal jelly facilitates restoration of the cognitive ability in trimethyltin-intoxicated mice. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* **2009**; 2011:26.
177. **Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S.** Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. *Biomedical research* **2007**; 28(5):261-266.
178. **Batchelder T.** A novel mechanism of liver enhancement from a Traditional bee product.(Medical Anthropology). *Townsend Letter for Doctors and Patients* **2002**:46-49.
179. **O'Connor KJ, Baxter D.** The demonstration of insulin-like material in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **1985**; 81(3):755-760.

180. **Pizzorno JE, Murray MT, Joiner-Bey H.** The Clinician's Handbook of Natural Medicine E-Book: Elsevier Health Sciences. **2016**.
181. **Vittekk J.** Effect of royal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1995**; 51(9):927-935.
182. **Münstedt K, Bargello M, Hauenschild A.** Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects. *Journal of Medicinal food* **2009**; 12(5):1170-1172.
183. **Kamakura M, Mitani N, Fukuda T, Fukushima M.** Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice. *Journal of nutritional science and vitaminology* **2001**; 47(6):394-401.
184. **Abou-Hozafa BM, Badr El-Din N.** Royal jelly, a possible agent to reduce the nicotine-induced atherogenic lipoprotein profile. *Saudi medical journal* **1995**; 16(4):337-342.
185. **El-Nekeety AA, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra HA, Abdel-Wahhab MA.** Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon* **2007**; 50(2):256-269.
186. **Takaki-Doi S, Hashimoto K, Yamamura M, Kamei C.** Antihypertensive activities of royal jelly protein hydrolysate and its fractions in spontaneously hypertensive rats. *Acta Med Okayama* **2009**; 63.
187. **Tokunaga K-h, Yoshida C, Suzuki K-m, Maruyama H, Futamura Y, Araki Y, Mishima S.** Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2004**; 27(2):189-192.
188. **Librowski T, Czarnecki R.** Comparative analysis of Apistmul Crataegi Forte and royal jelly in the experimental heart action disturbance. *Herba Pol* **2000**; 46(3):145-150.
189. **Izuta H, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H.** 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine* **2009**; 6(4):489-494.
190. **Simuth J, Bilikova K.** Potential contribution of royal jelly proteins for health. *Honeybee Science-Tamagawa University (Japan)* **2004**.
191. **Bincoletto C, Eberlin S, Figueiredo CA, Luengo MB, Queiroz ML.** Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *International immunopharmacology* **2005**; 5(4):679-688.
192. **Nakaya M, Onda H, Sasaki K, Yukiyoishi A, Tachibana H, Yamada K.** Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2007**; 71(1):253-255.
193. **Salazar-Olivo LA, Paz-Gonzalez V.** Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2005**; 19(5):645-651.
194. **Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K.** A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of biological chemistry* **1990**; 265(19):11333-11337.
195. **Sauerwald NP, J.; Bengsch, E.; Niessen L. and Vogel R.F.** Combine antibacterial and antifungal properties of water soluble fraction of royal jelly. **1998**; *Adv.Food Sci.*; 52-56.
196. **Boukraa L, Niar A, Benbarek H, Benhanifia M.** Additive action of royal jelly and honey against *Staphylococcus aureus*. *J Med Food* **2008**; 11(1):190-192.
197. **Abdelatif M, Yakoot M, Etmaan M.** Safety and efficacy of a new honey ointment on diabetic foot ulcers: a prospective pilot study. *Journal of wound care* **2008**; 17(3):108-110.
198. **Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M.** Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**; 68(1):138-145.

