

## Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2022;15(1):88-99

doi: 10.26559/mersinsbd.898835

### Alloplastik kemik grefti uygulanmış sıçan kalvarial kemik defekt modelinde rosmarinik asidin terapötik etkileri

 Büşra Deveci<sup>1</sup>,  Ahmet Dağ<sup>1</sup>,  Ela Tunes Kadiroğlu<sup>1</sup>,  Fırat Aşır<sup>2</sup>,  Ebru Gökalp Özkorkmaz<sup>2</sup>,  Engin Deveci<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dicle Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

<sup>2</sup>Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

#### Öz

**Amaç:** Travma, neoplazmalar, enfeksiyonlar ve doğuştan anomaliler gibi pek çok neden, kalvaryal kemik kusurlarına neden olabilir. Kranial bölgedeki kemik kusurlarını gidermek ve kemik yenilenmesini uyarmak için çeşitli greft tipleri denenmiş ve tedavi yöntemleri araştırılmıştır. Çalışmamızda Rosmarinik asidin (RA) greft materyali uygulanmış sıçan kalvaryal kemik defekt modeli üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** Çalışmada Wistar erkek sıçanlar (n=32) 4'e bölündü; kontrol olarak defekt grubu (n=8), defekt+RA uygulamalı grup (n=8), defekt+greft (n=8), defekt+greft+RA uygulamalı grup (n=8). Anestezi altında frontal kemik açılarak ve periosteal elevatör ile periosteal flep çıkarıldı ve orta hatta dairesel tam kalınlıkta kemik defekti (5 mm) oluşturuldu. Grup 2 ve 3'te defekt bölgesine allogreft materyal yerleştirildi, doku dikilerek kapatıldı. RA (100mg/kg) oral yolla 7 gün süre ile uygulandı. 28 gün sonra tüm hayvanlar sakrifiye edildi ve kalvaryal kemikler çıkarıldı, %10'luk formalin ile tespit edildikten sonra, %5'lik EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) ile dekalsifiye edildi, rutin histolojik preparasyondan sonra 4-6 µm kalınlığında kesitler kesildi ve Hematoksilen Eosin ile boyandı. BMP-2 (Bone morphogenetic proteins) kemik morfogenetik proteinleri immunohistokimyasal olarak işaretlendi ve ışık mikroskobu altında incelendi. Kan örneklerinden alkalen fosfataz (ALP), kreatin kinaz (KK), total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) parametreleri çalışıldı. **Bulgular:** TAS değeri defekt+greft+RA grubunda defekt grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05). OSI değeri defekt+greft+RA grubunda defekt grubuna göre anlamlı olarak düşüktür. Greft alanı içinde inflamatuvar hücrelerin az sayıda soliter olarak dağıldığı, kan damarlarında dilatasyon ve konjesyonun azaldığı tespit edildi. Ana kemik bölgesine yakın kemik tarbüküllerin genişlediği osteoblastik aktivitenin belirginleştiği matriks yapısının olgunlaştığı ve osteositlerin laküna içinde yerleştiği görüldü. **Sonuç:** Sonuç olarak, RA+Greft uygulaması ile kalvaryal defekt modelinde osteoblastik aktiviteyi indükleyerek osteosit oluşumuna ve yeni kemik gelişimine neden olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kalvaryal defekt, rosmarinik asit, immünohistokimya, BMP, sıçan

**Yazının geliş tarihi:** 18.03.2021

**Yazının kabul tarihi:** 09.11.2021

**Sorumlu Yazar:** Büşra Deveci, Dicle Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye, Tel: 05377989098, e-posta: b.deveci1992@gmail.com

**Not:** Bu araştırma Dt. Büşra DEVECİ'nin doktora tezinin bir parçasıdır.

## Therapeutic effects of rosmarinic acid in alloplastic bone graft applied rat calvarial bone defect model

### Abstract

**Aim:** Many reasons such as trauma, neoplasms, infections, and congenital anomalies can cause calvarial bone defects. Various graft types have been tried and also treatment methods have been investigated in order to eliminate bone defects in the cranial region and to stimulate bone regeneration. In our study, we aimed to investigate the effects of Rosmarinic acid (RA) on the rat calvarial bone defect model with graft material. **Method:** Wistar male rats (n=32) were divided into 4 in the study; defect group as control (n=8), defect + RA treated (n=8), defect + graft (n=8), defect+graft+RA group (n=8). Under anesthesia, the frontal bone was opened and the periosteal flap was removed using a periosteal lever, and a circular full-thickness bone defect (5 mm) was created in the midline. In groups 2 and 3, allograft material was placed in the defect area, the tissue was sutured and closed. RA (100mg/kg) was administered orally for 7 days. After 28 days, all animals were sacrificed and calvarial bones were removed, fixed with 10% formalin, decalcified with 5% Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), cut sections 4-6 µm thick after routine histological preparation and stained with Hematoxylin and eosin (HE). Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) was immunohistochemically labeled and examined under a light microscope. Alkaline phosphatase (ALP), creatine kinase (KK), total antioxidant level (TAS), total oxidant level (TOS) and oxidative stress index (OSI) parameters were studied from blood samples. **Results:** TAS value was found to be significantly higher in the defect + graft+RA group compared to the defect group ( $p<0.05$ ). The OSI value was significantly lower in the defect+graft+RA group compared to the defect group. It was found that inflammatory cells were scattered in a small number of solitary forms within the graft area, and dilatation and congestion in blood vessels were decreased. It was observed that the bone trabecules near the main bone area were enlarged, the matrix structure in which osteoblastic activity became evident and the osteocytes has settled in the lacunae. **Conclusion:** As a result, it was observed that with RA+Graft application, induced osteoblastic activity in the calvarial defect model, resulted in osteocyte formation and new bone development.

