

157657

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ-DİŞ-ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

**KEMİK DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİNDE
HYALURONİK ASİT VE HETEROJEN KEMİK
GREFTİNİN ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK
OLARAK İNCELENMESİ**

Dt. Göksel ŞİMŞEK

**Tez Yöneticisi:
Prof. Dr. Ertunç DAYI**

**Doktora Tezi
Erzurum-2004**

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

**AĞIZ DIŞ ÇENE HASTALIKLARI ve CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**KEMİK DEFEEKTLERİNİN İYİLEŞMESİNDE HYALURONİK ASİT VE
HETEROJEN KEMİK GREFTİNİN ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK
İNCELENMESİ**

Dt. Göksel ŞİMŞEK

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21.11.2003

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 09.01.2004

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ertunç DAYI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Kenan ARAZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ömer KAYA

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU

Jüri Üyesi : Yrd. Doç.Dr. Ümit ERTAŞ

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Adnan TEZEL

Ocak 2004

ERZURUM

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. ÖZET	II
2. SUMMARY	III
3. GİRİŞ VE AMAÇ	1
4. GENEL BİLGİLER	3
A- KEMİK	3
- Kemik dokusu çeşitleri	3
- Periosteum ve Endosteum	5
- Kemik hücreleri	6
- Kemik yapımı	7
- Kemik onarımı	10
- Kemik dokusunun incelenmesi	11
B- HYALURONİK ASİT	11
C- KEMİK GREFTLERİ	18
5. GEREÇ VE YÖNTEM	23
Gereçler	23
Yöntem	26
Histopatolojik Çalışmalar	30
6. BULGULAR	32
7. TARTIŞMA	46
8. SONUÇLAR	58
9. KAYNAKLAR	59

ÖZET**Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Hyaluronik Asit Ve Heterojen Kemik Greftinin Etkilerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi**

Hyaluronik asit (hyaluronan veya HA), ekstrasellüler matriksin başlıca bileşenlerinden biridir ve doku morfogenezisi, hücre migrasyonu, farklılaşması ve adhezyonda etkili bir rol oynamaktadır.

Kemik allogreftler, kemik defektlerinin tamiri veya rekonstrüksiyonu için sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada 30 adet erişkin tavşanın sağ ve sol tibiasında genel anestezi ve cerrahi prensipler altında, 3 milimetre çapında 2 kavite açıldı. Sol tibiadaki kavitelere biri HA+fibrin jelle, diğeri kontrol amacıyla sadece fibrin jelle dolduruldu. Sağ tibiadaki kavitelere biri HA+kemik grefti+fibrin jel ile, diğeri kontrol amacıyla sadece fibrin jel ile dolduruldu.

Tavşanlar 20., 30. ve 40. günlerde eşit sayıda sakrifiye edildi ve defekt bölgeleri çıkartıldı. Histopatolojik tetkikler yapılarak elde edilen sonuçlar Kruskal-Wallis testi ile istatistiki olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak, HA ile kombine kemik grefti uygulanan kavite 30. ve 40. günlerde HA uygulanan gruptan daha iyi sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte, hem HA grubu hem de HA+greft grubu her dönemde kontrol grubundan daha yüksek skorlar vermiştir.

SUMMARY

Histopathological Investigation of the Influence of Hyaluronic Acid and Heterogen Bone Graft on Healing of Bone Defects

Hyaluronic acid (or hyaluronan, HA) which is one of the essential components of extracellular matrix and plays a predominant role in tissue morphogenesis, cell migration, differentiation, and adhesion.

Bone allografts frequently used to repair and reconstruction of bone defects.

In this study, two cavities were carved that 3 mm-diametered on the right and left tibia of 30 mature rabbits in accordance with the principles of general surgery. One of the cavities in the left tibia was filled with HA+fibrin gel, other cavity was filled with only fibrin gel for the purpose of control. One of the cavities in the right tibia was filled with HA+bone-graft+fibrin gel, other cavity was filled with only fibrin gel for the purpose of control.

On the 20th, 30th, and 40th days, rabbits were sacrificed in equal numbers and defective regions were extracted. Kruskal-Wallis test was applied to the data obtained in the result of histopathologic survey of specimens.

In conclusion, the cavities that were performed HA with bone graft have shown better healing than HA group in 30th and 40th days of study. However, both HA group and HA+bone-graft group have shown higher scores than control group in every period of study.

GİRİŞ VE AMAÇ

Oral ve maksillofasiyal cerrahi, çene ve yüz bölgesindeki sert ve yumuşak dokuların hastalıklarının, yaralanmalarının ve defektlerinin hem fonksiyonel hem de estetik olarak tanı ve tedavisini kapsayan diş hekimliğinin bir dalıdır. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi'yi ilgilendiren konular arasında çene-yüz bölgesi travmaları, deformiteleri, temporomandibuler eklem hastalıkları, çeneler bölgesinde oluşan enfeksiyonlar, kistler, neoplazmlar, tükrük bezi hastalıkları, preprotetik cerrahi işlemler, odontojen maksiller sinüzitlerin tedavisi ile implant ve rekonstrüktif cerrahi operasyonları sayılabilir. Operasyonlar sonucunda çene-yüz bölgesinde ortaya çıkan kemik defektlerin iyileşmesi çoğu kez sorun oluşturmaktadır. Oluşan bu kemik defektleri fonasyon, estetik ve fonksiyon yönünden önemli eksikliklere neden olmakta ve kısa sürede onarılmaları gerekmektedir. Hızlı ve düzgün bir kemik iyileşmesi oluşturabilmek amacıyla çeşitli rekonstrüktif biyoaktif materyaller kullanılmaktadır. Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda en sık kullanılan materyaller kemik greftleridir. Kemik transplantasyonda kullanılan kemik dokusu için kaynak bireyin kendisi olabildiği gibi çeşitli işlemlere tabi tutularak hazırlanan farklı canlıların dokuları ile sentetik materyaller de olabilmektedir.

Teknolojinin gelişimine paralel olarak kemik defektlerinde iyileşmeyi stimüle etmek amacıyla biyouyumlu, çevre dokulara zarar vermeden metabolize olan biyoaktif materyallerin kullanımı yaygın hale gelmiştir. Başlıca glikozaminoglikanlardan biri olan Hyaluronik Asit (HA), çeşitli tıp alanlarında bu amaçla kullanılmaktadır.

Çalışmamızdaki amacımız;

- HA'in kemik defektlerinin iyileşmesindeki etkisini incelemek,
- HA'in kemik iyileşmesindeki etkisini histopatolojik olarak incelemek,

- HA ile kombine edilmiş kemik greftinin iyileşme süreci üzerine etkisini histopatolojik olarak incelemek,

- HA kullanılarak oluşturulan iyileşmeyi HA+kemik greftiyle sağlanan iyileşme ile karşılaştırmaktır.



GENEL BİLGİLER

A) KEMİK

Kemikler, vücutta en sert yapılardır. Kemikleri yapan doku, diğer dokularda olduğu gibi hücreler arası madde ile hücrelerden yapılmıştır. Koruma, desteklik etme, hareket, içerdği kemik iliği ile kan hücresi yapımı, metabolizmaya yardımcı olma gibi işlevleri vardır. Sonuncu işleviyle vücuttaki kalsiyum ve fosfor dengesini düzenler. Vücutta kalsiyum ve fosfor bileşiklerini depolar; vücut sıvılarındaki önemli iyonların yoğunluğunu ayarlar.

Kemik dokusunda hücreler arası madde kalsifiye olmuştur ve buna *kemik matriksi* denir.¹

Kemik Dokusu Çeşitleri:

1. Primer Kemik Dokusu: Fötal gelişim ve kemik onarımı sırasında ilk oluşan olgunlaşmamış kemik dokusudur. Bu dokuda kollojen lifler her yönde seyreterek ağlar oluştururlar. Temel madde ve hücreler yeterince kemikleşmemiştir. Hidroksiapatit kristalleri kollojen lifler üzerine oturmuştur. Bulunan hücreler osteositlerdir ve bulunuş oranları sekonder kemik dokusuna göre daha yüksektir. Bunlar ara maddede gelişigüzel dağılmışlardır. Primer kemikte lakunalar biraz daha yuvarlak şekildedir.¹ Gelişim süresince primer kemik, bazı bölgeler dışında yerini sekonder kemik dokusuna bırakır. Kafatası suturları, tendonların insersiyö bölgeleri, dişlerin alveolleri primer kemik olarak kalırlar.^{1,2} Mineral oranı sekonder kemik dokusuna göre daha azdır.

2. Sekonder Kemik Dokusu: Buna olgunlaşmış kemik dokusu da denir. Sekonder kemik dokusu lamelli bir yapı gösterir. Kemik lamelleri ardışık şekilde düzenlenmiştir ve 3-7 mikron kalınlığındadır.^{1,2} Kollojen lifler kemik lamelleri içinde özel bir biçimde yerleşmişlerdir. Aynı lamelde bulunan kollojen lifler, birbirine paralel

uzanırken komşu lameldekilerle çapraz yönde ve spiraller yaparak seyredeler. İçerdiği hücreler osteositlerdir ve komşu lamellerin arasına düzenli aralıklarla sıkışmış şekilde yerleşmişlerdir. Sayıca primer kemik dokusundakine göre azdırlar. Lakunalar yassı-oval biçimlidir. Erişkinlerde genelde sekonder kemik dokusunun oluşturduğu olgun kemikler bulunur.

Sekonder kemik dokusunun iki türü vardır:

1. Süngerimsi Kemik Dokusu: Birbiriyle anastamoz yapmış kemik trabeküllerinden oluşur. Trabeküllerin aralarında kemik iliği ile dolu düzensiz boşluklar vardır. Spongios kemik trabeküllerinde kemik lamelleri paralel seyirlidir. Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımlarıyla kemiklerin iç yüzleri süngerimsi kemikten yapılmıştır. Havers ve Volkmann kanalları içermez. Beslenmesi kemik iliğinde bulunan kan damarlarından olur.

2. Kompakt Kemik Dokusu: Çıplak gözle homojen ve sert yapıda görülen kompakt kemik dokusu, mikroskopta kan damarları taşıyan kanallar sisteminden oluşmuş şekilde görülür. Organizmadaki tüm kemiklerin dış yüzleri kompakt kemikten yapılmıştır.

Kompakt kemik dokusunda iki tür kanal bulunur :

a) Havers kanalları: Kompakt kemiğin uzun eksenine paralel ve belirli aralıklarla yerleşmiş kanallardır. Enine kesitlerde yuvarlak biçimli görülür.

b) Volkman kanalları: Komşu havers kanallarını birbirine bağlayan yan kollarıdır. Enine kesitlerde boyuna uzanırlar. Kemiklerin yüzeylerindeki besleyici deliklerden (Foramen nutritium) giren kan damarları Volkman kanallarından geçerek Havers kanallarına girerler. Böylelikle kan damarları kompakt kemiğin tümüne dağıldıktan sonra içteki medullaya geçerler. Kemik dokusunun matriksi ve hücreleri bu

kan damarları ile beslenir. Kanallardaki damarlar ince, gevşek bir bağ dokusuyla sarıdır. Bunun içinde sinir lifleri ve lenf sıvısı bulunur.

Kemik lamelleri üç ayrı biçimde yerleşmişlerdir:

1. Havers Lamelleri: Havers kanallarının çevresinde iç içe yerleşmiş halkalar şeklindedirler. Ortadaki Havers kanalı ile bunu çevreleyen özel lameller bir sistem olarak kabul edilir. Bu sisteme *Havers Lameller Sistemi* ya da *osteon* denmektedir.^{1,2} Kompakt kemikte dokunun çoğunluğunu osteonlar oluşturur. Osteonlar homojen yapıda ve sement çizgisi adı verilen yapıştırıcı ince bir madde ile çevrilmişlerdir.

2. Ara Lameller: Osteonların aralarında kalan alanları dolduran lamellerdir. Ara lamel grupları değişik yönlerde uzanırlar.

3. Sirkumferansiyal Lameller: Kompakt kemiklerin iç ve dış yüzlerinde üst üste daireler şeklinde bulunan lamellerdir. Dış lameller periostun altında bulunan lamellerdir ve içtekilerden sayıca daha fazladırlar.

Kemik zarları

Kemiklerin iç ve dış yüzlerini saran bağ dokusundan oluşmuş zarsı katmanlar vardır. Dıştakine *periosteum*, içtekine *endosteum* denir.

1- Periostum: Kemiği dıştan saran damarca zengin bir kılıftır ve bu zar gelişme evresinde iki katlıdır. Dıştaki kat az miktarda fibroblast içeren düzensiz sıkı bağ dokusundan (*Stratum fibrosum*) yapılmıştır. İçteki kat (*Stratum osteogenicum*) ise, hücrelerden zengindir. Bu hücrelerin çoğu osteoprogenitor hücrelerdir. Gelişmekte olan kemik dokusunun yüzeyindeki hücreler, osteoprogenitor hücrelerin farklılaşmasıyla oluşmuş osteoblastlardır. Kemik yapımı ve onarımı sırasında iç kat çok aktiftir. Olgunlaşan kemiklerde çok ince olan periosteum alttaki kemik dokusuna *Sharpey lifleriyle* sıkıca yapışık şekildedir.^{1,3} Bu lifler dış katmandan ayrılan kalın kollojen

demetlerdir. Kemik dokusuna girerek yüzeye yakın ara lamellerin derinliklerine kadar iner ve böylece periosteumu kemiğe bağlarlar. Eklem yüzeyleri dışında kemikler dıştan periosteumla çevrilmişlerdir.

2- Endosteum: Kompakt kemiklerin iç yüzeyleri ve spongioz kemik trabekülleri endosteum ile örtülüdür. Retiküler bağ dokusundan yapılmıştır. Endosteumun kemik dokusuna bakan yüzeyinde tek sıra halinde osteoprogenitör hücreler bulunur. Kemik onarımında bu hücreler bölünerek osteoblastlara dönüşüler.

Uzun Kemiklerin Bölümleri

Bu kemiklerin orta kısımlarına *diafiz*, eklemleri oluşturan uç kısımlarına *epifiz* denir. Gelişmekte olan kemiklerde diafiz ile epifiz arasındaki kıkırdak bölgeye *epifizyal kıkırdak* denir. Epifiz bölgesindeki spongioz kemik çok ince bir kompakt kemik tabakası ile çevrilidir. Diafiz–epifiz arası geçiş bölgesine *metafiz* denir. Burada spongioz sütunlar bulunur.