199. **Fujii A, Kobayashi S, Kuboyama N, Furukawa Y, Kaneko Y, Ishihama S, Yamamoto H, Tamura T.** Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. *Japanese journal of pharmacology* **1990**; 53(3):331-337.
200. **Koya-Miyata S, Okamoto I, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M.** Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism. *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**; 68(4):767-773.
201. **Suamaru K, Cui R, Li B, Watanabe S, Okihara K, Hashimoto K, Yamada H, Araki H.** Topical application of royal jelly has a healing effect for 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamsters. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* **2008**; 30(2):103-106.
202. **Vucevic D, Melliou E, Vasilijic S, Gasic S, Ivanovski P, Chinou I, Colic M.** Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *International immunopharmacology* **2007**; 7(9):1211-1220.
203. **Gasic S, Vucevic D, Vasilijic S, Antunovic M, Chinou I, Colic M.** Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **2007**; 29(3-4):521-536.
204. **D.R. KNVKSMPSPGAGBAGIVCaK.** Effect of royal jelly as immunomodulator in chicks. *Journal of Immunology & Immunopathology* (**2000**; 2 (1/2),:84-87.
205. **Al-Mufarrej S, El-Sarag M.** Effects of royal jelly on the humoral antibody response and blood chemistry of chickens. *Journal of Applied Animal Research* **1997**; 12(1):41-47.
206. **Mannoor MK, Shimabukuro I, Tsukamotoa M, Watanabe H, Yamaguchi K, Sato Y.** Honeybee royal jelly inhibits autoimmunity in SLE-prone NZB x NZW F1 mice. *Lupus* **2009**; 18(1):44-52.
207. **Taniguchi Y, Kohno K, Inoue S, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M.** Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *International immunopharmacology* **2003**; 3(9):1313-1324.
208. **R. L.** The Infertility Cure: The Ancient Chinese Wellness Program for Getting Pregnant and Having Healthy Babies, ed. Little, Brown and Company. **2005**.
209. **Suzuki K-M, Isohama Y, Maruyama H, Yamada Y, Narita Y, Ohta S, Araki Y, Miyata T, Mishima S.** Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evidence-based complementary and alternative medicine* **2008**; 5(3):295-302.
210. **Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, Miyata T.** Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *Journal of ethnopharmacology* **2005**; 101(1-3):215-220.
211. **Husein MQ, Haddad SG.** A new approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin. *Animal reproduction science* **2006**; 93(1-2):24-33.
212. **Kridli RT, Al-Khetib SS.** Reproductive responses in ewes treated with eCG or increasing doses of royal jelly. *Animal reproduction science* **2006**; 92(1-2):75-85.
213. **Balch PAaB, J.F.** Prescription for Nutritional Healing. Avery, New York **2000**; third ed.,.
214. **Schmitz JP, Hollinger JO.** The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* **1986**(205):299-308.
215. **Carvalho PP, Leonor IB, Smith BJ, Dias IR, Reis RL, Gimble JM, Gomes ME.** Undifferentiated human adipose-derived stromal/stem cells loaded onto wet-spun starch-polycaprolactone scaffolds enhance bone regeneration: nude mice calvarial defect in vivo study. *Journal of biomedical materials research Part A* **2014**; 102(9):3102-3111.
216. **Li L, Zhou G, Wang Y, Yang G, Ding S, Zhou S.** Controlled dual delivery of BMP-2 and dexamethasone by nanoparticle-embedded electrospun nanofibers for the efficient repair of critical-sized rat calvarial defect. *Biomaterials* **2015**; 37:218-229.