**Keywords:** Calvarial defect, rosmarinic acid, immunohistochemistry, BMP, rat

### Giriş

Travma, enfeksiyonlar, neoplazmalar ve konjenital anomaliler kalvaryal kemik kusurlarına neden olabilmektedir. Kemik kusurlarının onarılması önemli bir klinik problemdir. Bu amaçla kraniyal bölgedeki kemik kusurlarından kaynaklanan bozuklukların üstesinden gelmek ve kemik rejenerasyonunu uyarmak için çeşitli tedaviler uygulanmaktadır.<sup>1,2</sup> Kalvaryal defektlerin tedavisinde lazer ve ozon uygulamalarının yanısıra çeşitli kemik greftleri örneğin alloplastik greftler kullanılarak kemik kusurlarının iyileşmesi sağlanabilmektedir.<sup>3</sup> Maksillofasiyal bölgede oluşan kemik defektleri estetik ve fonksiyonel bozukluklara neden

olabileceğinden deformitelerin kemik grefti ile yeniden yapılandırılması gerekebilir. Günümüzde bu amaçla farklı greft materyalleri kullanılmaktadır. Örneğin, allogreftler kemiğe osteokondüktif güç verir ve kemik benzeri biyomekanik özelliklere sahiptir, ayrıca komplikasyonları önler<sup>4</sup>. Kemik dokusuna yerleştirilen greft materyalleri ile osteoindüktif ve osteokondüktif etkinin uyarılması sonucu yeni kemik oluşumu meydana gelmektedir<sup>5</sup>. Kalvaryal defektlerin anlaşılabilmesi için deneysel modeller kullanılmaktadır ancak, kalvaryal defekt modelinde kanama, sinir ve vasküler lezyonlar ve postoperatif ağrı dahil olmak üzere %10-40'lık bir komplikasyon oranı vardır<sup>6</sup>.

Polifenoller ve flavonoidler açısından zengin olan bitkisel kaynaklı

ekstraktlar günümüzde farklı hastalıklarda tamamlayıcı amaçla kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan Rosmarinik asit (RA) fenolik bir bileşik olup kafeik asit esteridir. Rosmarinik asit, *Rosmarinus officinalis* (biberiye), *Ocimum basilicum* (fesleğen), *Ocimum tenuiflorum* (kutsal fesleğen) ve *Melissa officinalis* (limon otu) gibi bitki türlerinde bulunur. Anti-inflamatuar, antioksidan ve nöroprotektif etkiler gösterir.<sup>7</sup> RA osteoklast prekürsör hücrelerine etki ederek osteoklast oluşumunu baskılar, osteoblastları etkileyerek kemik metabolizmasında terapötik etki gösterir dolayısıyla kemik doku fonksiyonları üzerine etkilidir<sup>8</sup>. RA ve monoterpenleri kemik erimesini önler ve kemik oluşumunu indükler, enflamasyona karşı etkilidir.<sup>9</sup>

Kemik morfojenetik proteinleri (BMP'ler), hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesinde görev yaparlar. BMP'ler dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) ailesinden, büyüme faktörüdürler<sup>10</sup>. BMP'ler, embriyonik iskelet gelişimi ve doğum sonrası kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında kemik oluşumu için gereken spesifik transkripsiyonel programları uyaran sinyalleri düzenleyerek, mezenkimal kök hücrelerin osteoblast hücrelerine farklılaşmasını sağlar<sup>11,12</sup>. Kemik morfojenetik proteinlerinin (BMP-2, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7) hem in vitro hem de in vivo osteoblast ve kondroblast farklılaşmasını indüklediği bilinmektedir.<sup>13</sup>

Bu çalışmanın amacı, kalvaryal kemik defekti modeli oluşturulmuş sıçanlarda alloplastik greft materyali ve rosmarinik asit uygulamasının yeni kemik gelişimi üzerine etkisini kemik morfojenetik proteinlerinin (BMP'lerin) immuneksprasyonu ile göstermek, oksidatif stres düzeyini ölçmek ve dolayısıyla RA ve greft uygulamasının erken kemik iyileşmesi, ve olgun kemik oluşumu üzerine etkisini anlamaktır.

## Gereç ve Yöntem

### *Etik onay ve deney prosedürü*

Tüm deneysel işlemler Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel

Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış (DÜHADEK Etik onay numarası: 2019/10) ve DÜSAM Deney Hayvanları Biriminde gerçekleştirilmiştir. Rosmarinik asit (cat # R4033-50MG, Sigma-Aldrich, İngiltere) %1'lik absolüt etanolde çözüldü. Absolüt etanolü dilue etmek için distile su kullanıldı. Daha sonra karışım filtre kağıdında süzülme ve etanol uzaklaştırıldı, deneyde kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

Deney hayvanları, 25°C ve %65 nem koşullarında 12/12 saat aydınlık karanlık döngü altında barındırıldı, suya ve pelet diyetine serbest erişim sağlandı. Çalışmada 12-14. haftalık, 250-300 gr ağırlığında Wistar Albino ratlar kullanıldı. Gruplar aşağıdaki gibi oluşturuldu:

*Grup 1 kontrol (defekt grubu, n=8):* 5 mm çapında bir kalvaryal kemik defekti oluşturuldu, defekt herhangi bir işlem yapılmadan boş bırakıldı ve yara yeri dikildi, 28 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilerek kalvaryal kemik çıkarıldı.

*Grup 2 defekt + RA uygulaması (n=8):* 5 mm çapında bir kalvaryal kemik defekti oluşturuldu, 100mg/kg Rosmarinik asit oral yolla 7 gün süre ile verildi, 28 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilerek kalvaryal kemik çıkarıldı.

*Grup 3 defekt + greft (n=8):* 5 mm çapında bir kalvaryal kemik defekti oluşturuldu, defekte allogreft uygulandı ve yara dikildi, 28 gün sonra sakrifiye edilerek, kalvaryal kemik çıkarıldı.

*Grup 4 defekt + greft + RA uygulaması (n=8):* 5 mm çapında bir kalvaryal kemik defekti oluşturuldu, defekte allogreft uygulandı, 100mg/kg Rosmarinik asit oral yolla 7 gün süre ile verildi ve 28 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilerek kalvaryal kemik çıkarıldı.

### *Anestezi ve cerrahi işlemler*

Cerrahi işlemlerden önce deney hayvanlarına 90 mg/kg intramusküler ketamin hidroklorür (Ketalar; Pfizer, Türkiye) ve 10 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye) ile genel anestezi uygulandı. Sıçanlara genel anestezi uygulandıktan sonra kalvaryal alan tıraş edildi ve denekler

sabitleme tahtasına yerleştirildi. Antisepsi sağlamak için povidon-iyot solüsyonu (Poviodex, Kimpur, Türkiye) uygulandı. Açılacak alana epinefrin (0.5ml; 1: 200.000) içeren articaine solüsyonu (Ultracain-DS hoechst Marion Roussel, Türkiye) ile lokal anestezi uygulandı. Cerrahi alan steril ameliyat örtüleri ile izole edilerek kesi hattı belirlendi. Kalvaryal alanda orta hatta 2 cm uzunluğunda insizyon yapıldı, mukoperiostellar flep çıkarıldı ve kalvaryuma ulaşıldı. Kalvarium sagittal sütürü belirlendikten sonra, sütüre eşit 5 mm dış çap /4 mm iç çap bir trapan frez ile bir kemik defekti oluşturuldu. Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra 4/0 glikolid bazlı emilebilir sütür (Vicryl, Ethicon, Brüksel, Belçika) ile periosteum, daha sonra basit bir dikiş tekniği ile 4/0 ipek sütür (Doğsan, Türkiye) ile deri dokusu dikildi ve cerrahi alan kapatıldı. Cerrahi işlemden sonra enfeksiyon kontrolü için tek doz enrofloksasin (Baytril-K® 2.5 mg / kg, IM, Bayer, Türkiye) uygulandı. Postoperatif ağrıyı önlemek için Meloksikam (Maxicam® 1 mg / kg, IM, Sanovel, Türkiye) enjekte edildi.