Kemik Hücreleri

1. Osteoblast: Kemik yapımından sorumlu hücrelerdir. Kemik onarımı sırasında bol bulunurlar. Şekillenmekte olan kemik trabeküllerinin ve lamellerinin yüzeylerinde tek sıra halinde dizilmişlerdir.^{1,4} Aktivitelerine göre prizmatik, kübik ya da oval şekilli olabilirler.^{1,3} Osteoblastların sitoplazmaları granüllü endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinden zengindir ve çekirdekleri ökromatiktir. Bu hücreler kemik matriksinin organik bölümünü yani kollojen lifleri ve glikozaminoglikanları salgırlar. Osteoblastların birbirine doğru uzanan kısa çıkıntıları vardır. Osteoblast uzantıları arasında *neksus* tipi bağlantı birimleri bulunur. Kemik yapımının aktif olduğu dönemde osteoblastlar yüksek düzeyde alkalın fosfataz salgırlar ve bu enzim kanda yükselir.

2. Osteosit: Yassı oval biçimli kemik hücreleridir. Mineralize kemik matriksinde lakunalar içinde yerleşmişlerdir. Sitoplazmik çıkıntıları kanalikülilerin uçlarına kadar uzanıp komşu hücrelerinkilere bağlanırlar. Bunlar hücreler arasında iyon ve küçük moleküllerin geçişini sağlarlar. Bu kanalların arasında nükleuslar yerleşmiştir. Granüllü endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi azdır. Ancak hücreler oldukça aktiftir. Matriks mineralize olduğu için madde taşınması osteositler üzerinden gerçekleşir. Osteoblastlar gibi osteositler de bölünme güçlerini yitirmiş hücrelerdir.

Yapısal olarak inaktif görünüm sergileseler de osteositler kemik matriksinin devamlılığı için aktif rol oynarlar.

3. Osteoklast: Kemik iliğinden köken alan osteoklastlar, kalsitonin ve osteoklast uyarıcı faktör için reseptörler taşırlar. Bu hücreler kemik yıkımından sorumludurlar. Mononükleer fagositik sistem hücrelerindendirler. Osteoklastlar oldukça hareketli ve 150 mikrometre çapında hücrelerdir. Ortalama 50 ya da daha fazla çekirdek içeren osteoklastların sitoplazmaları asidofiliktir. Kemikteki özel, derin kemik rezorpsiyon bölgelerine oturmuşlardır. Bunlara *Howship Lakunaları* denir.

4. Osteoprogenitor Hücre: Bu hücreler periostumun iç hücre katmanına, havers kanallarına ve endosteuma yerleşmişlerdir. Embriyonal olarak mezenşimden gelişirler. Mitozla çoğalarak osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoprogenitor hücreler iğ şeklindedir ve çekirdekleri ovaldir. Endoplazmik retikulumları gelişmiş olmasına rağmen golgi kompleksi az gelişmiştir ve serbest ribozomlar çok sayıdadır.¹ Bu hücreler kemiklerin normal gelişiminde, yetişkin yaştaki kemik büyümesi sırasında, kemiğin iç kısmının reorganizasyonu esnasında ve fraktürlerin iyileşmesinde aktiftirler.^{1,3}

Kemik Yapımı (Osteogenesis)

Ossifikasyon adı da verilen osteogenesis iki yolla olur:

1- İntramembranöz Kemikleşme (Osteogenesis Membranacea): Doğrudan bağ dokusundan kemik şekillenmesi olgusudur. Kafatasının yassı kemikleri, mandibula ve maksillanın bazı kısımları, kısa ve uzun kemiklerin kompakt bölümleri bu tür kemikleşmeyle oluşur. İntramembranöz kemik oluşacak alanlarda mezenkim hücreleri hızla bölünerek osteoprogenitör hücreleri yaparlar. Bu hücreler de bölünerek osteoblastlara dönüşürler. Osteoblastlar kollojen lifleri ve kendilerinin de içinde bulunduğu temel maddeyi sentezlerler. Kapiller damarlardan çıkıp osteoid dokuya giren kalsiyum ve fosfor iyonları, buradaki osteoblastların salgıladığı alkali fosfatazın aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerini oluştururlar. Böylece osteoid doku mineralize olup primer kemik dokusu halini alır.

Değişik şekil ve büyüklükteki bu kemik parçacıklarına *kemik trabekülü* denir. Trabeküller içindeki osteoblastlar ara maddeyi salgılayarak *osteoid* haline gelirler. Şekillenen trabeküllerin yüzeylerinde yeniden oluşan osteoblastlar tek sıra dizilerek kemik lamellerini yapmaya başlarlar ve primer kemik trabeküllerinin yüzeyinde sekonder kemik yapısında katmanlar oluşur. Böylece süngerimsi kemik dokusu biçimlenir. Osteoklastlar da bu kemikleri iç yüzden rezorbe ederler. Süngerimsi kemikler son şekillerini aldıklarında primer kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar. Geriye yalnızca sekonder kemik trabekülleri kalır. Daha sonra bu kemiklerin iç ve dış yüzlerine intramembranöz yolla bir miktar kompakt kemik eklenir ve kemikleşme sona erer. Trabeküllerin arasındaki mezenkim dokusundan da kırmızı kemik iliği şekillenir.

2- Endokondral kemikleşme (Ossificatio Endochondralis): Uzun ve kısa kemikler bu yolla oluşurlar. Kemikleşmenin oluşacağı yerde önce hyalin kıkırdaktan ufak bir model biçimlenir. Bu modelin şekli oluşacak kemiğin şekline benzer. Sonradan

bu modelin yerini kemik dokusu alır. Kıkırdak modelin diafiz bölgesindeki perikondriumun iç katmanında bulunan mezenkim hücreleri osteoprogenitör hücrelere, bunlar da osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoblastlar üst üste yerleşen kemik lamellerini yaparak kendileri de lameller arasına sıkışıp osteositlere dönüşürler (*İntramembranöz Kemikleşme*). Böylece kıkırdak modelin diafizindeki periosteum ile kıkırdak doku arasında silindir şeklinde bir kemik bant oluşur. Bant şekillenince kıkırdak dokusunun diffüzyonla beslenmesi engellenir ve kondrositler bozulmaya yüz tutarlar. Bozulan hücrelerin aralarında ince bölmeler halinde kıkırdak matriksi kalır. Bu sırada beliren osteoklastlar, kemik bandında foramen nutritiumları açarlar. Periosteumdaki kan damarları bu deliklerden girip, dokuda dallanırlar. Bunlardan çıkan kalsiyum ve fosfor iyonları alkali fosfat aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrikse oturup mineralizasyonunu sağlarlar. Böylece diafizde bir *kemikleşme merkezi* oluşur. Osteoblastlar primer kemik dokusunu yapmaya başlarlar. Bu olaylar sırasında kıkırdak modelin epifizleri ile diafizi arasındaki bölgelerde bulunan kondrositler mitoz bölünmeyle çoğalıp alt alta dizilerek birbirine paralel izogen grupların bulunduğu bölgeleri dıştan sarar. Bu gruptaki kondrositler irileşip ölmeye başlarken kemik trabekülleri şekillenip aralarında anastomazlaşırlar.

Endokondral kemikleşme epifizlere yaklaşıncaya bu kez epifizlerde *sekonder kemikleşme merkezleri* belirir. Bundan sonra eski yeni kemikleşme bölgeleri arasında yalnızca kıkırdak bir disk kalır. Buna *epifiz plağı* denir. Kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plaklarındaki kıkırdak hücreleri diafiz yönüne doğru bölünüp çoğalarak devamlı kıkırdak dokusu yaparlar. Bu kıkırdak dokusu da yerini sürekli kemik dokusuna bırakır. Sonunda epifiz plakları da kemikleşir.¹

Kemik Onarımı

Kemik fraktürü veya defekti meydana geldiği zaman o bölgede ilk önce kanama oluşur ve ardından bağ dokusundan zengin pıhtı meydana gelir. Daha sonra kartilaj ve fibrokartilaj doku kırık uçlar arasını veya defekt bölgesini doldurmak için fibrokartilaginöz kallusu oluşturur.^{3,5} Yeni kemik, periosteumun ve endosteumun alt tabakalarında bulunan osteoprogenitör hücrelerin aktivasyonu ile defekt bölgesinin etrafında oluşmaya başlar.⁵ Daha sonra, kırık veya defekt bölgesindeki bağ dokusunda ortaya çıkan küçük kırık parçacıklarının endokondral kemikleşmesi yoluyla *primer kemik* oluşur. Böylece kırık bölgesindeki kırık alanları ile intramembranöz ve endokondral kemikleşmenin görülmesi aşağı yukarı aynı zamana rastlar. Onarım aşamaları primer kemiğin düzensiz dizilmiş trabeküllerinin kırık uçlarını birleştirecek şekilde gelişir ve *kemik kallus* oluşur.² İyileşme ilerledikçe bölgedeki kartilaj matriks, yeni kemik depozisyonu için bir iskelet yapı oluştururken, yalnızca yeterli miktarda kalacak şekilde kademeli olarak rezorbe olur. Endokondral kemik formasyonunda fibrokartilaginöz kallus yavaş yavaş kemik dokusuyla yer değiştirir. Fraktürdeki kemik birleşmesi iki fragmanın uç kısmında yeni spongios kemik oluşması ve bunun fraktür hattı boyunca devamlılık sağlamasıyla tamamlanır.

Kemik etrafındaki bağ dokusunun osteojenik potansiyelinin yetersiz olduğu bazı bölgelerde (femur boynu gibi) fraktürlerin iyileşmesi, periostal reaksiyon veya fibrokartilaginöz kallus oluşmadan gerçekleşir.⁵ Kemik onarımı sırasında ve hastanın normal aktiviteye kademeli olarak dönüşünde, kemik üzerine etki eden kuvvetler de kallusun yeniden şekillenmesine yardım eder. Bu güçler kemik büyümesinde etkili olan kuvvetlere benzedikleri ve kemik yapılanmasında da rol aldıkları için kallusun yeniden şekillenmesi ve kemiğin defekt oluşumundan önceki haline gelmesini sağlayacaklardır.

Kallusun primer kemik dokusu zamanla rezorbe olur ve yerini sekonder kemiğe bırakır.

Böylece kemiğin özgün yapısı yeniden oluşmuş olur.^{2,3}

Yapılan eksperimental çalışmalarda eksojen olarak uygulanan büyüme hormonu, tip I kollojen, anabolizan, kalsiyum, C ve D vitaminlerinin kemik dokusunun tamirinde pozitif etkiye sahip oldukları ve bu materyallerin klinik uygulama alanlarının olabileceği ortaya konulmuştur.⁶⁻⁸

Kemik Dokusunun İncelenmesi

Kemik dokusu sert bir doku olduğundan, diğer dokulardan farklı incelenir. Bunun için iki yöntem vardır:

1. Dekalsifikasyon Yöntemi: Kemik dokusunu kimyasal maddelerle, özellikle asitlerle, kesilebilir düzeyde yumuşatan yöntemdir. Yumuşamadan sonra, bilinen yöntemle kesilerek inceleme yapılır.

2. Masserasyon Yöntemi: Kemiğin kurutularak incelenmesi yöntemidir. Kemikte kuruma evresinde organik maddeler çürütülür. Daha sonra kemikten kesilen küçük parçalar bileme ya da zımpara ile iyice inceltir. İncelen parça lam-lamel arasına konur ve incelenir. Çürüten organik maddelerin yerleri, kanalcıklar ve lakunalar boş olacağından, buralar siyah renkte görülür.¹

B) HYALURONİK ASİT

Hyaluronat veya hyaluronan olarak da bilinen hyaluronik asit (HA) yüksek molekül ağırlıklı, non-sülfat, lineer, dalsız bir glukozaminoglikandır.^{9,10} Hyaluronik asit ilk olarak Meyer ve Palmer tarafından 1934 yılında vitreus cisimciğinden izole edilmiştir.¹¹⁻¹⁴ ve adını üronik asit içeren glassy (camlı) anlamına gelen Yunanca *hyalos* kelimesinden almıştır.⁹ B1,4-D glukronik asitle B1,3-N asetil-glukozamin zincir

halkasıyla bağlanan bir makromoleküldür.^{9,10,15} HA adult dokularda $0.05-3.0 \text{ mg ml}^{-1}$ ve bazı embriyonik dokularda $12-20 \text{ mg ml}^{-1}$ yoğunluklarında bulunmaktadır.¹⁶

Önceleri HA ekstrasellüler matriksin pasif, yapısal bir bileşeni olarak düşünülmeyle birlikte, günümüzde hücre migrasyonu ve morfogenezinin de içinde bulunduğu bazı biyolojik olaylarda dinamik olarak yer aldığı bilinmektedir.^{9,10,17-19} HA aktif hücre büyüme bölgelerinde lokalize olan spesifik reseptörlere de bağlanabilmektedir. Bu reseptörler, hücre siklusunun ayrılma periyoduyla ilişkilidir ve bölünmeyen hücrelerde hiç bulunmadığı bilinmektedir.²⁰ Matriks polisakkariti olan HA hücre farklılaşması, motilitesi ve hücrelerin adherensi üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir.²¹

HA' in molekül ağırlığı farklı doku ve sıvılarda 1×10^5 ile 10^7 Da arasında değişiklik göstermektedir.^{10,14,22,23} Bu moleküler ağırlık sayesinde HA, makromoleküller için bir filtre olarak görev yaparken aynı zamanda hücre yüzey proteinlerine ve diğer matriks proteinlerine bağlanabilmektedir.²²

Hyaluronan seviyesi, erişkin bireylere oranla fetusta daha yüksektir. Hyaluronanın fetal doku yaralanmasının nispeten skar bırakmadan iyileşmesinde katkısı olduğu öne sürülmüştür. Doku yaralanmasından sonra yetişkin dokuların HA seviyesi 7 gün sonra normal seviyeye dönmesine karşın fetal dokuların yüksek hyaluronan seviyesini 3 haftaya kadar korudukları belirtilmektedir.⁹

Yapılan araştırmalar HA sentezinin birçok faktörden etkilendiğini göstermiştir. Bu faktörler arasında hormonlar, enflamatuar mediatörler, büyüme faktörleri gibi çok sayıda değişken vardır.¹⁴

Diğer glukozaminoglikanlar golgi cisimciğinde sentezlenirken HA, plazma membranının sitoplazmasında sentezlenir. Ayrıca, hyaluronan nonsülfat olması ve

proteinlere kovalent olarak bağlanma özelliği ile de diğer glukozaminoglikanlardan farklıdır.⁹

İstirahat dönemlerindeki HA miktarının çoğu kollojenle ve diğer yüksek molekül ağırlıklı maddelerle çapraz bağlıdır. Böylece serbest HA konsantrasyonu nispeten düşüktür. Bununla birlikte, HA seviyesi doku yaralanmasından hemen sonra önemli miktarda yükselmektedir.^{20,24,25}