217. **Lam CX, Hutmacher DW, Schantz JT, Woodruff MA, Teoh SH.** Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *Journal of biomedical materials research Part A* **2009**; 90(3):906-919.
218. **Haberstroh K, Ritter K, Kuschnierz J, Bormann KH, Kaps C, Carvalho C, Mulhaupt R, Sittinger M, Gellrich NC.** Bone repair by cell-seeded 3D-bioploted composite scaffolds made of collagen treated tricalciumphosphate or tricalciumphosphate-chitosan-collagen hydrogel or PLGA in ovine critical-sized calvarial defects. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* **2010**; 93(2):520-530.
219. **Font K.** Comparison of Demineralized Dentin and Demineralized Freeze Dried Bone as Carriers for Enamel Matrix Proteins in a Rat Critical Size Defect: AIR FORCE INST OF TECH WRIGHT-PATTERSONAFB OH; 2005.
220. **Ozan F, Corekci B, Toptas O, Halicioglu K, Irgin C, Yilmaz F, Hezenci Y.** Effect of Royal Jelly on new bone formation in rapid maxillary expansion in rats. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* **2015**; 20(6):e651-656.
221. **Allen HL, Wase A, Bear W.** Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **1980**; 51(1-6):595-600.
222. **Haddad AJ, Peel SA, Clokie CM, Sandor GK.** Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. *The Journal of craniofacial surgery* **2006**; 17(5):926-934.
223. **Burchardt H.** The biology of bone graft repair. *Clinical orthopaedics and related research* **1983**; 174:28-34.
224. **Marx RE.** Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clinics in plastic surgery* **1994**; 21(3):377-392.
225. **Muschler GF, Lane JM, Dawson EG.** The biology of spinal fusion. *Spinal Fusion*: Springer. 1990:9-21.
226. **Khan SN, Bostrom MP, Lane JM.** Bone growth factors. *Orthopedic Clinics* **2000**; 31(3):375-387.
227. **Kainulainen VT, Sándor GK, Carmichael RP, Oikarinen KS.** Safety of zygomatic bone harvesting: a prospective study of 32 consecutive patients with simultaneous zygomatic bone grafting and 1-stage implant placement. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **2005**; 20(2).
228. **Lane JM, Yasko AW, Tomin E, Cole BJ, Waller S, Browne M, Turek T, Gross J.** Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clinical orthopaedics and related research* **1999**; 361:216-227.
229. **Durak K, Bilgen ÖF, Kaleli T, Tuncel P, Özbek R, Turan K.** Antioxidant effect of α -tocopherol on fracture haematoma in rabbits. *Journal of International Medical Research* **1996**; 24(5):419-424.
230. **Gokturk E.** Sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine etkisi. **2004**.
231. **Kara MI, Altan AB, Sezer U, Erdoğan MŞ, Inan S, Ozkut M, Nalcacı R.** Effects of Ginkgo biloba on experimental rapid maxillary expansion model: a histomorphometric study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* **2012**; 114(6):712-718.
232. **Guo H, Ekusa A, Iwai K, Yonekura M, Takahata Y, Morimatsu F.** Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Journal of nutritional science and vitaminology* **2008**; 54(3):191-195.
233. **Egermann M, Goldhahn J, Schneider E.** Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis international* **2005**; 16(2):S129-S138.

234. **Medrado AR, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA.** Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers in surgery and medicine* **2003**; 32(3):239-244.
235. **Henmi A, Nakamura M, Echigo S, Sasano Y.** Involvement of sensory neurons in bone defect repair in rats. *Journal of electron microscopy* **2011**; 60(6):393-400.
236. **Schmitz JP, Hollinger JO.** The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research* **1986**(205):299-308.
237. **Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ.** The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *The Journal of bone and joint surgery American volume* **1984**; 66(2):274-279.
238. **Schmitz JP, Hollinger JO.** Determination of Critical Size Defects in the Mandibles and Calvaria of Mongrel Dogs and Cynomolgus Monkeys: ARMY INST OF DENTAL RESEARCH WASHINGTON DC; **1987**.
239. **Hollinger JO, Kleinschmidt JC.** The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery* **1990**; 1(1):60-68.
240. **Mulliken JB, Glowacki J.** Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plastic and reconstructive surgery* **1980**; 65(5):553-559.
241. **Rapp SJ, Jones DC, Gerety P, Taylor JA.** Repairing critical-sized rat calvarial defects with progenitor cell-seeded acellular periosteum: A novel biomimetic scaffold. *Surgery* **2012**; 152(4):595-605. e591.
242. **Chalmers J, Gray D, Rush J.** Observations on the induction of bone in soft tissues. *Bone & Joint Journal* **1975**; 57(1):36-45.
243. **Mardas N, Kostopoulos L, Stavropoulos A, Karring T.** Osteogenesis by guided tissue regeneration and demineralized bone matrix. *Journal of clinical periodontology* **2003**; 30(3):176-183.
244. **Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF.** The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics* **1995**; 18(12):1153-1158.
245. **Petrovich YA, Podorozhnaya R, Kichenko S, Kozlova M.** Effects of selenium-containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. *Bulletin of experimental biology and medicine* **2004**; 137(1):74-77.
246. **Norazlina M, Ima-Nirwana S, Gapor M, Khalid B.** Tocotrienols are needed for normal bone calcification in growing female rats. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* **2002**; 11(3):194-199.
247. **Garrett IR, Boyce BF, Oreffo R, Bonewald L, Poser J, Mundy GR.** Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation* **1990**; 85(3):632-639.
248. **Freeman BA, Crapo JD.** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **1982**; 47(5):412-426.
249. **Schmidley J.** Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* **1990**; 21(7):1086-1090.
250. **Nylander G, Otamiri T, Lewis D, Larsson J.** Lipid peroxidation products in postischemic skeletal muscle and after treatment with hyperbaric oxygen. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* **1989**; 23(2):97-103.
251. **Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T.** The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery* **1987**; 101(6):746-752.
252. **Seyama A.** The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Surgery today* **1993**; 23(12):1060-1067.