Alloplastik greft olarak %40-trikalsiyum fosfat ve %60 gözenekli bifazik sentetik hidroksiapatit içeren Biograft® HT (IFGL Bio Ceramics, Bengal, Hindistan) kullanıldı. Bu malzeme, 350 ila 500 µm granül boyutuna sahip osteokondüktif özellikte bir alloplastır.

#### *Histolojik inceleme*

Sıçanlardan alınan kalvaryal kemikler histopatolojik incelemeler için %10 nötr formaldehit solüsyonuna alındı, 24 saat fikse edildikten sonra % 10 formik asit + %10 sodyum sitrat solüsyonunda 15 gün dekalsifikasyon için bekletildi ve rutin histolojik doku takibi yapıldı, ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (RM2265; Leica, Almanya) ile 4-6 µm 'lik kesitler alındı ve Hematoksilen-Eosin ile boyandı, ardından Işık mikroskobu (Zeiss, Imager A2, Almanya) ile incelendi.

#### *İmmünohistokimya analizleri*

Alınan doku kesitleri, dereceli etanol serilerinden geçirilerek sonra damıtılmış su

ile yıkandı. Preparatlar dokuya zarar vermeden kurutuldu ve ardından Dakopen (Dako, Glostrup, Danimarka) ile işaretlendi. Dokudaki endojen peroksidazı inhibe etmek için 20 dakika süreyle %3 hidrojen peroksit (cat # TA-015-HP, Thermo Fisher Scientific, ABD) uygulandı. Gece boyunca BMP-2 primer antikoru (katalog no: sc-137087, Santa Cruz Biotechnology, ABD) ile + 4 °C'de inkübe edilen kesitlere Ultra V blok (TA-125-UB, Thermo Fisher Scientific, ABD) eklendi. Kesitler, 14 dakika süreyle biyotinlenmiş sekonder antikor (cat # TP-015-BN, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile yıkandı. Streptavidin peroksidaz (cat # TS-015-HR, Thermo Fisher Scientific, ABD) kesitlere uygulandı. Kromojen DAB (cat # TA-001-HCX, ThermoFischer, ABD) uygulandı ve Harris hematoksilin ile boyandı ve entellan ile kapatıldı. Kesitler Işık mikroskobu altında incelendi (Zeiss, Imager A2, Almanya).

#### *İstatistiksel analiz*

Çalışmada elde edilen veriler aritmetik ortalama ± standart sapma ve mean rank değeri olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler SPSS 22.0 programı kullanılarak yapıldı. Anazlilerde çoklu karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi olarak p<0.05 kullanıldı.

## **Bulgular**

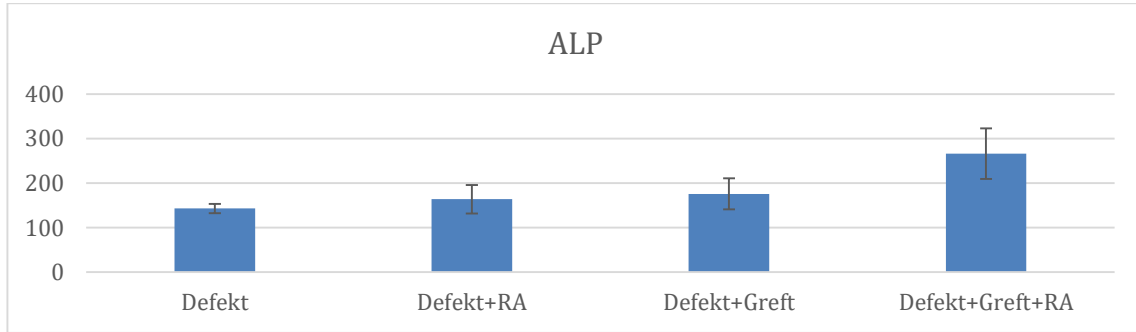
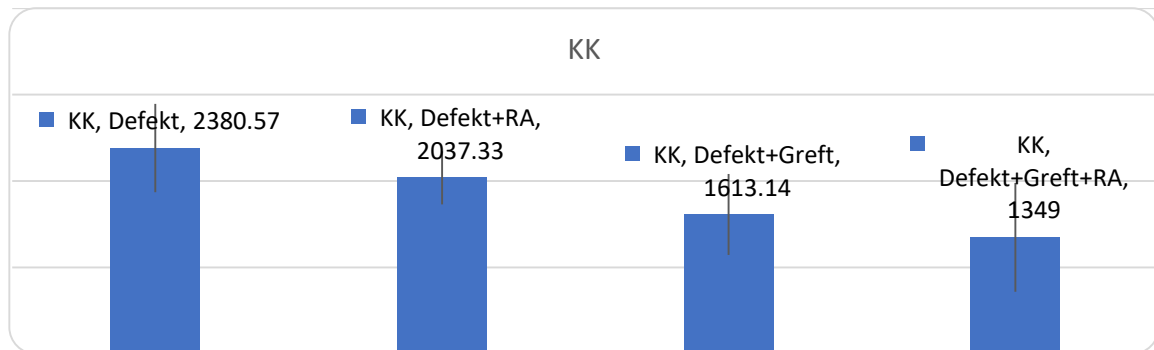
#### *İstatistik bulguları*

28 günlük ratlar üzerinde yapılan TOS açısından gruplar arasında farklılık bulunmamıştır (p>0.05). ALP değeri defekt+greft+RA grubunda defekt grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, KK değeri defekt+Graft+RA grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p<0.05). TAS değeri defekt+greft+RA grubunda defekt grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05). OSI seviyesi, defekt+greft+RA grubunda defekt grubuna göre anlamlı olarak düşüktür (Tablo 1) (p<0.05). Tablo 1'in grafik gösterimleri Grafik 1-5'te verilmiştir.