Tüm dokuların ekstrasellüler matriksinde bulunan HA tüm türlerde aynı, basit kimyasal yapıya sahiptir. Böylece, saflaştırılmış HA preparatının eksojen olarak uygulanması bu endojen materyalin lokal konsantrasyonunun yalnızca geçici olarak yükselmesine neden olmaktadır.²⁶

Yapılan çalışmalarda tüm HA' in yaklaşık olarak yarısının deride, 1/4'lik kısmının da iskelet ve eklemlerde olduğu, geri kalanının ise kaslar ve iç organlara eşit miktarlarda dağılmış olarak bulunduğu gösterilmiştir. En yüksek HA konsantrasyonu göbek bağı, sinoviyal sıvı, deri ve vitreus cisimciği gibi bağ dokularında bulunmaktadır. Akciğer, böbrek, beyin ve kaslarda da kayda değer miktarlarda bulunurken karaciğerde az oranda bulunmaktadır. En düşük konsantrasyon kan serumundadır.²⁷ Serum HA seviyesinde patolojik artışlar olabilmektedir.¹⁴ Siroz, romatoid artrit, skleroderma gibi enflamatuvar durumlarda, çeşitli kanser türlerinde HA sentezinin arttığı bilinmektedir.^{13,14,18,19,28-30}

Lokal metabolizma ile HA yıkımının %20-30 kadarı deri ve eklemlerle, geri kalanı ise lenfatik yolla olmaktadır. HA'in yarılanma ömrü yarım günle 2-3 gün arasında değişmektedir. Kan dolaşımına ulaşan HA'in yaklaşık % 85 -90'ı hepatik sinusidial hücrelerde katabolizmaya uğratılır. Böbreklerde yaklaşık %10 kadarı elimine edilir. Bununla birlikte, yalnızca %1-2 kadarı idrarla birlikte atılır. Kemik ve kıkırdak

gibi yoğunluğa sahip dokularda HA'in yıkımı lenfatik drenaj olmadığından kollojen ve proteoglikanlarla birlikte olmaktadır.²⁷

Tüm iyileşme ve rejenerasyon süreçleri için çok önemli bir özellik olan suya bağlanma yeteneği HA'te oldukça yüksek seviyededir.²⁶ Polimere oranla 1000 kat daha fazla su tutabilen oldukça higroskopik bir yapıya sahiptir.⁹ Diğer proteoglikanlarla karşılıklı etkileşimde bulunan bu makromolekül, normal fizyolojik şartlar altında tüm dokuların ekstrasellüler matriksine sitabilite, elastikiyet ve yüzey doldurucu yapı özelliği kazandırır. ^{20,31} Makromoleküller arasındaki bu ilişki intertisyel alandaki maddelerin hareketini ve doku hidrasyonunu düzenler.²⁰ Böylece yara iyileşmesini daha iyi organize edebilmekte ve iyi bir şekilde iyileşme sağlayabilmektedir.²⁶

Hyaluronik Asidin Yara İyileşmesi Sürecindeki Rolü

HA tarafından düzenlenen pek çok biyolojik olay, aynı zamanda yara iyileşme sürecinde de çok önemli konuma sahiptir.¹² Bu molekül, hem mineralize hem de non-mineralize dokulardaki yara iyileşme sürecinde anahtar bir role sahiptir.³² Yaralanmayı takiben, yara iyileşmesinde birbirini takip eden bir seri olaylar zinciri meydana gelir. Bunlar enflamasyon, granülasyon doku formasyonu, reepitelizasyon ve remodelling safhalarıdır. HA muhtemelen, bu hücresel ve matriks olaylarında multifonksiyonel bir role sahiptir. HA'in yara iyileşme zincirindeki belirtilen rolleri aşağıda daha detaylı bir şekilde ifade edilmektedir.

Enflamasyon: Enflamasyon, yara iyileşmesinde birbirini takip eden safhalar için gerekli olan bir çok faktörün katılımına neden olur. Bunlar enflamatuar hücrelerin, fibroblastların ve endotelial hücrelerin yara bölgesine migrasyonunu stimüle eden büyüme faktörleri, sitokinler, keratinositler, osteoblastlar gibi faktörlerdir.^{12,32}

Doku tamirinde enflamasyonun ilk safhasında yara bölgesi HA bakımından zengindir. HA, enflamasyonda birçok role sahiptir. Bunlar arasında dokudaki enflamasyonun düzenlenmesi, ekstrasellüler matriks hücrelerinin enflamasyon bölgesine göçünün sağlanması ve HA-fibrin pıhtı ilişkisi sonucu geçici bir yapı iskeleti oluşturulması yer almaktadır. Böylece, HA yara iyileşme sürecinde önemli bir basamak olan enflamasyonun ilk safhasını organize etmektedir.^{24,25,32}

HA bu çelişkili rolüne rağmen, aynı zamanda granülasyon doku formasyonunun stabilizasyonuna katkısı olan enflamatuvar yanıtı hafifletebilmektedir.^{12,32}

Granülasyon ve Granülasyon Doku Matriksinin Organizasyonu:

Granülasyon doku matriksi HA bakımından zengindir. HA yönünden zengin matriksin doku tamirindeki görevi çeşitli hücre fonksiyonlarına katkıda bulunmaktır. Bu matriks enflamasyon bölgesi içine hücre migrasyonunu kolaylaştırır ve granülasyon dokusunun organizasyonunu sağlar.²⁵

HA ve Hücre Migrasyonu: Hücre migrasyonu, granülasyon doku formasyonu için esastır. Başlangıçta oluşan granülasyon dokusundaki HA bakımından zengin olan ekstrasellüler matriks, geçici oluşan yara matriksi içine hücre migrasyonu için uygun ortamı sağlamaktadır. HA hem hücrelerle karşılıklı etkileşimde bulunarak hem de fizikokimyasal özellikleri sayesinde, hücre migrasyonunda fonksiyon görmektedir. HA hücre migrasyonunu kolaylaştıran hidrate bir matriks oluştururken, aynı zamanda spesifik hücrelerin yüzey reseptörleriyle karşılıklı etkileşimde bulunarak da hücre hareket mekanizmalarını düzenlenmektedir.

HA sentezinin hücre migrasyonu ile ilişkili olduğu da ortaya çıkartılmıştır. HA sentezi hücre migrasyonunu kolaylaştırmak için bizzat kendisi dinamik bir kuvvet

oluşturabilmektedir. Plazma mebranda sentezlendikten sonra direkt ekstrasellüler ortama salınmaktadır.

HA ve Hücre Proliferasyonu: Hücre proliferasyonu da doku tamirinin temel taşlarından biridir. Artan HA seviyesinin fibroblastların matriksten ayrılması ve mitozisin gerçekleşmesi için temel teşkil ettiği gösterilmiştir. HA'in hücre ayrılmasını kolaylaştırdığı gösterilmiş olmasına karşın, direkt mitojenik aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmamıştır. Bununla birlikte, doku tamirinin ilk safhasında bol miktarda bulunan mitojenik faktörler nedeniyle hücre mitozu oluşmasını kolaylaştırmaktadır. Böylece, hücre proliferasyonunda da indirekt bile olsa, önemli bir role sahiptir.

HA ve Enflamatuvar Yanıtın Hafifletilmesi: Enflamasyon granülasyon doku formasyonunun bir parçası olmasına karşın, normal doku tamirinin gelişmesi için enflamasyonun hafifletilmesi gerekmektedir. Granülasyon doku formasyonunun başlangıcında enflamasyon oldukça yüksektir. Bunun nedeni ise, matriks yıkım enzimleri ve reaktif oksijen metabolitlerinin sebep olduğu yüksek orandaki doku yıkımıdır. Granülasyon doku matriksinin stabilizasyonuna imkan sağlamak için enflamasyonun hafifletilmesi gerekmektedir.^{12,32} HA, aynı zamanda serbest radikallerin hücrelere zarar vermesini engelleyerek enflamasyonun hafiflemesine de yardımcı olmaktadır.¹²

Bağ dokusu ekstrasellüler matriksinde destek yapı olarak pasif bir şekilde görev alan HA'in, aynı zamanda gen tanımlanmasının bir düzenleyicisi olarak da etkili bir anjiogenik ajan olduğu gösterilmiştir.²⁷

İn vitro ortamda yapılan kültür çalışmalarında, molekül ağırlına ve doza bağlı olarak osteoblastlar üzerinde stimülatör etkiye sahip olan HA'in kemik greft materyallerinin osteojenik ve osteoindüktif özelliklerini geliştirebileceği bildirilmiştir.³³

Yine İn vitro ortamda yapılan histopatolojik çalışmalar, mezenşimal propenitör hücrelerin HA'ın oluşturduğu iskelet yapıya adhere olarak proliferasyona uğradıklarını ortaya çıkartmıştır.^{34,35}

Yapılan çalışmalar, yüksek molekül ağırlıklı hyaluronanın greft materyaline karşı gelişen immün yanıtı baskıladığını, sitotoksisiteyi önlediğini ve deri allogreftlerinin uzun süre canlı kalmasını sağladığını ortaya çıkartmıştır. İlaveten, birçok hücreyi çevreleyen HA tabakası sitotoksik hücrelerin ve virüslerin oluşturduğu ataklara karşı bir bariyer olarak görev yapmaktadır.¹⁴

Bilgiler ışığında HA'ın fonksiyonel özellikleri özetlenecek olursa:

- HA lenfosit, makrofaj ve nötrofillerin yara bölgesine girişini kısmen önler. Böylece, enflamatuar hücreler tarafından yapılan fagositoz da engellenmiş olur.
- HA mitozisi geliştirirken, hücre göçünü de geliştirebilir.
- HA fragmanları anjiogenik aktiviteler gösterebilir.
- HA suyu muhafaza edebilen yapısal özelliğinden dolayı yara dehidrasyonunu önleyebilir.
- HA yıkıma uğrarken enflamatuar reaksiyona neden olmaz.
- HA bakteriyostatiktir.
- HA birlikte uygulandığı biyomateryallerdeki biyolojik yapılar için de taşıyıcı olarak fonksiyon görür.^{36,37}

Son yıllarda eksojen HA uygulamalarının iyi bir doku tamiri sağladığının rapor edilmesi ile birlikte, doku tamiri amaçlı hyaluronan esaslı biyomateryaller geliştirilmeye başlanmıştır. Fizikokimyasal özellikleri ve en önemlisi yüksek oranda saflaştırılmış olan formunun biyoyumlu olmasından dolayı, özellikle oküler ve eklem cerrahisi ile ortopedik uygulamalar başta olmak üzere, yanık tedavisinde, tympanik membran

perforasyonlarının kapatılmasında osteoartritin erken tedavisinde yıllardan beri kullanılmaktadır.^{12,20,38-40}

Sonuç olarak hyaluronan, doku tamir sürecinde inflamatuvar aktivasyonun ilk safhasından granülasyon doku formasyonunun düzenlemesine ve reepitelizasyon sürecine kadar birçok olayda yer almaktadır.^{9,10,12,18}

C) KEMİK GREFTLERİ

Çeneler bölgesinde oluşan kontur defektlerinin daha çabuk iyileşmelerini sağlamak amacı ile kullanılan implantlara *Kemik Grefti* denir. Özellikle çeneler bölgesinde oluşan büyük kistik oluşumların, tümoral kitlelerin eksizyonu ve çeşitli nedenlerle ortaya çıkan kontur defektlerinin daha çabuk iyileşmelerini sağlamak amacı ile bazı maddelerin kullanılması zorunluluğu belirlemektedir.⁴¹⁻⁴²

Bu amaçlarla kullanılan biyolojik implantlar, kaynaklarına göre şu şekilde sınıflandırılır:

1. **Otojen:** Aynı bireyden alınan dokular.
2. **Isojen:** Alıcı ile aynı genetik yapıya sahip canlıdan alınan dokular.
3. **Allojen:** Alıcı ile genetik ilgisi olmayan aynı tür canlıdan alınan dokular.
4. **Xenogen (Heterojen):** Başka bir tür canlıdan alınan dokular.
5. **Alloplastik:** Sentetik olarak elde edilen biyolojik implantlardır.⁴³

İdeal greft materyalinde bulunması gereken özellikler şunlardır:

- Kemik gelişimi için bir yapı iskeleti oluşturması (*osteokondüktif özellik*).
- Kemik rejenerasyonu ve tamirinin çeşitli safhalarını stimüle etmesi (*osteindüktif özellik*).
- Kemik formasyon safhalarını kolaylaştıran osteojenik hücreler içermesi.⁴¹

Otojen Kemik Greftleri: Otojen kemik greftleri bu özelliklerin tümüne sahiptir ve günümüzde en çok tercih edilen kemik greftleridir.⁴⁴ Otojen kemik greftleri maksillofasiyal bölgenin rehabilitasyonunda ve rekonstrüktif kemik cerrahisinde sıklıkla kullanılmaktadır.⁴⁵

Otojen greftler kansellöz, non-vaskülarize, kortikal veya vaskülarize-kortikal tipte olabilir. Her tip farklı biyolojik özelliklere sahiptir.⁴¹

Otojen kemik grefti, vücudun bir çok yerinden elde edilebilmektedir. Bu bölgeler iliak krest, kalvarium, temporal kemik, maksilla, nasal septum, skapula, kaburga ve uzun kemiklerdir. İliak krest ve kaburga kemiği en sık kullanılan donör kemik kaynağıdır.⁴⁵

Genel olarak greft materyallerinin etkin kullanımı hastanın yaşına ve greftin durumuna bağlıdır. Genç hastalarda ve periostu korunmuş kemik grefti uygulamalarında başarı oranı daha yüksektir. Greftin kabulünde önemli rol oynayan başka bir faktör de sterilitedir.⁴⁵

Otogreftlerin *avantajları* şunlardır:

- İçerdiği canlı hücrelerin onarım işine katılması yani osteojenik yeteneklerinin olması
- Doku reddine neden olmamaları
- Alıcı doku üzerinde osteogenezisi uyarıcı rol oynamaları
- Erken revaskülarize olmalarıdır.

Bunun yanında otogreftlerin bilinen bazı *dezavantajları* da vardır:

- Elde edilmeleri ikinci bir operasyon gerektirir,
- Uygulanmaları sırasında genel anestezi gereklidir.