253. **Bulkley GB.** The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* **1983**; 94(3):407-411.
254. **Oda T, Nakai I, Mituo M, Yamagishi H, Oka T, Yoshikawa T.** Role of oxygen radicals and synergistic effect of superoxide dismutase and catalase on ischemia-reperfusion injury of the rat pancreas. **1992.** Elsevier. p 797-798.
255. **Rangan U, Bulkley G.** Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *British medical bulletin* **1993**; 49(3):700-718.
256. **Göktürk E, Turgut A, Baygu C, Gunal I, Seber S, Gulbas Z.** Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **1995**; 66(5):473-475.
257. **Turgut A, Göktürk E, Köse N, Kagmaz M, Oztiirk HS, Seber S, Acar S.** Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **1999**; 70(5):487-490.
258. **Yeler H, Tahtabas F, Candan F.** Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell biochemistry and function* **2005**; 23(2):137-139.
259. **Simmons DJ.** Fracture healing perspectives. *Clinical orthopaedics and related research* **1985**; 200:100-113.
260. **Cornell CN, Lane JM.** Newest factors in fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research* **1992**; 277:297-311.
261. **Turk C, Halici M, Guney A, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S.** Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. *Journal of International Medical Research* **2004**; 32(5):507-512.
262. **Ima-Nirwana S, Kiftiah A, Sariza T, Gapor MA, Khalid B.** Palm vitamin E improves bone metabolism and survival rate in thyrotoxic rats. *General Pharmacology: The Vascular System* **1999**; 32(5):621-626.
263. **Sergeev I, Kha K, Blazheevich N, Spirichev V.** Effect of combined vitamin D and E deficiencies on calcium metabolism and bone tissue of the rat. *Voprosy pitaniia* **1987**(1):39-43.
264. **Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL.** Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research* **2001**; 16(1):135-140.
265. **Cemek M, Aymelek F, Büyükokuroğlu ME, Karaca T, Büyükben A, Yilmaz F.** Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels. *Food and Chemical Toxicology* **2010**; 48(10):2827-2832.
266. **Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtas A.** Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology* **2009**; 74(3):545-551.
267. **Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M.** Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry* **2009**; 113(1):238-245.
268. **Watanabe S, Suemaru K, Takechi K, Kaji H, Imai K, Araki H.** Oral mucosal adhesive films containing royal jelly accelerate recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis. *Journal of pharmacological sciences* **2013**; 121(2):110-118.
269. **Çavuşoğlu K, Yapar K, Yalçın E.** Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *Journal of medicinal food* **2009**; 12(6):1286-1292.
270. **Jamnik P, Goranovič D, Raspor P.** Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. *Experimental gerontology* **2007**; 42(7):594-600.
271. **Kanbur M, Eraslan G, Beyaz L, Silici S, Liman BC, Altınordulu Ş, Atasever A.** The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* **2009**; 61(2):123-132.
272. **Abdelatif M, Yakoot M, Etmaan M.** Safety and efficacy of a new honey ointment on diabetic foot ulcers: a prospective pilot study. *Journal of wound care* **2008**; 17(3).