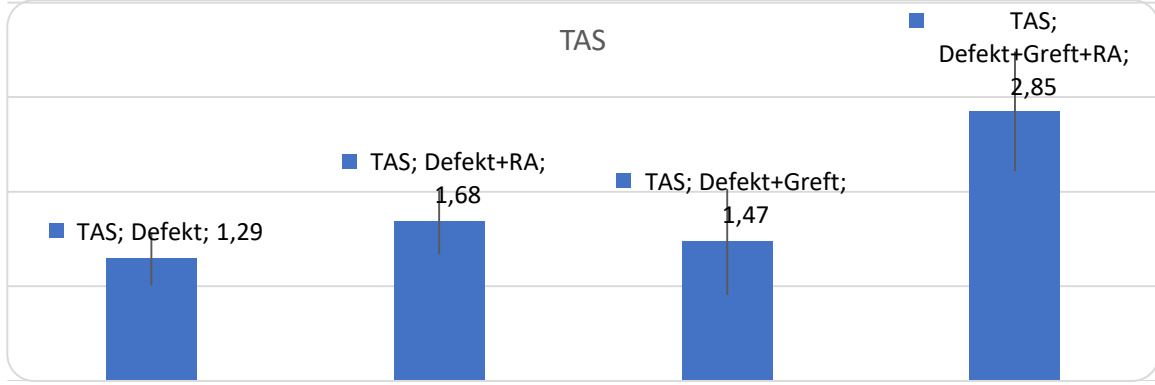
**Tablo 1.** Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel analizi

Parametre (28 gün)	Gruplar	Ort±SS	Mean Rank	Kruskal- Wallis	Mann-Whitney U (p<0.05)
ALP	(1) Defekt	143.00±10.61	7.25	X <sup>2</sup> = 20.433 p=0.001	(4)
	(2) Defekt+RA	163.85±34.88	7.13		(4)
	(3) Defekt+Graft	175.85±56.76	6.75		(4)
	(4) Defekt+Graft+RA	265.90±79.65	12.88		(1)(2)(3)
KK	(1) Defekt	2380.57±511.24	8.00	X <sup>2</sup> = 15.784 p=0.007	(3)(4)
	(2) Defekt+RA	2037.33±468.01	13.50		(4)
	(3) Defekt+Graft	1613.14±628.99	2.50		(1)
	(4) Defekt+Graft+RA	1349.00±370.42	10.00		(1)(2)
TAS	(1) Defekt	1.29±0.8	7.25	X <sup>2</sup> = 24.737 p=0.001	(4)
	(2) Defekt+RA	1.68±0.56	10.50		(4)
	(3) Defekt+Graft	1.47±0.63	10.50		(4)
	(4) Defekt+Graft+RA	2.85±0.56	5.75		(1)(2)(3)
TOS	(1) Defekt	34.13±9.77	6.25	X <sup>2</sup> = 2.591 p=0.763	
	(2) Defekt+RA	33.04±11.78	9.50		
	(3) Defekt+Graft	34.75±28.11	10.00		
	(4) Defekt+Graft+RA	30.52±16.21	8.25		
OSI (TOS/TAS)	(1) Defekt	26.81±7.78	13.13	X <sup>2</sup> = 21.560 p=0.001	(4)
	(2) Defekt+RA	22.05±10.79	10.13		(4)
	(3) Defekt+Graft	21.57±7.98	8.25		(4)
	(4) Defekt+Graft+RA	10.40±3.72	2.50		(1)(2)(4)

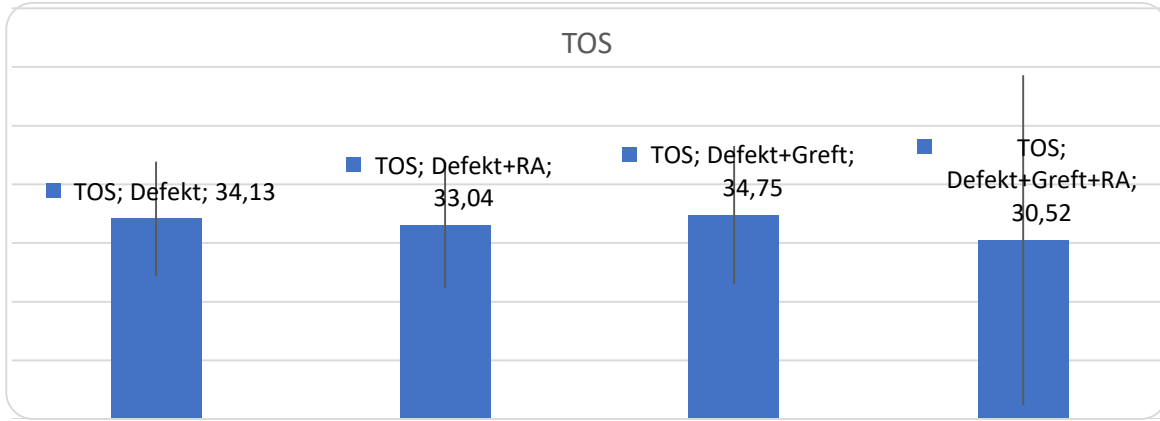
ALP: Alkalen Fosfataz; KK: Kreatin Kinaz; TAS: Total Antioksidan Seviyesi; TOS: Total Oksidan Seviyesi; OSI: Oksidatif Stres İndikatörü; RA: Rosmarinik asit; ANOVA testi uygulandı; p < 0.05 anlamlı kabul edildi.

**Grafik 1:** Gruplara göre Alkalen Fosfataz (ALP) değerleri. RA: Rosmarinik asit

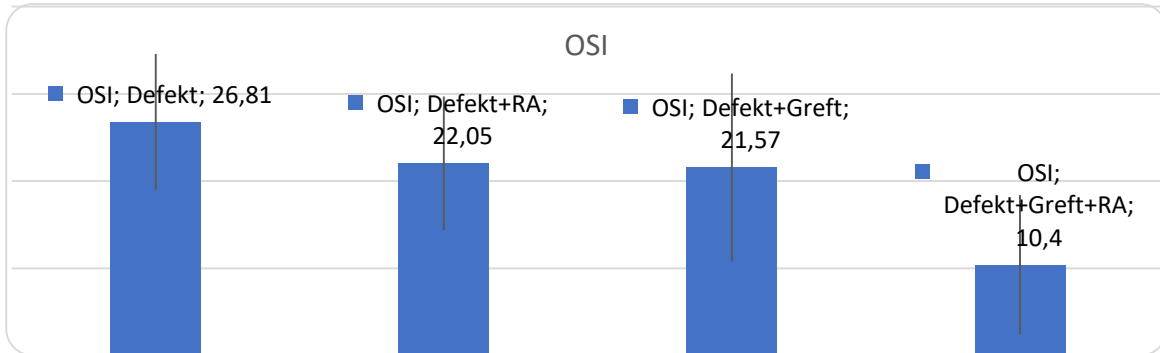
**Grafik 2:** Gruplara göre Kreatin Kinaz (KK) değerleri. RA: Rosmarinik asit