- Donör bölgede post-operatif ağrı, hemoraji, sinir zedelenmeleri, enfeksiyon gelişmesi, estetik sorunlar gibi komplikasyonlar oluşabilmektedir.
- Otojen yolla elde edilen greft boyutları sınırlıdır, büyük miktarlarda elde edilemezler.⁴⁶

Bütün bu dezavantajlar alternatif yöntemlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Otojen kemik greftlerinin endike olmadığı durumlarda allogenik greftler sıklıkla tercih edilmektedir.⁴⁷

Allojenik Kemik Greftleri: Genetik olarak farklı bir canlıdan elde edilip bir takım işlemlere tabi tutulduktan sonra kullanılan kemik transplantlarıdır. Yaşayan insanlardan veya kadavralardan elde edilmekte ve kemik bankalarında saklanmaktadır. Depolanan kemik allogreftleri soğutma, dondurma, dondurarak kurutma, kaynatma ve otoklavlama, deproteinizasyon, deminerilizasyon gibi aşamalardan geçirilmektedir.⁴⁷ Günümüzde en yaygın kullanılan yöntem dondurularak kurutmadır. Büyük miktarlarda elde edilebilir, ancak otojenik kemik greftlerine göre revaskülarizasyonu daha uzun sürmektedir. Greftin iyileşmesi rezorpsiyon ve osteoindüksiyon ile olmaktadır. Ayrıca, dondurularak kurutulmuş kemik allogreftlerinin osteoindüktif etkileri yoktur.⁴⁷ Çünkü yapılan işlemler greft içerisindeki osteojenik hücrelere zarar verir ve bu yüzden, allojenik kemik greftleri osteogenezise katılamazlar. Allojen greftlerin osteogenezise faydası pasif şekildedir ve sadece matriks oluşturmaktadırlar.⁴²

Otogreftte alternatif olarak kullanılan allojenik greftlerin ikinci bir operasyon bölgesi oluşturmaması ve istenilen miktarlarda elde edilebilmesi gibi avantajları vardır. Bilinen dezavantajları ise şunlardır:

- Osteogenezis için gerekli canlı hücrelere sahip olmaması,
- Doku reddine neden olabilmesi.⁴²

Xenogenik (Heterojen) Greftler: Xenogreftler farklı türler arasındaki nakledilen greftlerdir. Bu greftlerin antijenitesi allojenik greftlere oranla daha fazladır. Xenogenik greftin organik matriksi insan kemiğinden farklıdır. Bu yüzden hızlı greft reddinin oluşmaması için greft materyali daha etkili bir şekilde kimyasal muameleden geçirilmelidir.⁴⁵ Xenogenik greftler de allojenik olanlar gibi dondurma, liyofilizasyon, deproteinizasyon ve irradyasyon işlemlerine tabi tutulduktan sonra kullanılmaktadırlar.⁴⁸ Bu greft türü canlı olmamasına karşın, ev sahibi dokunun kemik formasyonunu aktive etmektedirler.⁶

Yapılan eksperimental çalışmalar sonucunda, allojenik kemik greftlerinin kemik defektlerinin iyileşmesinde pozitif ve remodelizasyonu hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu ortaya çıkartılmıştır.⁴⁹

Son yıllarda xenogenik kemik greftiyle ilgili yapılan çalışmalar, bu materyalin iyi bir kemik banka materyali olduğunu göstermektedir.⁵⁰

Xenogreft materyalinin avantajları şunlardır:

- Geniş miktarda kemik elde etmek mümkündür
- İkinci operasyon bölgesi gerekmemektedir.⁴²

Alloplastik Kemik Materyalleri: Sentetik olarak elde edilen kemik greftleridir. Günümüzde oldukça geniş bir ürün çeşitliliği göstermektedir. İlk uygulamalarından bu yana gün geçtikçe yeni materyallerin eklendiği bu grup içerisinde trikalsiyum fosfat, hidroksilapatit, doğal mercandan elde edilen koral, poliortoester, pöröz hidroksilapatit, rezorbe olmayan hidroksilapatit, siman sayılabilir. Alloplastik kemik greftleri tek başlarına kullanılabildikleri gibi aynı zamanda otojenik ya da allojenik kemik greftleri ile kombine olarak da kullanılabilmektedir.⁴⁷

Alloplastik greft materyalleri, istenilen boyut ve şekilde üretilebilmektedir. Bu greft türleri biyouyumlu olup osteokondüktif özelliğe sahiptirler ve kolaylıkla sterilize edilebilirler. Sentetik hidroksilapatit, trikalsiyum fosfat ve ikisinin kombinasyonu bu grubun en sık kullanılan greft materyalleridir.⁵¹



GEREÇ VE YÖNTEM

Gereçler

Healon (Hyaluronate Jel)

Healon'un 0.85ml. ve 0.4ml.'lik jel kıvamında ticari formları mevcut olmakla birlikte, (Healon GV, Pharmica & Upjohn Uppsala, Sweden) çalışmamızda 0.4ml'lik formunu kullandık (Şekil 1). Çalışmamızda kullandığımız preparatın içeriği şöyledir:

- sodium hyaluronate 10mg.
- sodium chloride 8.5mg.
- disodium hydrogen phosphate dihydrate 0.28mg
- soduim dihydrogen phosphate hydrate 0.04mg

Ph 'ı 7.2 olan Healon 'un içindeki sodyum hyaluronatın molekül ağırlığı 4×10^6 'dır.

Tutoplast (Spongioz Kemik Cipsi)

Bu heterojen kemik greftinin piyasada spongioz-granül, spongioz-chips, spongioz-mikrogranül, spongioz-blok, kanselloz-chips, kanselloz-blok formları mevcuttur (Tutoplast,Tutogen, Germany). Çalışmamızda, 1 mm çapında olan 3cc 'lik spongioz mikro granül formunu kullandık (Şekil 2).



Şekil 1: 0.4 ml'lik jel formunda, steril ambalajında HA materyali.



Şekil 2: Araştırmada kullanılan heterojen kemik greftinin ticari formu.

Gelatamp (Fibrin Jel)

HA taşıyıcısı olarak kullandığımız kollajen sünger, gelatin ve kolloid-gümüşün bileşiminden meydana gelmektedir (1 gr fibrin jeli 950 mg katılaştırılmış gelatin ve 50 mg kolloid-gümüş). Gelatamp, uygulandıktan ortalama 4-6 hafta sonra tamamen rezorbe olmaktadır. Gelatamp 'ın ticari formu her biri 15x7x7 mm ebatlarında olmak üzere 50 adetlik kutular şeklindedir (Şekil 3) .

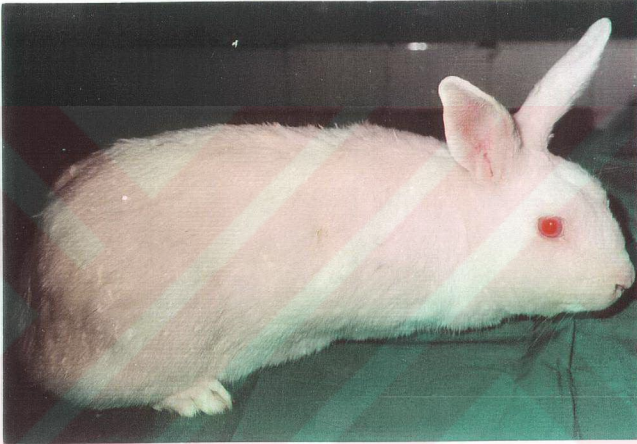


Şekil 3: Rezorbe olabilen fibrin jel.

Deney Hayvanları

Çalışmamızda deney hayvanı olarak kiloları 2,0-2,5 arasında değişen 30 adet erişkin, erkek albino cinsi tavşan kullanıldı. Tavşanların hepsi taze yeşillik, yem ile

beslendi ve musluk suyu içirildi. Deney hayvanlarının operasyonları ve operasyon sonrası bakımları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi (Şekil 4).



Şekil 4: Çalışmalarımızda deney hayvanı olarak kullandığımız matür bir erkek tavşan.

Yöntem

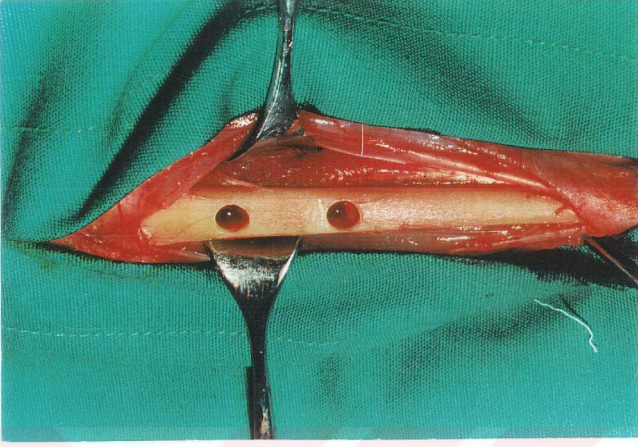
Çalışmamızdaki tavşanların anestezipleri 50mg/ml'lik Ketalar (Parke Davis, USA)'dan, 1ml/kg dozda IM yoldan enjeksiyon yapılarak sağlandı. Deney hayvanlarının operasyon bölgesi traş edilip povidone-iodine (Batticon, Adeka) ile

dezenfekte edildi. Bölgedeki kanlanmayı azaltmak amacıyla 2 cc'lik Articain sülfat (Ultracain D-S forte, Aventis Pharma) lokal anestezi solüsyonu enjekte edildi. Hayvanlar operasyon masasına sabitlendikten sonra steril yeşil örtüyle operasyon bölgesi izole edildi. Tavşanların sağ ve sol tibialarının orta kısmına 4 cm uzunluğunda cilt insizyonları yapıldı. Periost elevatörü yardımıyla cilt altı dokular ve periost diseksiyonla kemik yüzeyi açığa çıkartıldı. Her iki tibia'nın üzerinde, aralarında yaklaşık 1 cm mesafe olacak şekilde, 3 mm çap ve derinliğe sahip olan 2'şer adet kavite açıldı (Şekil 5).

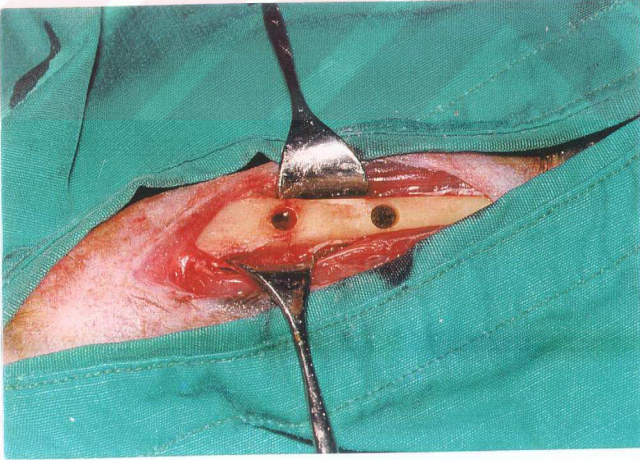
Çelik ront freze ve serum irrigasyonu altında yapılan işlemin ardından kaviteler steril spançlarla kurulandı. Sağ tibia'daki kavitelerden birine, operasyondan 1 saat önce ampicilin/sulbaktamli solusyon içerisinde konulmuş olan kemik grefti ile fibrin jelle emdirilmiş HA kombine edilerek dolduruldu. Diğer kaviteye ise kontrol amaçlı olarak sadece fibrin sünger yerleştirildi. Sol tibia'daki kavitelerden biri HA emdirilmiş fibrin sünger ile doldurulurken diğeri kontrol amaçlı olarak yalnız fibrin sünger ile dolduruldu. (Şekil 6 ve 7).

Yapılan bu işlemlerden sonra periost, kas ve cilt altı 3-0 cat-gut, cilt ise 3-0 ipek iplik ile suture edilerek operasyon bölgeleri primer olarak kapatıldı. Operasyonu takip eden 10 gün boyunca düzenli olarak, günde bir defa hayvanların pansumanları yapıldı ve profilaktik amaçla 800.000 IU prokain penisilin 0,20 cc intra musküler enjeksiyon yapıldı (Şekil 8).

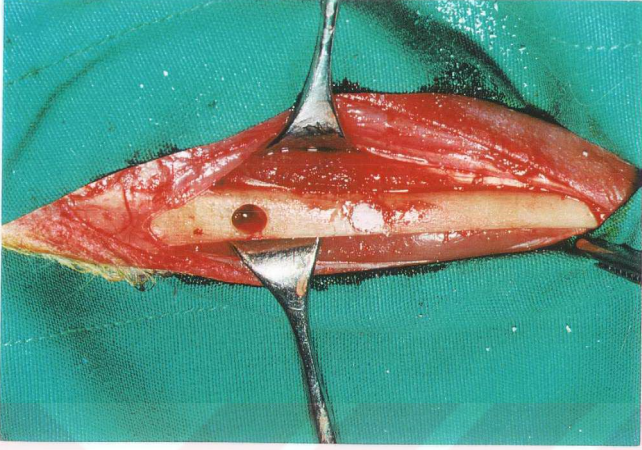
Çalışmamızda kullandığımız deney hayvanları eşit sayıda gruplandırılarak sırasıyla 20., 30. ve 40. günlerde, yüksek dozda adrenalin intrakardiyal enjeksiyonu yapılarak kurban edildi. Çalışmanın yapıldığı kemik segmentleri çıkartılarak % 10'luk formalin içerisinde fiks edildi.



Şekil 5: Tibialarda oluşturulan 3 mm'lik standart kavitelerin görünüşü.



Şekil 6: HA uygulanan kavitenin görünüşü.



Şekil 7: HA ile kemik greftinin kombine edilerek uygulanması.



Şekil 8: Ciltaltı dokuların suture edilmesi.

Histopatolojik Çalışmalar

Kemik segmentleri 10 günlük bir fiksasyon döneminden sonra incelenmek üzere Atatürk Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na gönderildi. Örnekler burada ilk olarak % 5'lik formik asitle dekalsifiye edildi. Ardından dereceli alkollerden geçirilerek dehidratasyon işlemi yapıldı ve parafin bloklara gömüldü. Blokların ilgili lezyon bölgelerinden mikrotom yardımıyla 5 mikronluk sagittal kesitler alınıp hematoksilin eozin ile boyandı. Örneklerin hepsi ışık mikroskobu altında aynı patolog tarafından değerlendirilip histopatolojik olarak skorlandı.

Histopatoloik Değerlendirme Kriterleri

Çalışmamızdaki veriler Emery ve arkadaşlarının geliştirdiği histopatolojik değerlendirme kriterlerine göre skorlandı⁵²(Tablo 1). Elde edilen bu verilere Kruskal-Wallis ve Mann Whitney U istatistik analizleri uygulandı.

Tablo 1: Emery ve arkadaşlarının geliştirdiği histopatolojik iyileşme kriterleri tablosu.