273. **Bărnuțiu LI, Mărghițaș LA, Dezmirean DS, Mihai CM, Bobiș O.** Chemical composition and antimicrobial activity of Royal Jelly-REVIEW. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* **2011**; 44(2):67-72.
274. **FUJII A, KOBAYASHI S, KUBOYAMA N, FURUKAWA Y, KANEKO Y, ISHIHAMA S, YAMAMOTO H, TAMURA T.** Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. *The Japanese Journal of Pharmacology* **1990**; 53(3):331-337.
275. **Siavash M, Shokri S, Haghighi S, Mohammadi M, Shahtalebi MA, Farajzadehgan Z.** The efficacy of topical Royal Jelly on diabetic foot ulcers healing: A case series. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* **2011**; 16(7):904.
276. **TEMAMOĞULLARI FK, ARAL F, DEMİRKOL R.** Erkek Farelerde Arı Sütünün Uzun Süreli Uygulanmasının Bazı Spermatolojik Özellikler Üzerine Etkisi. *FÜ Sağ Bil Derg* **2006**; 20(5):341-344.
277. **Korkmaz A, Öztürk C.** Arı Sütü. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Samsun İl Tarım Müdürlüğü, Çiftçi Eğitimi ve Yayın Şubesi Yayınları* **2010**.
278. **Kaftanoglu O, Tanyeli A.** The use of royal jelly during treatment of childhood malignancies. *Bee Products: Springer*. 1997:179-183.
279. **Woerle HJ, Neumann C, Zschau S, Tenner S, Irsigler A, Schirra J, Gerich JE, Göke B.** Impact of fasting and postprandial glycemia on overall glycemic control in type 2 diabetes: importance of postprandial glycemia to achieve target HbA1c levels. *Diabetes research and clinical practice* **2007**; 77(2):280-285.
280. **ÖB E.** Kemoterapi alan yetişkin hastalarda arı sütü ile yapılan ağız bakımının mukozit derecelerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum* **2012**.
281. **Kazancıoğlu HO, Bereket MC, Ezirganlı S, Aydın MS, Aksakalli S.** Effects of caffeic acid phenethyl ester on wound healing in calvarial defects. *Acta Odontologica Scandinavica* **2015**; 73(1):21-27.
282. **Uçan M, Koparal M, Ağaçayak S, Gunay A, Ozgoz M, Atilgan S, Yaman F.** Influence of caffeic acid phenethyl ester on bone healing in a rat model. *Journal of International Medical Research* **2013**; 41(5):1648-1654.
283. **Sricholpech M, Srisupabh D.** Royal jelly promotes the viability and proliferation of periodontal ligament fibroblasts in an In Vitro tooth avulsion simulation. *M Dent J* **2015**; 35:47-56.
284. **Brown S, Kramers P.** Indirect (secondary) bone healing. *Disease Mechanisms in Small Animal Surgery Second Edition M Joseph Bojrab Philadelphia, London, Lea & Febiger* **1993**:671-677.
285. **Hulse D, Hyman B.** Fracture biology and biomechanics. *Textbook of small animal surgery* **1993**; 2:1785-1792.
286. **Johnson AL, Eurell J, Losonsky J, Egger E.** Biomechanics and biology of fracture healing with external skeletal fixation. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* **1998**; 20(4):487-489.
287. **Özan F, Çörekçi B, Toptaş O, Halicioğlu K, Irgin C, Yılmaz F, Hezenci Y.** Effect of Royal Jelly on new bone formation in rapid maxillary expansion in rats. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* **2015**; 20(6):e651.
288. **Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K.** Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Archives of oral biology* **2012**; 57(11):1545-1550.
289. **Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K.** A comparative evaluation of the systemic and local alendronate treatment in synthetic bone graft: a histologic and histomorphometric study in a rat calvarial defect model. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* **2012**; 114(5):S146-S152.