**Grafik 3:** Gruplara göre Total Antioksidan Seviyesi (TAS) değerleri. RA: Rosmarinik asit



**Grafik 4:** Gruplara göre Total Oksidan Seviyesi (TOS) değerleri. RA: Rosmarinik asit



**Grafik 5:** Gruplara göre Oksidatif Stres İndikatör (OSI) değerleri. RA: Rosmarinik asit

#### *Histopatolojik inceleme ve immünboyama sonuçları*

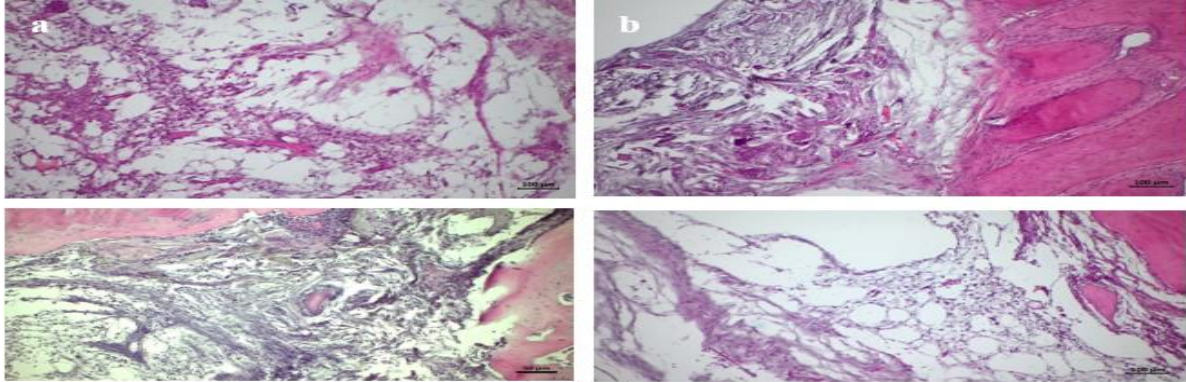
Defekt grubunda kırılan kemik trabeküllerinin bulunduğu alan içinde skar doku ile birlikte mononükleer hücre infiltrasyonunda artış, kollajen fibrillerde yer yer dejeneratif değişiklikler ve nekrotik alanlar izlendi. Defekt bölgesinde fibroblast hücrelerinde belirgin bir artış ile birlikte bazı alanlarda osteoblast hücrelerinin varlığı

ile kemik matriksinde gelişme görüldü. Defekt ve rosmarinik asit uygulama grubunda, defekt alanı içerisinde kan damarlarında belirgin bir dilatasyon ve konjesyon, damar çevresinde yoğunlaşmış inflamatuvar hücreler görüldü. Bu bölgenin dışında kalan yerlerde ise yeni kemik oluşumuna dair osteoblast uzun ve fusiform şeklinde periferde yer alan hücrelerinde belirginleşme ve kemik matriks gelişimi ile

birlikte yeni kemik trabekülleri şekillenmiştir. Fazla sayıda küçük kemik trabeküllerinin oluşması ile kemik lakünaları içinde az sayıda osteosit hücrelerinin görülmesi yeni kemik oluşumunda önemli bir işaret olarak tespit edildi. Defekt ve greft grubunda, ana kemik iskeletinin bulunduğu alanda osteoklastik aktivitenin artması ile birlikte bağ dokusunda kollajen liflerde kalınlaşma, fibroblastik aktivitede artış ve inflamatuvar hücrelerin greft alanında soliter bir biçimde dağıldığı görüldü. Greft alanı içinde küçük kemik trabeküllerinin periferlerinde osteoblast hücreleri ve kemik matriksinin asidofilik yapıda belirgin olduğu görüldü. Defekt ve greft ile rosmarinik asit grubunda, greft alanı içinde inflamatuvar hücrelerin az sayıda soliter olarak dağıldığı, kan damarlarında dilatasyon ve konjesyonun azaldığı tespit edildi. Ana kemik bölgesine yakın kemik trabeküllerin genişlediği osteoblastik aktivitenin belirginleştiği matriks yapısının olgunlaştığı ve osteositlerin laküna içinde yerleştiği görüldü. Grupların Hematoksilen-Eosin boyaması Resim 1'de verilmiştir.

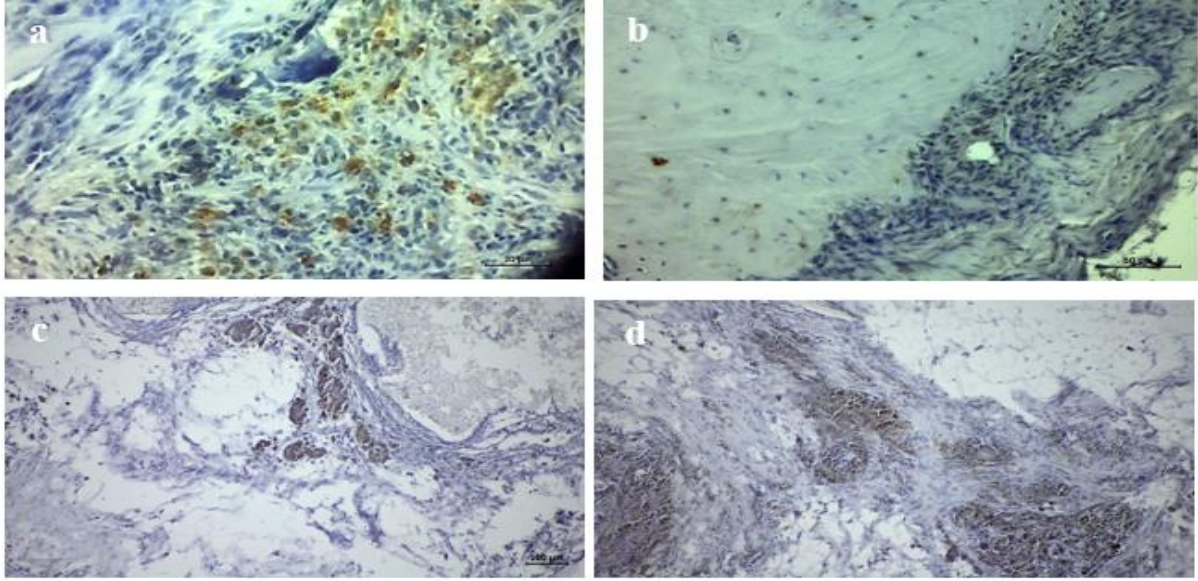
Grupların BMP-2 primer antikoru kullanılarak yapılan immunohistokimyasal