0	Belirgin Defekt
1	Sadece Fibröz Doku
2	Fibröz Doku > Fibrokartilaj Doku
3	Fibrokartilaj Doku > Fibröz Doku
4	Sadece Fibrokartilaj Doku
5	Fibrokartilaj Doku > Kemik Doku
6	Kemik Doku > Fibrokartilaj Doku
7	Sadece Kemik Doku

BULGULAR

Histopatolojik Bulgular

Postoperatif 20.Gün Örnekleri:

Hyaluronik asit uygulanan deney grubundaki kavitelerde fibröz doku ile fibrokartilaj doku birlikteydi. Sekiz kavitede fibröz doku iyileşmesi görülürken, nispeten daha az oranda da fibrokartilaj iyileşme izlenmekteydi. İki kavitede ise fibrokartilaj doku fibröz doku iyileşmesine göre daha fazlaydı (Şekil 9, Tablo 2).

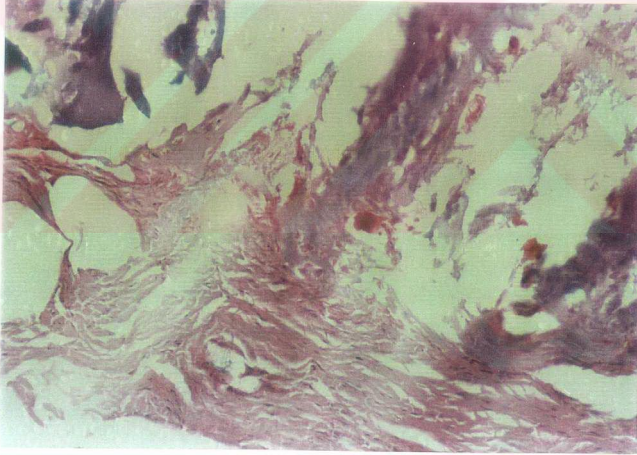


Şekil 9: 20. günde HA uygulanan deney kavitesi (HEX100). Belirgin fibröz doku ve arada küçük parçacıklar halinde fibrokartilaj doku içeren defekt alanı.

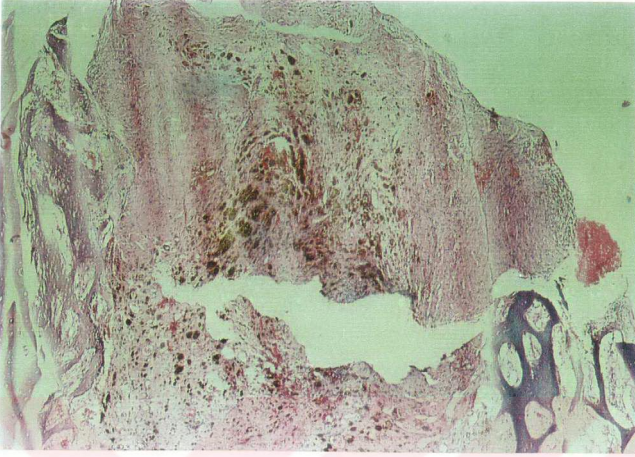
Hyaluronik asit+greft uygulanan deney grubu kavitelerinde ise, fibröz doku iyileşmesi fibrokartilaj doku iyileşmesi ile birlikte görülmekteydi. Bununla birlikte,

sekiz kavitede fibröz dokunun fibrokartilaj dokuya oranla daha yaygın olduğu saptanırken, diğer iki kavitedeki fibrokartilaj dokunun daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 10,Tablo 3).

Kontrol grubu kavitelerinde genel olarak fibröz iyileşme izlendi. Örneklerin yedisinde sadece fibröz doku görülürken, üç olguda kısmen de olsa fibrokartilaj doku iyileşmesi gözlemlendi. Ancak bu üç olguda fibröz doku fibrokartilaj dokuya göre daha yüksek orandaydı (Şekil 11).



Şekil 10: 20. günde HA+kemik grefti uygulanan deney kavitesi (HEX100). Resmin alt kısımlarında fibrokartilaj doku, altta belirgin fibröz doku içeren defekt alanı.



Şekil 11: 20. günde kontrol grubu kavitesi (HEX40). Sağ ve sol kenarlarda kemik yapılar ve arada belirgin fibröz doku, kanama ve hemosiderin yüklü makrofajlar içeren defekt alanları.

Tablo 2: 20 Gün HA ve kontrol gruplarının veri tablosu

20.Gün	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Kontrol	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2
Deney	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2

Tablo 3: 20 Gün HA+greft ve kontrol gruplarının veri tablosu

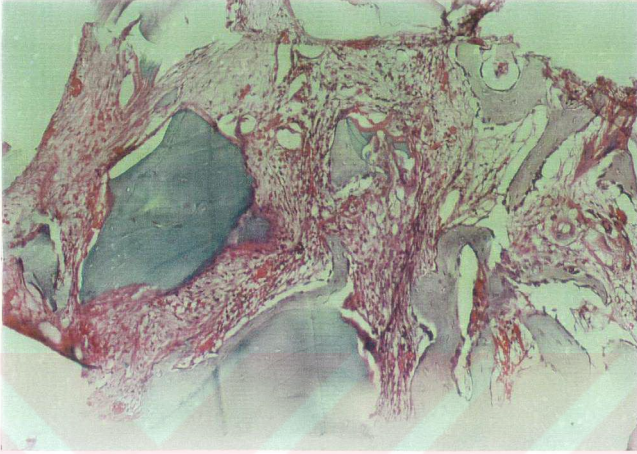
20.Gün	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Kontrol	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2
Deney	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2

Postoperatif 30. Gün Örnekleri:

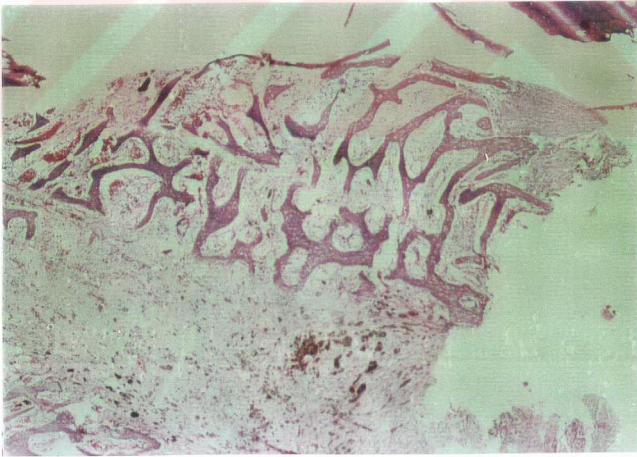
Hyaluronik asit uygulanan deney grubunda kaviterinin çoğunluğunda fibrokartilaj dokuya rastlandı. Altı kavitede fibrokartilaj doku iyileşmesi fibröz doku iyileşmesine oranla daha fazla iken, dört kavitede sadece fibrokartilaj doku izlenmekteydi (Şekil 12, Tablo 4).

Hyaluronik asit+greft deney grubu kaviterlerinde az miktarda yeni kemik oluşumu gözlemlendi. Yedi olguda sadece fibrokartilaj doku iyileşmesi gözlemlendi. Örneklerin üçünde ise genel olarak fibrokartilaj doku görülürken, kaviterlerin tabanında ve kenarlarında az miktarda yeni kemik oluşumu izlendi (Şekil 13, Tablo 5).

Kontrol grubu kaviterlerinin 30. gün örneklerinde fibrokartilaj doku fibröz dokuyla birlikteydi. Sekiz olguda fibröz doku iyileşmesi daha fazla iken, iki kavitede fibrokartilaj iyileşme daha fazlaydı.



Şekil 12: 30 günlük HA deney kavitesi (HEX100). Artmış miktarda fibrokartilaj doku ve arada fibröz doku ile karakterize defekt alanı.



Şekil 13: HA+kemik grefti uygulanan 30. gün deney grubu kavitesi (HEX40). Resmin üst tarafında belirgin fibrokartilaj doku içeren defekt alanı.

Tablo 4: 30. Gün HA ve kontrol gruplarının veri tablosu

30.Gün	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Kontrol	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2
Deney	3	3	4	4	3	3	4	3	3	4

Tablo 5: 30 gün HA+greft ve kontrol gruplarının veri tablosu

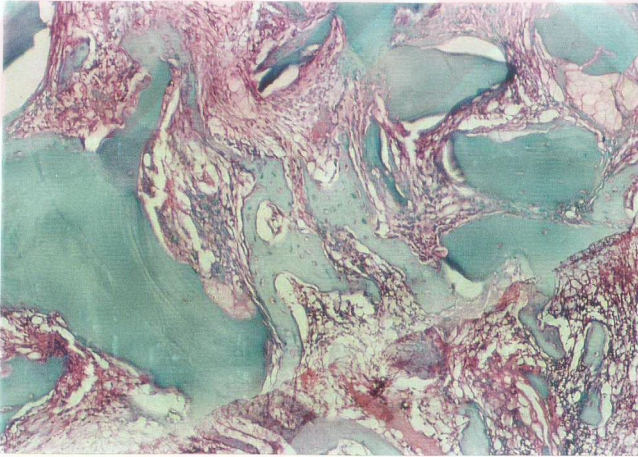
30.Gün	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Kontrol	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2
Deney	5	4	4	4	5	4	4	4	4	5

Postoperatif 40.Gün Bulguları:

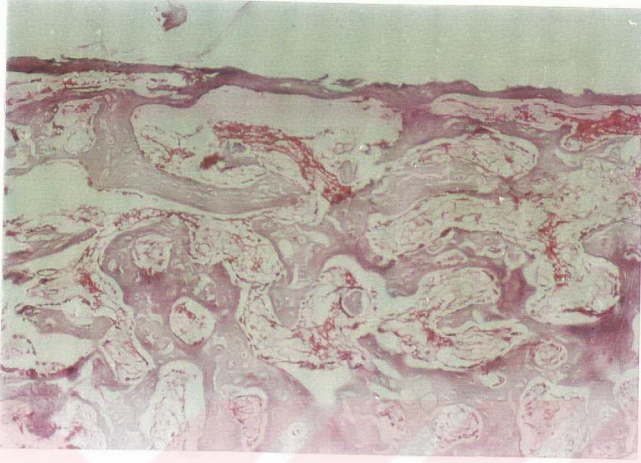
Hyaluronik asit uygulanan deney grubunun 40. gün örneklerinde yüksek iyileşme skorları izlendi. İyileşme safhası genel olarak fibrokartilaj doku gelişimi ve yeni kemik oluşumu şeklindeydi. Kavitelelerin beşinde fibrokartilaj doku daha yüksek oranda iken, diğer beş kavitede oluşan yeni kemik dokusu fibrokartilaj dokuya göre daha fazlaydı (Şekil 14, Tablo 6).

Hyaluronik asit+greft uyguladığımız deney grubu kavitelerinin tamamında yeni kemik oluşumu gözlemlendi. Sekiz olguda kavitelerin bazı bölümlerinde yaygın bir şekilde görülen yeni kemik doku, fibrokartilaj dokuya oranla daha fazla miktardaydı. İki olguda ise, istenilen optimal iyileşme skoru olan sadece kemik doku gelişimi izlendi (Şekil 15, Tablo 7).

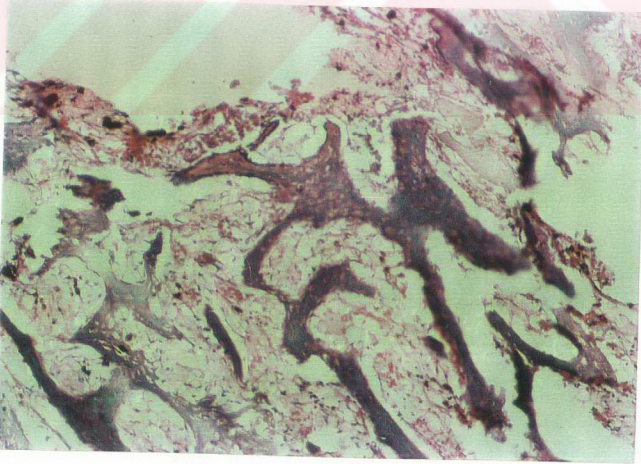
Kontrol grubu kavitelerinin hepsi fibrokartilaj ve fibröz doku ile dolmuştu. Olguların beşinde fibrokartilaj doku iyileşmesi görülürken, kısmen de olsa fibröz dokuya rastlanmaktaydı. Beş kavitede ise sadece fibrokartilaj iyileşme izlenmekteydi (Şekil 16).



Şekil 14: 40 günlük HA deney grubu kavitesi (HEX100). Belirgin fibrokartilaj doku ve daha az miktarda kemik doku içeren, arada fibröz doku bulunduran defekt alanı.



Şekil 15: 40. günde HA+kemik grefti uygulanan deney grubu kavitesi (HEX100). Yüzeyde tama yakın kaynamış kemik ve altta fibrokartilaj dokudan daha fazla kemik doku içeren defekt alanı.



Şekil 16: 40 günlük kontrol grubu kavitesi (HEX100). Birbiriyle bağlantılar oluşturan fibrokartilaj doku ve arada fibröz doku içeren defekt alanı.

Bulguların İstatistiksel Analizi

20. Gün Analizleri:

Postoperatif 20. günde HA, HA+greft, kontrol grupları arasında (Kruskall Wallis test) ($p= 0.0001$) seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (Tablo 8, Şekil 17).

Hangi gruplar arasında fark olduğunu belirlemek için Mann Whitney U testi yapıldı. HA grubu ile kontrol grubu arasında ($p= 0.001$) ve HA+greft grubuyla kontrol grubu arasında ($p= 0.001$) seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi. Bununla birlikte, HA grubuyla HA+greft grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p> 0.05$).

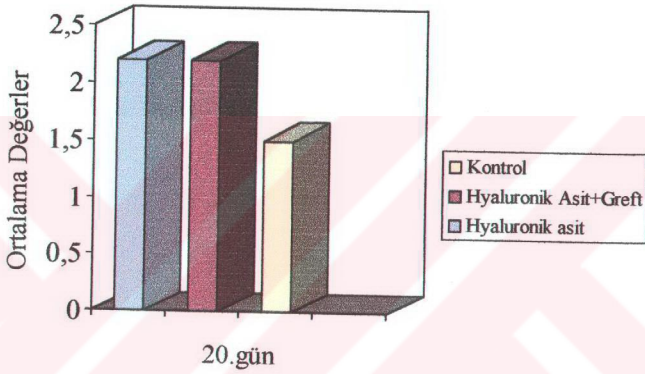
Tablo 8: 20. Günde elde edilen iyileşme değerlerine ait bulgular

	Ort	Sd	p
Hyaluronik Asit	2, 2	0, 42 0, 51	0, 0001
Hyaluronik Asit+Graft	2, 2	0, 42 0, 51	
Kontrol	1, 5	0, 42 0, 42	

30.Gün Bulguları:

Postoperatif 30. günde HA, HA+greft, kontrol grupları arasında (Kruskall Wallis testi) ($p= 0.0001$) seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (Tablo 9, Şekil 18).