290. **Turhan E, Akça MK, Bayar A, Songür M, Keser S, Doral MN.** A comparison of the effects of platelet-rich plasma and demineralized bone matrix on critical bone defects: An experimental study on rats. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery* **2017**; 23(2):91-99.
291. **Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA.** New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury* **2007**; 38(1):S49-S62.
292. **Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P.** Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* **2007**; 38(1):S11-S25.
293. **Augustin G, Antabak A, Davila S.** RETRACTED: The periosteum: Part 1: Anatomy, histology and molecular biology. *Injury* **2007**; 38(10):1115-1130.
294. **Gerber H-P, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N.** VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature medicine* **1999**; 5(6):623.
295. **Wang YQ, Luk JM, Chu AC, Ikeda K, Man K, Kaneda K, Fan ST.** TNP-470 blockage of VEGF synthesis is dependent on MAPK/COX-2 signaling pathway in PDGF-BB-activated hepatic stellate cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2006**; 341(1):239-244.
296. **Hofbauer LC, Heufelder AE.** The role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2000**; 85(7):2355-2363.
297. **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Mochizuki S-I, Tsuda E, Morinaga T, Udagawa N.** A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* **1999**; 25(1):109-113.
298. **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S-i, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A.** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**; 95(7):3597-3602.
299. **Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL.** The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* **2000**; 141(12):4768-4776.
300. **McClung M.** Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis research & therapy* **2007**; 9(1):S3.
301. **Nobre MDP, Fernandes RG, Chin CM, Faig-Leite H.** Local action of sodium alendronate in bone repair of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Arquivos brasileiros de cardiologia* **2008**; 90(4):261-268.

8. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 83

30/12/2016

Konu : Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Ratlarda Lokal ve Sistemik Arı Sütü ile Birlikte Demineralize Kemik Grefti Uygulamalarının Kalvaryal Kemik Defekti İyileşmesi Üzerine etkisinin İncelenmesi.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Doç.Dr.Orçun TOPTAŞ
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Arş.Gör.Sinan BULUT, Prof.Dr.Aysel KÜKNER, Yük.Lis.Öğr.Cemre BALCI
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi.

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2016/48	Tarih (Date): 14.12.2016
	Doç.Dr.Orçun TOPTAŞ'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Aysel KÜKNER (Başkan)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	Galsınaya dahil
Prof. Dr. Erol AYAZ (Üye)	Tıbbi Parazitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	İzinli
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	İzinli
Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL (Invivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	İzinli
Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye)	Beyin Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	İzinli
Doç. Dr. Fatih ULAŞ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	İzinli
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	İzinli
Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diş Hek. Fakültesi	Calsınaya dahil
Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye)	İlköğretim Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	İzinli
Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHİLİ (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	İzinli
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	İzinli
Yrd.Doç.Dr.Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	İzinli
Vet. Hek. Aytan ÇETİNKAYA (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	İzinli
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLCA Hindi /BOLU	İzinli
Av. Cihan KARAGÖZ (Sivil Toplum Kuruluşu üyesi)	Avukat	Tabaklar Mahallesi Hürriyet cad.No.47/7Merkez/ BOLU	İzinli

9. ÖZGEÇMİŞ

Sinan BULUT 01.01.1989 tarihinde Bolu’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bolu Köroğlu İlköğretim Okulu’nda, lise eğitimini Bolu Atatürk Lisesi’nde tamamladı. Üniversite eğitimini 2007-2012 yılları arasında Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde aldı. 2013 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak uzmanlık eğitimine başladı. Halen aynı bölümde uzmanlık eğitimine devam etmektedir.