boyamasında defekt alanı içerisinde hücre infiltrasyonu ile birlikte fibroblast, ve osteoklast hücrelerinde BMP-2 ekspresyonunun pozitif olduğu ancak, bu bölgedeki kemik trabeküllerinin periferindeki osteoblast hücrelerinde ve kemik matriksinde negatif BMP-2 ekspresyonunun olduğu görüldü. Defekt ve rosmarinik asit grubunda, ana kemiğin bulunduğu alanın dışında, osteoklast hücrelerinde ve geniş kemik trabeküllerinin yer aldığı alanda osteoblast hücrelerinde BMP-2 ekspresyonu pozitif ancak merkezi kısımdaki osteosit hücrelerinde BMP-2 ekspresyonunun negatif olduğu izlendi. Defekt ve greft grubunda greft alanının dışında osteoklast hücrelerinde, küçük kemik trabeküllerinin periferindeki osteoblast hücreleri ve kemik matriksinde BMP-2 aktivitesi belirgin olarak görüldü. Defekt ve greft ile rosmarinik asit uygulamalı grupta, greft alanı içinde osteoklast hücrelerinde ve oluşan kemik trabeküllerindeki osteoblast hücrelerinde pozitif BMP-2 ekspresyonu görüldü. Yeni kemik trabeküllerinde artış tespit edildi. Grupların BMP-2 immunohistokimyasal boyaması Resim 2.'de verilmiştir.



**Resim 1.** a) *Defekt Grubu:* Kırılan kemik trabeküllerinin bulunduğu alan içinde mononükleer hücre infiltrasyonunda artış, kollajen fibrillerde yer yer dejeneratif değişiklikler ve nekrotik alanlar. H-E boyama, Bar: 100 µm b) *Defekt + RA Grubu:* Defekt alanında kan damarlarında belirgin dilatasyon ve konjesyon, damar çevresinde yoğunlaşmış inflamatuvar hücreler, osteoblast hücrelerinde belirginleşme ve kemik matriks gelişimi, yeni kemik trabekülleri, kemik trabeküllerinin oluşması, osteosit hücrelerinin varlığı. H-E boyama, Bar: 100 µm c) *Defekt + Greft grubu:* Ana kemik iskeletinin bulunduğu alanda osteoklastik aktivitenin artması, bağ dokusunda kollajen liflerde kalınlaşma, fibroblastik aktivitede artış ve inflamatuvar hücrelerin greft alanında soliter dağılımı. Greft alanı içinde küçük kemik trabeküllerinin periferlerinde osteoblast hücreleri. H-E boyama, Bar: 50 µm d) *Defekt + Greft + RA Grubu:* Greft alanı içinde az sayıda inflamatuvar hücreleri, ana kemik bölgesine yakın kemik trabeküllerin genişlediği osteoblastik aktivitenin belirginleştiği matriks yapısında olgunlaşma ve osteositlerin varlığı. H-E boyama, Bar: 100 µm





**Resim 2.** a) *Defekt Grubu*: Defekt alanı içerisinde hücre infiltrasyonu ile birlikte fibroblast, ve osteoklast hücrelerinde pozitif BMP-2 ekspresyonu, kemik trabeküllerinin periferindeki osteoblast hücrelerinde ve kemik matriksinde negatif BMP-2 ekspresyonu. BMP-2 immün boyama, Bar: 20 µm b) *Defekt + RA Grubu*: Ana kemiğin bulunduğu alanın dışında, osteoklast hücrelerinde ve geniş kemik trabeküllerinin yer aldığı alanda osteoblast hücrelerinde BMP-2 pozitif ekspresyonu, osteosit hücrelerinde negatif BMP-2 ekspresyonu. BMP-2 immün boyama, Bar: 50 µm c) *Defekt + Graft Grubu*: Graft alanının dışında osteoklast hücrelerinde, küçük kemik trabeküllerinin periferindeki osteoblast hücreleri ve kemik matriks'inde belirgin BMP-2 aktivitesi. BMP-2 immün boyama, Bar: 100 µm d) *Defekt + Graft + RA Grubu*: Graft alanı içinde osteoklast hücrelerinde ve kemik trabeküllerinde osteoblast hücrelerinde pozitif BMP-2 ekspresyonu. BMP-2 immün boyama, Bar: 100 µm

## Tartışma

Kemik kusurları travma, kemik tümörleri, enfeksiyon, veya kistler ve ortognatik cerrahiden sonra ortaya çıkabilir. Kemikteki küçük kusurlar doğal kemik iyileşme süreçleri ile onarılabilirken, büyük kusurlar greftler gibi çeşitli malzemeler kullanılarak ve implantlarla rekonstrüksiyon gerektirir. Bu amaçla farklı greft materyalleri; alloplastik kemik greftleri, otojen kemik greftleri, allojenik kemik ve diğer sentetik malzemeler kullanılmaktadır<sup>1</sup>. Kortikal greftler dayanıklı ve sağlam bir yapı sağlarken deneysel ve insan çalışmalarında osteogenezi artırma kabiliyetine sahip olmadığı izlenmiştir.<sup>14</sup> Bu nedenle osteoindüktif aktiviteyi artıracak ve yeni kemik oluşumunu hızlandıracak tamamlayıcı ve destekleyici tedaviler araştırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada periodontitisli sıçanlarda kontrollere göre osteoblastik aktivitenin ve Serum Kemik Alkalen Fosfataz (B-ALP) düzeylerinin anlamlı düzeyde

azaldığını gösterilmiştir.<sup>15</sup> Çalışmamızın biyokimyasal sonuçlarından serum ALP değerleri defekt grubunda düşük gözlenirken greft grubunda ve greft+RA grubunda 28. günde ALP değerinde yükselme görülmüştür. Kemik oluşumunu etkileyen kreatin kinaz aktivitesi defekt grubunda greft ve greft+RA grubuna göre düşük bulunmuştur (Tablo 1). Bu durum greft ve antioksidan uygulamasının kemik trabekül gelişimi yönünden olumlu etkisinin bir işaretidir. Histopatolojik değerlendirmede defekt grubunda defekt alanında skar doku, mononükleer hücre infiltrasyonunda artış, dejeneratif kollajen lifleri, nekrosis ve yer yer osteoblast ile matriks oluşumu izlendi. Defekt+RA grubunda ise defekt alanı içerisinde yoğun inflamatuvar hücrelerin arttığı, dilate ve konjeste vasküler yapılar, yoğun osteoklast hücre varlığı, bağ doku hücreleri ve liflerinin bu bölgede yeniden şekillenmeye başladığı izlendi. Yer yer küçük kemik trabekülleri ve osteoblast hücrelerinin görüldüğü kemik matriks alanları gözlemlendi. Defekt+greft



grubunda yoğun kolajen ve lif artışı, inflamatuvar hücrelerde azalma, freft alanı içinde küçük kemik trabeküllerinde osteoblast hücreleri ve kemik matriksinin asidofilik izlendi. Defekt+greft+RA grubunda, defekt alanında greft uygulaması yapılan bölgede inflamatuvar hücrelerde artış, dilate ve konjeste kan damarları, küçük kemik trabekül varlığı izlendi. Bağ dokunun hücre ve liflerinin düzenli olduğu, greft alanı içerisinde özellikle kemik trabeküllerinin şekillenmeye başladığı, bazı alanlarda osteoblastların belirginleştiği, osteosit lakünalarının olduğu gözlemlendi (Resim 1).