Bu farkın HA grubu ile kontrol grubu arasından ($p= 0.001$), HA+greft grubuyla kontrol grubu arasından ($p= 0.0001$) ve HA grubuyla HA+greft grupları arasından ($p= 0.002$) kaynaklandığı tespit edildi.



Şekil 17: 20. Günde kemik iyileşme kriterlerinin gruplara göre sütun grafiğinde incelenmesi

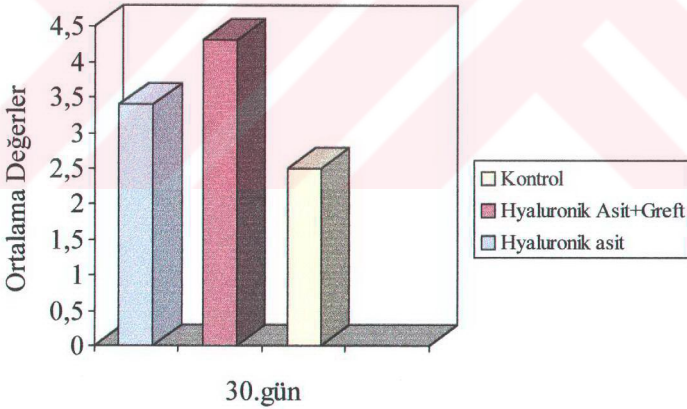
Tablo 9 : 30. Günde elde edilen iyileşme değerlerine ait bulgular

	Ort	Sd	p
Hyaluronik Asit	3, 4	0, 52	0, 0001
		0, 51	
Hyaluronik Asit+Graft	4, 3	0, 48	
		0, 51	
Kontrol	2, 5	0, 52	
		0, 51	

40.Gün Bulguları:

Postoperatif 40. günde HA, HA+greft, kontrol grupları arasında ($p= 0.0001$) seviyesinde istatistiksel olarak (Kruskall Wallis testi) anlamlı bir fark olduğu belirlendi (Tablo 10, Şekil 19).

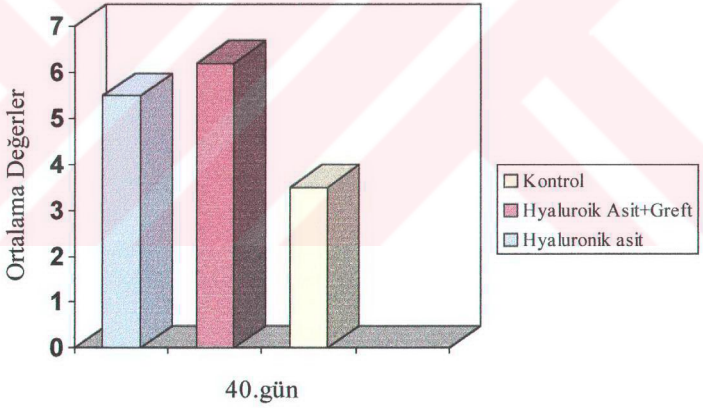
Gruplar arasında yapılan Mann Whitney U testi sonuçlarına göre HA grubu ile kontrol grubu arasında ($p= 0.0001$), HA+greft grubu ile kontrol grubu arasında ($p= 0.0001$) ve HA grubu ile HA+greft grupları arasında ($p= 0.007$) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı.

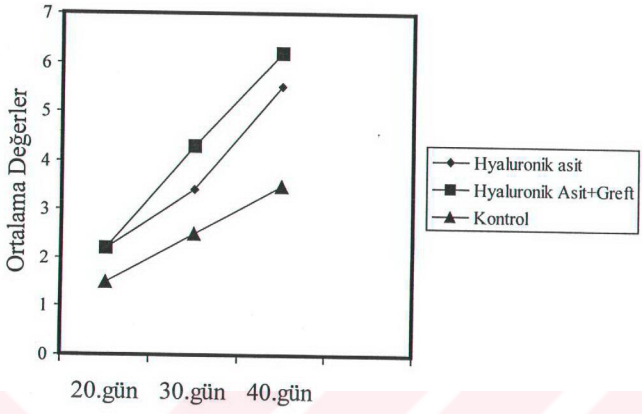


Şekil 18: 30. Günde kemik iyileşme kriterlerinin gruplara göre sütun grafiğinde incelenmesi

Tablo 10: 40. Günde elde edilen iyileşme değerlerine ait bulgular

	Ort	Sd	p
Hyaluronik Asit	5, 5	0, 53 0, 79	0, 0001
Hyaluronik Asit+Graft	6, 2	0, 42 0, 79	
Kontrol	3, 8	0, 53 0, 79	

**Şekil 19:** 40. Günde iyileşme kriterlerinin gruplara göre sütun grafiğinde incelenmesi



Şekil 20: Gruplardaki kemik iyileşmesinin ortalama değerleri bakımından günlere göre karşılaştırmalı çizgisel grafiği

TARTIŞMA

Kemik iyileşmesi, osteojenik hücrelerin birbirini takip eden enflamasyon, proliferasyon, migrasyon safhaları ile trabeküler kemik yapımı ve remodelling periyotlarından oluşmaktadır.⁵³ Enflamasyon gerçekleşikten sonra önce yeni doku formasyonu daha sonra da skar oluşumu gerçekleşmektedir.⁵⁴

Yaralanmayı takiben dokuda öncelikle HA biriktiği sonraki birkaç gün içinde ise, yara bölgesindeki lokal HA konsantrasyonunun azaldığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.⁵⁴

HA'nin antienflamatuvar etkisinin mekanizması tam olarak belirlenememiştir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda, yüksek konsantrasyonlardaki HA'nin granülositlerin mobilitelerini ve reaktivasyonunu nispeten engellediği, böylece enflamatuvar olayları kontrol ettiği öne sürülmüştür.⁵⁵ Bununla birlikte, tamir sürecinde önemli role sahip oldukları düşünülen sitokinlerin üretimini uyardığı da bilinmektedir.⁹

HA oküler ve eklem cerrahisinde, ortopedik uygulamalarda, yanık tedavisinde, tympanik membran perforasyonlarının kapatılmasında osteoartrit erken tedavisinde yıllardan beri kullanılmaktadır.^{12,20,38-40,56} HA'nin yumuşak doku iyileşmesine etkisiyle ilgili olarak yapılan çalışmalardan bazılarında aşağıda yer verilmiştir.

Kikuchi ve arkadaşları⁵⁷, HA'nin tavşan ligament hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, HA'nin fibrin ve fibrinojenin bağlanması için gerekli iskelet matriksi oluşturduğunu, HA'nin yara iyileşmesinin ilk safhalarında ve farklılaşma sırasında gerekli olan matriks elemanlarının sentezlenmesinde önemli role sahip olduğunu belirlemiştir.

Saltı ve arkadaşları³¹ yaptıkları bir in vitro çalışmada tavşanların fleksör tendonlarında deneysel olarak oluşturdukları perforasyonların tedavisinde HA'nin

etkisini biyomekanik olarak değerlendirmişler ve 8 haftalık kültür çalışması periyodundan sonra yapılan değerlendirmede, HA ile muamele edilen örneklerde fibriller arasında daha güçlü ve daha sıkı kovalent çapraz bağların oluştuğunu böylece, kollojen fibriller arasındaki oryantasyonun daha düzenli olduğunu rapor etmişlerdir.

Sonoda ve arkadaşları³⁸ ise tavşanların tibiasında deneysel olarak oluşturdukları menisküs yaralarına 5 hafta boyunca, haftada 1 kez olmak üzere HA tedavisi uygulamışlardır. Operasyondan 12 hafta sonra yaptıkları histolojik ve morfolojik değerlendirmelerde, HA grubuyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamasına karşın, HA ile tedavi edilen menisküste eski halini alabilen kollojen çapraz bağların kontrol grubuna göre oldukça yüksek oranda olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu yüzden, HA'in belirgin bir şekilde kollojen remodellingini geliştirdiğini öne sürmüşlerdir.

Hellström ve arkadaşları⁵⁸ yaptıkları bir çalışmada, rat tympanik membran perforasyonlarında lokal olarak HA uygulamışlardır. Perforasyonlar kapanıncaya kadar günlük HA uygulamasına devam eden Hellström ve arkadaşları deney grubu perforasyonlarının 6 günde iyileştiğini, buna karşın kontrol grubu perforasyonlarının ise ancak 10-11 gün sonra kapanmaya başladığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca HA uygulanarak oluşturulan iyileşmenin kontrol grubuna göre daha az opasite göstermekte olduğunu da rapor etmişlerdir. Bu bilim adamları⁵⁸ HA'in kollojen fibrillerin ve fibroblastların oryantasyonunu etkileyerek minimal skar formasyonu gelişimini sağladığını, böylece opasitenin azaldığını ifade etmişlerdir.

Yine Hellström ve arkadaşları⁵⁹ rat tympanik membranında yaptıkları başka bir çalışmada HA ile fibronektinin iyileşme üzerindeki etkilerini karşılaştırmışlardır. HA uygulanan gruptaki iyileşme oranı kontrol grubuna oranla % 60 daha fazla bulunurken,

fibronektin grubuna göre de daha iyi değerler elde edilmiştir. Buna sebep olarak da HA'in hücre hareketi üzerine olan etkisi gösterilmiştir.

Abatangelo ve arkadaşları⁶⁰ ratlarda oluşturdukları deneysel deri insizyonlarına lokal olarak HA uygulamışlar ve 72 saat sonra normal iyileşmenin başladığını, 120 saatin sonunda ise güçlükle ayırt edilebilir şekilde iyileşmenin tamamlandığını görmüşlerdir. Sonuç olarak; yara bölgesinde artırılmış olan HA konsantrasyonunun özellikle epitelyal hücre hareketi ve epitelyal organizasyon üzerinde etkili olduğunu ve böylece yara tamir sürecini hızlandığını göstermişlerdir.

King ve arkadaşları²⁰ ratların yanak mukozasında deneysel olarak perforasyonlar oluşturmuşlar ve HA'in iyileşme üzerine etkisini histopatolojik olarak değerlendirmişlerdir. HA uygulanan deney grubunda iyileşme ortalama 8. günün sonunda tespit edilirken, kontrol grubunda ancak 16. günde görüldüğünü not etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında yara genişliğini de değerlendirmişler ve HA uygulanan grubun yara boyutlarının daha kısa sürede küçülmeye başladığını bildirmişlerdir. King ve arkadaşları²⁰, HA'in yara iyileşmesi gibi aktif olarak büyüyen dokularda hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu stimüle edebileceği fikrini öne sürmüşlerdir.

Tekin⁶¹, ratlarda deneysel olarak oluşturduğu akut travmatik tympanik membran perforasyonunda HA emdirilmiş kollojen sünger uygulamıştır. Bu çalışmada, kontrol grubundaki spontan kapanma süresinin ortalama 15 gün, HA uygulanan gruptaki sürenin ise ortalama 8 gün olduğunu rapor etmiştir. Tekin⁶¹, böyle başarılı bir sonuca neden olan faktörlerden birinin HA'in kolloidal ozmotik etki ile su çekici özelliğe sahip olmasından dolayı perforasyon kenarında yara iyileşmesinin başlangıcında oluşan eksudanın koruyucu etkisine benzer bir etki göstermesi olduğunu ifade etmiştir. Aynı

zamanda, belirgin hiperplazi gösteren epitele destek rolü oynamasının da olası ihtimallerden biri olduğunu belirtmiştir. Yine HA'in hücre motilitesini artırması, belki de buna bağlı olarak migrasyonu artırıcı olmasını ve migrasyon yapan hücrelere destek görevi sağlamasını da başka bir ihtimal olarak öne sürmüştür.

King²⁰, Hellström⁵⁸⁻⁵⁹, Abatangelo⁶⁰, Tekin⁶¹'in çalıştıkları bölgelerin yumuşak doku olması ve çalışmamızla olan anatomik yapı farklılıkları yanında, çalışmamızda rejenerasyon skorlarını da onlardan farklı olarak 20., 30. ve 40. günlerde değerlendirdik. Ancak kontrol gruplarıyla diğer grupları karşılaştırdığımız zaman her üç periyotta da anlamlı bir fark olması, HA'in kemik dokusunda da iyileşmeyi stimüle ettiğini göstermektedir. HA'in bu etkisi osteojenik hücrelerin proliferasyonunda rol alması veya yara iyileşmesi boyunca önemli bir yeri olan mezenşimal hücre göçü için uygun ortam hazırlamasından kaynaklanabilir. Bu konu ile ilişkili olarak Hellström⁵⁹ ve Abatangelo⁶⁰ HA'in yumuşak dokuda hücre hareketi ve organizasyonunda rol alarak iyileşmeyi stimüle ettiğini savunurken, King²⁰ ve Tekin⁶¹ ise HA'in aktif büyüyen dokularda hücre proliferasyonu ve migrasyonunu teşvik edebileceğini ileri sürmüşlerdir.

HA araştırmacılar tarafından gerek yumuşak doku yaralanmaları, gerek tympanik membran perforasyonlarının kapatılması gerekse osteoartrit tedavisinde kullanılmasına karşın, yaptığımız literatür incelemelerinde kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine olan etkisiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmadığını gördük.

Sasaki ve arkadaşları⁵³, rat femurlarında oluşturdıkları kemik defektlerinde HA uygulayarak iyileşmeyi 14 gün boyunca takip etmişler ve HA grubundaki kaviterin tabanında ve duvarlarında 4. günden itibaren yeni kemik oluşumu görülmeye başladığını, 1. haftanın sonunda da kaviterin tamamen yeni oluşan trabeküler kemik ile dolduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, kontrol grubundaki yeni oluşan kemik

dokunun 7. günün sonunda görülebildiğini, 14. günün sonunda ise kaviterin yeni oluşan trabeküler kemik ile tamamen dolduğunu ifade etmişlerdir. Bu araştırmacılar, HA uygulanan kaviterlerde ilk dönemde oluşan granülasyon dokusunun hızla yerini yeni oluşmakta olan kemik iliği dokusuna bıraktığını da belirtmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol gruplarıyla deney grupları arasında anlamlı bir fark olması ile Sasaki ve arkadaşlarının⁵³ sonuçlarına paralel olarak HA'in tek başına veya allojenik kemik greftiyle kombine olarak kullanıldığı kaviterlerde iyileşme üzerine olumlu bir etkisi olduğu belirlenmiştir.