Kemik morfojenik proteinlerin (BMP'ler) osteojenik etkilere neden olduğu iyi bilinmektedir. Allogreftler tipik olarak mezenkimal hücre göçünü ve bağlanmasını hızlandıran BMP'ler içerir.<sup>16</sup> BMP-2, -4, -5, -6 ve -7 gibi kemik rejenerasyonunu destekleyen BMP tipleri vardır<sup>17</sup>. BMP-2'nin hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda, kemikleşmeye olan katkısı çalışmalarda gösterilmiştir. BMP-2 nin, bazı hayvan modellerinde periodontal ve kemik rejenerasyonunu desteklediği ve ayrıca preosteoblast hücrelerinin farklılaşmasını indüklediği ve böylece ossifikasyonu artırdığı izlenmiştir.<sup>18-21</sup> Kızıldağ ve ark.<sup>22</sup> tarafından kalvaryal defektlerde otojen diş kemiği grefti ve trombositten zengin fibrin kombinasyonu incelenmiştir. Araştırmacılar, immünohistokimyasal boyama metodları kullanarak BMP-2 ile işaretleme yapmışlar ve burada yeni kemik oluşumunu izlemişler, trombositten zengin fibrin ile birlikte otojen diş kemik greftinin kranial kusurlarda kemik iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna varmışlardır. Kim ve ark.<sup>10</sup>, tavşan kalvaryal defekt modelinde bifazik kalsiyum fosfat kompozitlerini (BCP), kemik morfojenik protein 2 (BMP-2) ve mezenkimal kök hücrelerini (MSC) birlikte incelemişler ve osteokalsin immünoaktivitesinin tedavi ile arttığını bildirmişlerdir. Acar ve ark.<sup>23</sup>, tavşan defekt modelinde, trombosit açısından zengin fibrin ile hidroksiapatit/bifazik kalsiyum fosfat kombinasyonunun uygulamasının kemik rejenerasyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Sonuçlara göre trombositten zengin fibrin, tek başına veya hidroksiapatit/bifazik kalsiyum fosfat ile

kombinasyon halinde kullanıldığında kemik rejenerasyonunu arttırmaktadır. Çalışmamızda, defekt grubunda, osteoklast hücrelerinde BMP-2 ekspresyonu pozitif, defekt + RA grubunda ise osteoklast ve osteoblast hücrelerinde pozitif, defekt + greft grubunda osteoklast ve osteoblast hücrelerinde ve kemik matriks'inde BMP-2 aktivitesi belirgin olarak görüldü. Defekt+greft+RA grubunda, osteoklast hücrelerinde ve osteoblast hücrelerinde pozitif BMP-2 ekspresyonu görüldü. Yeni kemik trabeküllerinde artış tespit edildi (Resim 2).

Rosmarinik asit (RA), antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri açısından iyi bilinmektedir. RA birçok Lamiaceae bitkisinde bulunan doğal bir fenolik bileşiktir. Polifenoller, biyolojik etkileri olduğunu bilinen, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve osteoporoz dahil olmak üzere kronik hastalıklara karşı koruyucu olduğu ispatlanmış fitokimyasallardır.<sup>24</sup> Fenolik bileşiklerin yararlı etkileri esas olarak antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır, çünkü bunlar reaktif oksijen türlerini (ROS) temizlemede görev yaparlar. RA'nın, ksantin oksidaz (XO) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile indüklenen oksidatif ve elektrofilik sitotoksiteyi ve serbest oksijen radikallerinin hücre içi konsantrasyonunu azalttığı, lökotrien B<sub>4</sub>, IL-6, IL-1 beta ve TNF- $\alpha$  üretimini azalttığı, prostaglandin E<sub>2</sub> üretimini artırdığı, ve kompleman sistemini inhibe ettiği gösterilmiştir<sup>25-27</sup>. RA uygulamasıyla (3 gün boyunca 2 mg) tedavi edilen farelerde, akciğerde nötrofilik inflamasyon ve ödem gibi patofizyolojik değişiklikleri inhibe ettiği tespit edilmiştir. RA'nın enflamatuvar cevabın başlaması ve ilerlemesinde önemli bir rol oynayan proenflamatuvar sitokin ve kemokin ekspresyonlarını inhibe etmek suretiyle etki gösterdiği bildirilmiştir<sup>28</sup>. RA'nın kemiğin yeniden şekillenmesi üzerine etkili olduğu bilinmektedir. RA osteoklast belirteç genleri olan MMP-9, cathepsin-K, kalmodulin, C-C kemokin reseptörü tip 2 (CCR2), ve kalsitonin reseptörlerinin mRNA ekspresyonunu bloke ederek kemik rezorpsiyonunu inhibe eder böylece osteoklast aktivitesini ve erken bir aşamada

farklılaşmayı etkilemiş olur.<sup>29-31</sup> Notodihardjo ve arkadaşları<sup>32</sup> çalışmalarında sıçan kalvaryal kemiğinde kritik boyutta defektlerinde hidroksiapatit (HAP) uygulaması ile veya HAP olmadan kemik oluşumu indükleyicisi BMP-2'nin kemik oluşumu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. BMP+HAP grubunda en yüksek düzeyde kemik indüksiyonu gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmada oluşturduğumuz defekt modelinde BMP-2 immunekspressyon düzeylerini inceledik.

## Sonuç

Kalvaryal kemik defektlerinde uzamış iyileşme süresi ve bu defektlerde estetik ve fonksiyonel olarak tam bir onarımın zor olması nedeniyle, iyileşme sürecini hızlandırmak ve uygulanan tekniklerin etkinliğini artırmak gerekmektedir. Bu amaçla oluşturduğumuz deneysel modelde, sıçanlarda kalvaryal kemik hasarından sonra alloplastik greft materyalinin kullanılması defekt bölgesinin daha kolay ve hızlı kapanmasını kolaylaştırmıştır. Greft uygulamasına ilaveten antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri sayesinde kemik dokunun remodelizasyonunu ve yeni kemik gelişimi indükleyen RA uygulaması ile, osteojenik aktivite artmış ve defekt alanı hızlı kapanmasını sürdürmüştür.

**Yazar katkıları:** Fikir/Kavram: AD, BD, ETK, ED; Tasarım: AD, ETK, BD, ED; Denetleme Danışmanlık: AD, ETK; Veri Toplama ve İşleme: BD, FA, EGÖ, ED ; Analiz ve Yorum: BD, AD, FA, ED; Kaynak Taraması: BD, AD, ETK, FA, EGÖ, ED ;Makale Yazımı: BD, EGÖ,FA, ED; Eleştirel İnceleme: BD, AD, ED, EGÖ.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Mali destek:** Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DUBAP) tarafından DİŞ.20.003 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

1. Szpalski C, Barr J, Wetterau M, Saadeh PB, Warren SM. Cranial bone defects: Current and future strategies. *Neurosurg Focus* 2010;29(6):E8.
2. Bosch C, Melsen B, Gibbons R, Vargervik K. Human recombinant transforming growth factor-beta 1 in healing of calvarial bone defects. *J Craniofac Surg* 1996;7(4):300-310.
3. Kazancıoğlu HO, Ezirganlı S, Aydın MS. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. *J Craniofac Surg* 2013;24(6):2141-2146.
4. Gupta MC, Maitra S. Bone grafts and bone morphogenetic proteins in spine fusion. *Cell Tissue Bank* 2002;3:255-267.
5. Laçın N, İzol BS, Gökalep Özkorkmaz E, Deveci B, Tuncer MC. The effect of graft application and simvastatin treatment on tibial bone defect in rats. A histological and immunohistochemical study. *Acta Cir Bras* 34(4): e201900408.
6. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192-195.
7. Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, et al. Rosmarinic acid: Modes of action, medicinal values and health benefits. *Anim Health Res Rev* 2017;18(2):167-176. doi:10.1017/S1466252317000081
8. Lee JW, Asai M, Jeon SK et al. Rosmarinic acid exerts an antiosteoporotic effect in the RANKL induced mouse model of bone loss by promotion of osteoblastic differentiation and inhibition of osteoclastic differentiation. *Mol Nutr Food* 2015;59(3):386-400.
9. Elbahnasawy ER, Valeeva Eman M. El-Sayed, Rakhimov I. The Impact of thyme and rosemary on prevention of osteoporosis in Rats. *J Nutr Metab.* 2019; <https://doi.org/10.1155/2019/1431384>
10. Kim BS, Choi MK, Yon JH, Lee J. Evaluation of bone regeneration with biphasic calcium phosphate substitute implanted with bone morphogenetic protein 2 and mesenchymal stem cells in a rabbit

- calvarial defect model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2015;120:2
11. Reddi AH. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4(5):737-744. doi:10.1016/0959-437x(94)90141-o.
  12. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996;10(13):1580-1594. doi:10.1101/gad.10.13.1580.
  13. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9(1):49-61. doi:10.1016/s1359-6101(97)00036
  14. Shegarfi H, Reikeras O. Review article: Bone transplantation and immune response. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2009;17:206-211. doi:10.1177/230949900901700218.
  15. Kose O, Arabaci T, Yemenoglu H ve ark.. Influences of Fucoxanthin on alveolar bone resorption in induced periodontitis in rat molars. *Marine Drugs*. 2016;14(4):70. doi:10.3390/md14040070.
  16. Agarwal A, Gupta ND, Jain A. Platelet rich fibrin combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of human intrabony periodontal defects: A randomized split mouth clinical trial. *Acta Odontol Scand* 2016;74(1):36-43. doi:10.3109/00016357.2015.1035672.
  17. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;346:26-37.
  18. Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, et al. Long-term functional loading of dental implants in rhBMP-2 induced bone. A histologic study in the canine ridge augmentation model. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(6):793-803. doi:10.1046/j.0905-7161.2003.clr140617.x9.
  19. Sorensen RG, Wikesjö UME, Kinoshita A, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: Evaluation of a bioresorbable calcium phosphate cement (Ceredex) as a carrier for rhBMP-2. *J Clin Periodont*. 2004;31(9):796-804. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00544.x.
  20. Kang W, Liang Q, Du L, Shang L, Wang T et al. Sequential application of bFGF and BMP-2 facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *J Periodont Res* 2019;54(4):424-434. doi:10.1111/jre.1264411.
  21. Lee AR, Choi H, Kim JH, Cho SW, Park YB. Effect of serial use of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 on periodontal tissue regeneration. *Implant Dent* 2017;26(5): 664-673. doi:10.1097/ID.0000000000000624.
  22. Kizildag A, Taşdemir U, Arabaci T, et al. Evaluation of new bone formation using autogenous tooth bone graft combined with platelet-rich fibrin in calvarial defects. *J Craniofac Surg*. 2019;30(6):662-1666.
  23. Acar AH, Yolcu Ü, Gül M ve ark. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol* 2015; 60(4):606-614.
  24. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45(4):287-306. doi:10.1080/1040869059096
  25. Moon DO, Kim MO, Lee JD, et al. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Lett* 2010;288(2):183-4191. doi:10.1016/j.canlet.2009.06.033.
  26. Sotnikova R, Okruhlicova L, Vlkovicova J, et al. Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 2013;65(5):713-23, doi:10.1111/jphp.12037.

27. Lee HJ, Cho HS, Park E, et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicol* 2008;250(2-3):109-115. doi: 10.1016/j.tox.2008.06.010.
28. Sanbongi C, Takano H, Osakabe N et al., Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med* 2003;34(8):1060-1069.
29. Hsu YC, Cheng CP, Chang DM. Plectranthus amboinicus attenuates inflammatory bone erosion in mice with collagen-induced arthrititis by downregulation of RANK L-induced NFATc1 expression. *J Rheumatol* 2011;38:1844-1857.
30. Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: The effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int* 2011;22:675-684. doi:10.1007/s00198-010-1270-x
31. Omori A, Yoshimura Yoshitaka D, Yoshiaki S. Rosmarinic acid and arbutin suppress osteoclast differentiation by inhibiting superoxide and NFATc1 downregulation in RAW 264.7 cells. *Biomed Rep* 2015;3.10.3892/br.2015.452.
32. Notodihardjo FZ, Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Kusumoto K. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40(3):287-291. doi: 10.1016/j.jcms.2011.04.008.