Lokal olarak salgılanan bazı büyüme faktörlerinin doku tamirinde pozitif etkileri olduğu bilinmektedir.⁶² Sasaki ve arkadaşları⁵³, HA'in muhtemelen bu faktörlerin muhafaza edilmesinde rol aldığını ve fizikokimyasal özelliklerinin yardımıyla, lokal çevrede osteoindüktif büyüme faktörlerini etkili bir şekilde muhafaza ettiğini savunmuşlardır. Ayrıca, osteojenik hücre farklılaşmasını stimüle ederek kemik yara iyileşmesi boyunca yeni kemik formasyonunun gelişimini hızlandırabildiğini de iddia etmişlerdir.

Solchaga ve arkadaşları³⁶ yaptıkları çalışmada, HA jel ile kalsiyum fosfat esaslı greft materyalinin tavşan mezenşimal progenitör hücrelere osteojenik veya kondrojenik taşıyıcı olarak uygunluklarını karşılaştırmışlardır. İmplantasyondan 3 hafta sonra HA jel örneklerinde genel olarak kartilaj doku gözlemlenmelerine karşın, 6. haftanın sonunda kemik dokusunun çok daha yaygın olarak yer aldığını, kısmen de olsa yer yer kartilaj dokunun geliştiğini ifade etmişlerdir. Kontrol grubunda ise, hem 3. hafta hem de 6. hafta sonunda yalnızca gevşek bağ dokusu oluştuğunu rapor etmişlerdir. 3. hafta sonunda, HA jel grubunda gözlemlenen kemik ve kartilaj doku skorlarının greft skorlarından yaklaşık 2 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Solchaga ve

arkadaşları³⁶ histopatolojik skorlar arasındaki bu farklılığın poröz yapıya sahip HA jelin dokulara bağlanabilen yüzey alanının daha fazla olmasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Çalışmamızda Solchaga ve arkadaşlarından³⁶ farklı bir yöntem uygulamamıza karşın, her iki çalışmada da histopatolojik değerlendirme yapılmıştır ve her iki çalışma da HA'in yara iyileşmesi üzerine etkisinin incelenmesi esasına dayanmaktadır. 20. ve 40. gün verilerimiz, Solchaga ve arkadaşlarının³⁶ verileriyle uyumlu idi. HA uyguladığımız grubun 20. gün bulgularında genel olarak fibröz iyileşme izlenirken, nispeten daha az oranda fibrokartilaj doku iyileşmesinin de gerçekleştiği gözlenmekte idi. İyileşmenin bu safhasındaki verilerini karşılaştırdığımız zaman, Solchaga ve arkadaşlarının bize göre daha başarılı sonuçlar elde ettiklerini söyleyebiliriz. 40. gün bulgularımızda ise, daha yaygın olarak yeni oluşan kemik dokusu gözlemlenirken, yer yer fibrokartilaj doku iyileşmesi de izlenmekteydi.

Taze otojen kemik grefti, greft materyalleri arasında en ideal iyileşmeyi sağlamasına karşın, bu kemik greftlerinin sınırlı miktarda elde edilebilmesi, postoperatif morbiditede artış ve grefti elde etmek için yapılan müdahalenin bazen esas müdahaleden daha büyük olması gibi bazı dezavantajları nedeniyle allojen ve heterojen kemik greftleri çeşitli şekillerde kullanılmışlardır.⁶³

Allojenik kemik greftleri üzerinde yapılan araştırma sonuçları bu materyallerin kullanılmasındaki en büyük sorunlardan birinin donörden hastalık taşınabilme riski olduğunu göstermiştir. Yapılan incelemeler sonunda dondurulup-kurutulma yöntemi ve doku bankalama standartlarına uyulması ile bu sorunun büyük ölçüde aşıldığı belirtilmiştir. Doku bankalama standartları ile hazırlanmış dondurulup-kurutulmuş kemik allogreftlerinin otogreftlerden daha avantajlı olduğu belirtilmektedir. Allojenik

kemik grefti yeni oluşmakta olan kemiğe yapı iskelesi oluşturmakta ve kapiller ile fibroblastların içine doğru büyümesine izin vermektedir. Böylece fibroblastların farklılaşması ve kemik komponent hücreleri tarafından kemik yapımı oluşabilmektedir. Allojenik kemik greftleri kullanımıyla (büyük kemik kavileri hariç) stabilize oluşmakta, istenmeyen hareketleri oluşturacak kuvvetler durdurulmaktadır. Ayrıca uygulandıkları kemik segmentleri arasında yeni kemik formasyonu için matriks rolü de oynamaktadır.⁶⁴

Çalışmamızda kullandığımız Tutoplast kemik greftlerinin sterilizasyonu sırasında kemiğin kollojen yapısı olduğu gibi korunmaktadır. Böylece, naturel yapısı korunmuş olan kollojen osteoindüktif bir iyileşme sağlamaktadır.⁶⁵

Fonseca ve arkadaşları⁶⁶ dondurulmuş-kurutulmuş kemik cipslerinin kemik iyileşmesine etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, postoperatif 24 hafta boyunca gözlem altında tuttıkları deney hayvanlarında, mandibula yüzeyi ile greft materyali arasında meydana gelen osteoid ve yeni kemik dokuyu ilk olarak 4. hafta örneklerinde gözlemlemişlerdir. Altıncı ayın sonunda, her iki grupta da revaskülarizasyonun tamamlandığını ve alveolar kortikal kemiğin yüksekliğinde önemli oranda artış olduğunu rapor etmişlerdir. Fonseca ve arkadaşları⁶⁶ allojenik kemiğin yavaş bir şekilde rezorbe olduğunu, bu periyot boyunca yeni subperiostal ve endosteal kemik formasyonunun oluşmasına olanak sağlamak için bir iskelet yapı olarak görev yaptığını ileri sürmüşlerdir.

Marx ve arkadaşları⁶⁴, oral ve maksillofasiyal bölgeyi ilgilendiren 36 ayrı vakada fonksiyonel ve estetik ideal bir iyileşme sağlayabilmek amacıyla, dondurulmuş-kurutulmuş allojenik kemik grefti uygulamışlardır. Hastalarını 18 ay boyunca gözlem

altında tutan bu bilim adamları, karşılaştıkları düşük komplikasyon değerlerine karşın, genel olarak çok başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Mulliken ve arkadaşları⁴⁹, maksillofasiyal kemik defekti olan 44 hastada demineralize allojenik kemik grefti uygulamış ve düşük enfeksiyon insidansıya başarılı klinik sonuçlar elde etmişlerdir.

Petri⁶⁷, tavşan mandibulasında deneysel olarak oluşturduğu enfekte fraktürlerde antibiyotik ilave edilmiş kemik allogrefti uygulamıştır. Postoperatif 3 hafta boyunca 2 günde bir ve daha sonra postoperatif 60. güne kadar haftada 1 kez olmak üzere, meydana gelen iyileşme skorlarını değerlendirmiştir. Petri⁶⁷, antibiyotik ilave edilmiş allogreft grubunda operasyondan sonra 4. günde vasküler yapıların oluşmaya başladığını, 12. günde ise kemik gelişiminin gözlendiğini bildirmiştir. Bu gruptaki defekt bölgesi 8 hafta içinde mükemmel bir şekilde iyileşme gösterirken, yalnız kemik allogrefti uygulanan grupta ve kontrol grubunda postoperatif 2. haftada herhangi bir kemik oluşumu gerçekleşmediğini rapor etmiştir.

Çalışmamızda hem HA olgularında hem de HA ile greft materyalini kombine olarak kullandığımız olgularda herhangi bir primer veya sekonder enfeksiyon gelişmediğini saptadık. Bununla birlikte, çalışmamızda greft materyallerinin operasyondan önce 1 saat antibiyotikli solüsyonda bekletilmesi ve post-operatif olarak sistemik antibiyotik profilaksisinin uygulanması, herhangi bir enfeksiyon gelişmemesinde etkili olmuş olabilir. Aynı zamanda, yapılan çalışmalarda biyouyumlu olan HA'nın bakteriyostatik^{15,37} ve antienflamatuvar⁵⁵ özelliklerinin olduğu, greft materyallerine karşı gelişen immün yanıtı baskılayıp sitotoksiteyi önlediği¹⁴ belirtilmektedir.

Oakes ve arkadaşları³⁵ ratların femurlarında oluşturdıkları defektlerde HA'ı tek başına ve demineralize bone matriks (DBM) ile kombine uygulayarak rejenerasyonu 16 hafta boyunca takip etmişler ve yaptıkları histolojik değerlendirmede, en yaygın endokondral kemikleşmeyi HA ile kombine DBM kavitelerinde gözlemlemişlerdir. HA'ın osteoindüktif potansiyeli olduğunu öne süren Oakes ve arkadaşları³⁵, bu materyalin gerek tek başına ve gerekse kemik greft materyalleriyle birlikte klinik uygulama alanına sahip olabileceğini de rapor etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, Oakes ve arkadaşlarından³⁵ farklı olarak daha kısa postoperatif takip süresi uygulamamıza karşın, histopatolojik değerlendirmede 30. ve 40. güne ait HA+greft olgularıyla HA olguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde etmemiz, bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur.

Hunt ve arkadaşları³⁷ deneysel olarak oluşturdıkları kemik kavitelerinde, HA ve bone morfojenetik proteinin (BMP) kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelemişler ve HA'ın kemik iyileşmesini stimüle ettiğini ancak tek başına osteokondüktif etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. BMP ile HA'ın kombine uygulandığı kemik kavitelerindeki iyileşme oranının her birinin tek başına uygulandığı kavitelere göre daha yüksek olduğunu rapor eden bu bilim adamları, HA'ın 12 hafta içinde rezorbe olabildiğini ve uygun bir taşıyıcı materyal olarak da düşünülebileceğini öne sürmüşlerdir.

Biz de HA ile kombine kemik grefti uyguladığımız grubun 30. gün verilerinde, kavitelerin tabanında ve kenarlarında yeni kemik dokusunun belirgin bir şekilde oluştuğunu gözlemlerken, HA'ı tek başına uyguladığımız 30. gün deney kavitelerinde ise yeni kemik dokusuna rastlamadık. Bununla birlikte, 40. gün bulgularımızda hem HA deney grubunda hem de HA+greft deney grubunda iyileşmenin tamamlanmadığını saptadık.

Grigolo ve arkadaşları⁶⁸ çalışmalarında, tavşanlarda deneysel olarak oluşturdıkları artiküler kartilaj defektlerinde HA jeli tek başına ve kemik greftiyle kombine olarak uygulamışlardır. Bu araştırmacılar implantasyondan sonraki 4., 12. ve 24. haftalarda kontrol grubunda defektlerin yalnızca bağ dokusuyla dolmuş olduğunu buna karşılık, HA grubunda 4. haftada rejenerasyonun başladığını ifade etmişlerdir. HA ile kombine greft grubuna ait iyileşme skorlarının ise HA ve kontrol grubundan daha yüksek değerlerde olduğunu gözlemlemişlerdir. 12. haftada rezorbe olduğu görülen HA'in kemik greftine iskelet yapı oluşturduğunu ifade eden Grigolo ve arkadaşları⁶⁸, bu kombine materyalin osteoartritin erken tedavisinde ve osteokondral fraktürlerin tedavisinde başarıyla kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Heterojenik kemik greftleri osteokondüktif özelliğe sahip olmaları ve ihtiyaca uygun ebatlarda elde edilebilmeleri nedeniyle yıllardan beri başarıyla kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, implant materyalinin kemik kavitelere veya defektlerine tamamen fikse olmaması durumunda osteoklastik aktivitenin stimüle olduğu ve bu durumda ev sahibi kemik dokusunda rezorpsiyonlara neden olduğu belirtilmektedir.⁶⁹ Çalışmamızda uygulanan heterojen kemik greftinin iyi bir şekilde adaptasyonunu artırabilmesi ve söz konusu bu problemi tolere edebilmesi için hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkilerinde aktif rol alan⁷⁰ poröz yapıya sahip HA ile heterojenik kemik grefti kombine edilerek uygulanmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre, HA+greft kavitelere HA ve kontrol kavitelere nazaran daha iyi bir rejenerasyon meydana geldiği belirlenmiştir. Bu durum, kavitelere uygulanan materyallerin kemik rejenerasyonunu stimüle etme etkileri yanında, greft materyalinin HA vasıtasıyla kavite içine iyi bir şekilde adapte olmasından da kaynaklanmış olabilir.

Aslan⁷¹, tez çalışmasında heterojen kemik greftinin iyileşme üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla tavşanların tibiasında defekt oluşturmuş ve 30 gün boyunca deney hayvanlarını gözlemlemiştir. Aslan⁷¹, 30. gün deney grubu olgularının %80'inde spongiozal kemik formasyonunun oluşmaya başladığını belirtmiştir. Aktif yeni kemik oluşum oranının %10, fibröz iyileşme oranının ise %30 olduğunu rapor etmiştir.

Aslan'ın çalışmasından farklı olarak çalışmamızda greft materyalini HA ile kombine bir şekilde uyguladık ve 30. günde daha yüksek oranda yani; % 30 oranında yeni kemikleşme sahaları olduğunu belirledik. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Aslan'ın çalışmasıyla karşılaştırıldığında, kemik cipsinin tek başına kullanımı yerine HA ile kombine kullanımının başarı oranını daha da yükseltebileceğini göstermektedir.

Cho ve arkadaşları⁷² HA'i tek başına ve kalsiyum sülfat ile kombine ederek, köpek mandibulasında yaptıkları distraksiyondan sonra oluşan kemik aralığına enjekte etmişlerdir. İmplantasyonu takiben 3. ve 6. haftalarda yaptıkları incelemelerde, HA uygulanan gruptaki kemik formasyonunun kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlar verdiğini, HA'in kalsiyum sülfat ile kombine edildiği deney grubundaki kemik formasyonunun ise her iki gruptan da yüksek değerlerde olduğunu belirtmişlerdir. Cho ve arkadaşları⁷², HA'in eksik olan osteokondüktif etkisi tamamlandığında çok daha iyi sonuçlar verdiğini öne sürmüşlerdir.

Çalışmamızda da HA+greft grubu ile HA grubunu, 30., 40. günlerde karşılaştırdığımız zaman HA+greft grubunda her iki periyotta da daha yüksek iyileşme verileri kaydettik. Kombine materyalimizle elde ettiğimiz bu başarılı sonuçların olası sebeplerinden biri, HA'in eksik olan osteokondüktif özelliğini heterojen kemik cipsiyle zenginleştirmemiz olabilir. HA ve HA+greft uygulanan deney gruplarında 40. günde

kemiksel kaynama meydana gelmesine karşın, tüm kontrol grubu olgularındaki iyileşmenin bu gruplara göre daha yavaş olduğunu gördük.

Çalışmamızın 20. gün bulgularında ise hem HA deney grubunun hem de HA+greft deney grubunun kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde üstünlük sağladığını saptadık. Bu ise, HA'in iyileşmenin ilk safhalarında ve transformasyon sırasında gerekli olan matriks elemanlarının sentezlenmesinde önemli role sahip olduğunu düşünen Kikuchi ve arkadaşlarının⁵⁷ sonuçlarını desteklemektedir.

Randomsky ve arkadaşları¹¹ fibroblast büyüme faktörü -2 (FGF-2) ile kombine HA jeli maymun tibiasında oluşturulan defekt bölgesine uygulamışlar ve iyileşme üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 10. hafta sonunda elde edilen sonuçları radyolojik, histolojik ve biyomekanik değerlendirmelere tabi tutmuşlar ve lokal uygulanan HA/FGF-2 jelin kallus gelişimini stimüle ederek iyileşmeyi geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda, bu karışımın kırık kemiğin mekaniksel gücünü artırdığını da öne sürmüşlerdir. Randomsky ve arkadaşları¹¹ FGF-2 ile birlikte kullanılan HA'in hücre proliferasyonu ve migrasyonu için uygun fiziksel ortam sağladığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda HA+greft olgularımızda daha iyi iyileşme değerleri elde etmemizin olası nedenlerinden bir diğeri de HA'in kombine olarak kullanıldığı materyalin osteoindüktif etki gösterebilmesi için uygun ortam sağlaması olabilir. Elde ettiğimiz verilere dayanarak ortaya attığımız bu fikrimizin Randomsky ve arkadaşlarının¹¹ çalışmasıyla da uyumlu olduğunu gözlemledik.

SONUÇLAR

Çalışmamızda deneysel olarak oluşturduğumuz kemik defektlerine HA ve kemik grefti uygulayarak, bu materyallerin defekt iyileşmesi üzerine olan muhtemel etkilerini histopatolojik olarak inceledik.

Elde ettiğimiz verilerde HA uygulanan grupta, kemik iyileşme kriterleri bakımından kontrol grubuna göre daha yüksek skorlar elde ettik.

Kemik greft materyalini HA ile kombine ettiğimiz grupta ise, kemik greftinin muhtemel osteokondüktif özelliği sayesinde hem HA uygulanan gruptan hem de kontrol grubundan daha yüksek iyileşme verileri elde ettik.

Sonuç olarak; Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi’de tümör ve kist operasyonlarında, maksillofasiyal deformitelerin tedavisinde biyouyumlu olan HA’i tek başına veya kemik greft materyalleriyle beraber kullanmanın iyileşmede avantaj sağlayacağını ve alternatif bir tedavi seçeneği olarak uygun olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Erdoğan D, Hatiboğlu M, Görgün M, Ilgaz C. Genel histoloji. Ankara, Hatiboğlu Yayınevi. 2. Baskı, 1999: 107-117.
2. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Basic histology. Tercüme: Aytekin Y, Temel histoloji, İstanbul, Barış Kitabevi. 8. Baskı, 1998: 132-146.
3. Fawcett DW and Bloom W. A Text book of histology. Newyork, Chapman & Hall. 12 Baskı, 1994: 194-233.
4. Clara M, Maskar Ü. Histoloji. İstanbul, Sermet Matbaası 1961: 274-306.
5. Fawcett DW and Bloom W. A text book of histology. Philadelphia, WB Saunders Company. 11. Baskı, 1986: 199-238.
6. Ertaş Ü. Biyosentetik Büyüme Hormonu ve Okreotid Asetat'ın Tavşanlarda Oluşturulan Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Olan Etkilerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilimdalı, Doktora Tezi. Erzurum, 1999.
7. Güngörmüş M. Tavşanlarda Oluşturulan Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Heterolog Tip I Kollojenin Etkisinin Histopatolojik ve Radyolojik Olarak İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilimdalı, Doktora Tezi. Erzurum, 1996.
8. Kaya Ö. Anabolizan, Kalsiyum, C ve D Vitaminlerinin Kırıklarda Kallus Teşekkülüne Etkisi Üzerine Eksperimental Bir Araştırma. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilimdalı, Doktora Tezi. Erzurum, 1974.

9. Kennedy CI, Diegelmann RF, Haynes JH, and Yager DR. Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts. *J Pediatr Surg.* 2000; 35 (6): 874-879.
10. Nandi A, Estess P, and Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem.* 2000; 275 (20): 14939-14948.
11. Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox WC, Spiro RC, and Poser JW. Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res.* 1999; 17 (4): 607-614.
12. Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.* 1999; 7 (2): 79-89.
13. Laurent TC and Fraser RE. Hyaluronan¹. *FASEB J.* 1992; 6 (April): 2397-2404.
14. Laurent TC. Biochemistry of hyaluronan. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1987; Suppl. 442: 7-24.
15. Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Pilloni A, and Bernard GW. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J. Periodontol.* 1997; 70 (4): 370-374.
16. Forrester JV and Jackie JM. Effect of hyaluronic acid on neutrophil adhesion. *J. Cell Sci.* 1981; 50: 329-344.
17. Burd DAR, Greco RM, Regauer S, Longaker MT, Siebert JW and Garg HG. Hyaluronan and wound healing: A new perspective. *Br J Plast Surg.* 1991; 44: 579-584.
18. Watanabe H, Cheung SC, Itano N, Kimata K, and Yamada Y. Identification of hyaluronan-binding domains of aggrecan. *J Biol Chem.* 1997; 272 (44): 28057-28065.
19. Wight TN, Kinsella MG and Qwarnström EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol.* 1992; 4: 793-801.

20. King SR, Hickerson WL, Proctor KG, Newsome AM. Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery*. 1991; 109 (1): 76-84.
21. Engström P-E, Shi X-Q, Tronje G, Larsson A, Welanders U, Frithiof L, and Engstrom GN. The effect of hyaluronan on bone and soft tissue and immune response in wound healing. *J Periodontol*. 2001; 72 (9): 1192-1200.
22. Tammi R, Saamanen AM, Maibach HI, and Tammi M. Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *J Invest Dermatol*. 1991; 97 (126):126-130.
23. Yerushalmi N, Arad A, and Margalit R. Molecular and cellular studies of hyaluronic acid-modified liposomes as bioadhesive carriers for topical drug delivery in wound healing. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 313 (2): 267-273.
24. Weigel PH, Frost SJ, McGary CT, LeBoeuf RD. The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. *Int Tissue React*. 1988; 10 (6): 355-365.
25. Weigel PH, Fuller GM and LeBoeuf RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol*. 1986; 119: 219-234.
26. Schlag G, Redl H. Wound healing. Berlin, Springer-Verlag, 1994: 136-143.
27. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997; 242: 27-33.
28. Simpson MA, Reiland J, Burger SR, Furch LT, Spicer AP, Oegema TR, and McCarthy JB. Hyaluronan synthase elevation in metastatic prostate carcinoma cells correlates with hyaluronan surface retention, a prerequisite for rapid adhesion to bone marrow endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001; 276 (21):17949-17957.

29. West DC, Hampbon IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. 1985, 14; 228(4705): 1324-1326.
30. Decker M, Chiu ES, Dolbaum C, Moiin A, Hall J, Spendlove R, Longaker MT, Stern R. Hyaluronic acid-stimulating activity in sera from the bovine fetus and from breast cancer patients. *Cancer Res*. 1989; 49 (1): 3499-3505.
31. Salti NI, Tuel RJ, and Mass DP. Effect of hyaluronic acid on rabbit profundus flexor tendon healing in vitro. *J Surg Res*. 1993; 55 (4): 411-415.
32. Moseley R, Waddington RJ. and Embury G. Hyaluronan and its potential role in periodontal healing. *Dent Update*. 2002; 29 (April): 144-148.
33. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Quin L, Cheng JCY, Kumta SM. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater. Res*. 2002; 66A(238185): 880-884.
34. Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C., Abatangelo G. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater. Res*. 2000; 50: 101-109.
35. Oakes DA, Lee CC, and Lieberman JR. An Evaluation of human demineralized bone matrices in a rat femoral defect model. *Clin Orthop*. 2003; 413: 281-290.
36. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, and Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res*. 1999; 17 (2): 205-213.
37. Hunt DR, Jovanovic SA, Wikesjö UME, Wozney JM, and Bernard GW. Hyaluronan supports recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone reconstruction of advanced alveolar ridge defects in dogs. A pilot study. *J Periodontol*. 2001; May 72: 651-658.

38. Sonoda M, Harwood FL, Amiel ME., Moriya H, Temple M, Chang DG, Lottman LM, Sah RL, and Amiel D. The effects of hyaluronan on tissue healing after meniscus injury and repair in a rabbit model. *Am J Sports Med.* 2000; 28 (1): 90-97.
39. Stenfors L-E. Treatment of tympanic membrane perforations with hyaluronan in an open pilot study of unselected patients. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1987; Suppl. 442:81-87.
40. Davidson JM, Nanney LB, Broadley KN, Whitsett JS, Aquino AM. Hyaluronate derivatives and their application to wound healing: Preliminary observations. *Clin Mater.* 1991; 8: 171-177. .
41. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, and Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: Efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995; 3(1): 1-8.
42. Peterson LJ, Hupp JR, Tucker MR, Ellis E. Contemporary oral and maxillofacial surgery. St Louis, Mosby. 3.Baskı, 1998: 680-693.
43. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30(4): 543-552.
44. Nilsson OS, Urist MR, Dawson EG, Schmalzried TP, Finerman GAM. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg Br.* 1986; 68(4): 635-642.
45. Kornblut AD, Stark TW, Vap JG, and deFries HO. The role of autografts, homografts, heterografts, and alloplastic implants in reconstructive head and neck surgery. *Otolaryngol Clin North Am.* 1982; 15(1): 147-160.
46. Lane JM and Sandhu HS. Current Approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* 1987; 18(2): 213-225.
47. Akal ÜK. Kistektomi, kronik enfeksiyon bölgelerinin küretajı ve apikal rezeksiyon operasyonları sonucunda oluşan kemik defektlerinde solventlerle dehidrate edilmiş

spongios kemik çipslerinin kullanılması. A.Ü. Diş Hek Fak Derg 1995; 22: 103-108.
1995; 22(2): 103-108.

48. Mulliken JB, Glowacki J, Kaban LB, Folkman J, Murray J. Use of demineralized allogeneic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. Ann Surg. 1981; 194 (3): 366-372.

49. Dayı E, Aslan M, Simsek G, and Yılmaz AB. The effect of bone chips dehydrated with solvent on healing bone defects. J Int Med Res. 2002; 30(2): 168-173.

50. Salama. Xenogeneic bone grafting in humans. Clin Orthop. 1983; 174: 113-121.

51. Behairy Y, Jasty M. Bone grafts and bone substitutes in hip and knee surgery. Orthop Clin North Am 1999; 30: 661-671.

52. Emery SE, Brazinski MS, Koka A, Bensusan JS, and Stevenson S. The biological and biomechanical effects of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model. J Bone Joint Surg Am. 1994; 76-A (4): 540-548.

53. Sasaki T and Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. Bone. 1995; 16(1): 9-15.

54. Gerdin B and Hallgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. J Intern Med. 1997; 242: 49-55.

55. Kopp S, Carlsson GE, Haraldson T, and Wenneberg B. Long-term effect of intra-articular injections of sodium hyaluronate and corticosteroid on temporomandibular joint arthritis. J Oral Maxillofac Surg. 1987; 45: 929-935.

56. Bertolami CN, Gay T, Clark GT, Rendell J, Shetty V, Liu C, and Swann DA. Use of sodium hyaluronate in treating temporomandibular joint disorders: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. J Oral Maxillofac Surg. 1993; 51: 232-242.

57. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Effects of hyaluronan on cell proliferation and proteoglycan synthesis in rabbit ligament cells. *Int J Tiss Reac.* 1996; 18 (4/6): 87-95.
58. Hellström S and Laurent C. Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1987; Suppl. 442:54-61.
59. Hellström S, Bloom GD, Berghem L, Stenfors LE, and Söderberg O. A comparison of hyaluronan and fibronectin in the healing of tympanic membrane perforations. *Eur. Arch Otorhinolaryngol.* 1991; 248: 203-235.
60. Abatangelo G, Martelli M, and Vecchia P. Healing of hyaluronic acid-enriched wounds: Histological observations. *J Surg Res.* 1983; 35 (5): 410-416.
61. Tekin S. Deneysel Akut Travmatik Timpanik Membran Perforasyonunda Hyaluronik Asit, Epidermal Büyüme Faktörü ve Mitomisin C Uygulamalarının Kapanma Süresi ve Histopatolojik Değişikliklere Olan Etkilerinin İncelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İzmir, 2001.
62. Güngörmüş M, Gürbüz G, Yıldırım G. Büyüme faktörlerinin büyüme üzerine etkileri. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg.* 1997; 7(1): 100-102.
63. Boyce T, Edwards J, and Scarborough N. Allograft bone. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30(4): 571-581.
64. Marx RE, Kline SN, Johnson RP, Malinin TI, Matthews JG, Gambil V. The use of freeze-dried allogenic bone in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Surg* 1981; 39: 264-274.
65. Kutlu H. Tutoplast kemik greftlerinin hazırlanması aşamaları. www.Batisaglik.com.tr.

66. Fonseca RJ, Nelson JF, Clark PJ, Frost DE, Olson RAJ. Revascularization and healing of onlay particulate allogenic bone grafts in primates. *J Oral Maxillofac Surg* 1983; 41: 153-162.
67. Petri III WH. Evaluation of antibiotic supplemented bone allograft in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 1991; 49: 392-396.
68. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R, Facchini A. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff^R-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*. 2001; 22: 2417-2424.
69. Susante JLCV, Buma P, Homminga GN, Berg WBVD, Veth RPH. Chondrocyte-seeded hydroxyapatite for repair of large articular cartilage defects. A pilot study in the goat. *Biomaterials*. 1998; 19: 2367-2374.
70. Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, and Tammi M. Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J Invest Dermatol*. 1988; 90 (3):421-414.
71. Aslan M. Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Heterojen Kemik Greftinin ve Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu Yönteminin Etkilerinin İncelenmesi ve Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilimdalı, Doktora Tezi. Erzurum, 2002.
72. Cho BC, Park JW., Baik BS, Kwon IC, Kim IS. The role of hyaluronic acid, chitosan, and calcium sulfate and their combined effect on early bony consolidation in distraction osteogenesis of a canine model. *J Craniofac Surg*. 2002; 13 (6): 783-793.