

**T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF
VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI**

**KRİTİK BOYUTLU KEMİK DEFEKTLERİNDE
DESFERROKSAMİN UYGULAMASININ
KEMİK GREFT İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Serbürent GÜZEY
Tbp. Yzb.**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Prof. Tbp. Kd. Alb. Serdar ÖZTÜRK

**ANKARA
2013**

**T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF
VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI**

**KRİTİK BOYUTLU KEMİK DEFECTLERİNDE
DESFERROKSAMİN UYGULAMASININ
KEMİK GREFT İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Serbülent GÜZEY
Tbp. Yzb.**

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik
Cerrahi Anabilim Dalı'nın Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Programı
için öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Tbp. Kd. Alb. Serdar ÖZTÜRK**

**ANKARA
2013**

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na:

“Kritik boyutlu kemik defektlerinde desferroksamin uygulamasının kemik greft iyileşmesi üzerine etkisi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Tbp. Kd. Alb. Serdar ÖZTÜRK

Üye	İMZA
(Ünvanı, Adı Soyadı)	

Üye	İMZA
(Ünvanı, Adı Soyadı)	

Üye	İMZA
(Ünvanı, Adı Soyadı)	

Üye	İMZA
(Ünvanı, Adı Soyadı)	

Üye	İMZA
(Ünvanı, Adı Soyadı)	

ONAY:

Tbp. Yzb. Serbülent GÜZEY'in..... tarihinde savunduğı bu tez, Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Sadettin ÇETİNER
Profesör Tabip Tümgeneral
GATF Dek. ve Eğt. Hst. Bştbp.

TEŞEKKÜR

Bu tez, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığı tarafından PL. CERR. AD. 3700-74-12/1570-74 sayılı emri ile verilmiş ve çalışılmaya başlanmıştır. Desferroksamin uygulamasının kemik greft iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi uzmanlık eğitimim süresince tecrübeleri ve değerli katkılarıyla beni yetiştiren, doğruları öğrenmem adına hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, hoşgörüsüyle zor dönemleri atlatmamda büyük pay sahibi olan, plastik cerrahi bakış açısına kavuşmamı sağlayan, iyi bir insan ve iyi bir plastik cerrah olabilmem için bana örnek olan, başta Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi AD. Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Selçuk IŞIK olmak üzere, öğretim üyeleri Doç. Dr. Mustafa NIŞANCI, Doç. Dr. Muhitdin ESKİ, Doç. Dr. Fatih ZOR, Yrd. Doç. Dr. Abdülkerim YAPICI'ya sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Beş yıllık asistanlık eğitimim süresince bana gösterdiği hoşgörü ve ilgi dışında çalışmanın gerçekleşmesinde çok kıymetli desteğini ve bilimsel tecrübesini esirgemeyen, karşılaştığım tüm sorunların üstesinden gelebilmem için bana destek olan Prof. Dr. Serdar ÖZTÜRK'e saygı ve minnetlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince öğretim üyesi vasfının yanında bir ağabey olarak her zaman desteğini hissettiğim Yrd. Doç. Dr. İsmail ŞAHİN'e, girdiğim tüm ameliyatlarda bütün bilgisini benimle paylaşan ve sorduğum her soruya bıkmadan cevap veren ağabeyim Op. Dr. Doğan ALHAN'a, uzmanlık eğitimim dışında tez döneminde de hep yanımda duran ve birçok sorunun beraber üstesinden geldiğimiz ağabeyim Op. Dr. Andaç AYKAN'a şükranlarımı sunarım.

Beş yıl boyunca bir arada çalışma fırsatı bulduğum Op. Dr. Salim İSKENDER, Op. Dr. Rezarta KAPAJ, Op. Dr. Murat POLAT, Op. Dr. Sinan ÖZTÜRK, Op. Dr. Fırat ÖZER, Op. Dr. A. Demirhan DAL, Dr. Sedat AVŞAR'a, bu süre içerisinde acı tatlı birçok anıyı beraber yaşadığımız dönem arkadaşım Dr. Tale Gasimov'a, yoğun ama bir o kadarda sıcak mesai ortamını benimle paylaşan hemşire, klinik personeli ve yanık merkezi personeline ayrıca teşekkür ederim.

Asistanlığım süresince yaptığım deneysel çalışmalarda bana yardımcı olan ve tezin deneysel aşamasında da mesai dışında fedakarca beraber çalıştığım başta Sağ. Bçvş. Enver KUTAY ve Vet. Dr. Emre ÇAVANA olmak üzere tüm AR-GE merkezi personeline minnetlerimi sunarım.

Plastik cerrahi eğitim sürecim boyunca çok fazla yanında olamasam da desteğini ve hoşgörüsünü hiç eksik etmeyen her zaman neşe ve umut veren sevgili eşim Ayşe Neylan'a, istemeyerekte olsa birçok kez ihmal ettiğim dünyalar tatlısı kızım Elif Defne'ye, bugüne gelmemede sonsuz emekleri olan her zaman arkamda hissettiğim canım aileme ve eşimin ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Serbülent GÜZEY

ÖZET

Kritik büyüklükte kemik defekti organizmanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki kemik içi defekti olarak bilinmekte ve onarımında kemik greft materyallerinin kullanımına ihtiyaç göstermektedir. Defekt boyutunun fazla olduğu ve alıcı sahada yetersiz vaskülarizasyon bulunan durumlarda ise serbest kemik greft materyallerinin kullanımı kısıtlanmakta, tedavide vaskülarize kemik greft uygulamaları ön plana çıkmaktadır. Mikrocerrahi teknikler yardımıyla osseöz fleplerin aktarımı her ne kadar rutin kullanımda yer bulmuş olsa da yöntemin zorluğu, oluşturduğu komorbiditeler ve komplikasyon oranları göz önüne alındığında her hastada aynı etkinlikte uygulanamayabilmektedir. Bu olguların onarımında ise defekt boyutunda azalma sağlayıcı teknikler ile greft inkorporasyonunu artırıcı yaklaşımlar tedavide önemli yer tutmaktadır.

Desferroksamin (DFO) uzun süredir sık transfüzyon uygulanan olgularda kronik demir birikiminin önüne geçmek amacıyla demir bağlayıcı bir şelatör olarak kullanılmaktadır. DFO'nin kemik iyileşmesi üzerinde oluşturduğu etkilere yönelik yapılan çalışmalarda "Hypoxia inducible factor 1" (HIF-1) seviyelerinde artışa bağlı VEGF sentezini arttırdığı ortaya konulmuştur. Bir büyüme faktörü olan VEGF'ün kemik dokusu üzerine oluşturduğu etkiler ise; vaskülariteyi artırma, osteoblastik aktiviteyi tetikleme ve osteoblastik dönüşümü stimüle etme yönündedir.

Bu çalışmada DFO uygulamasının kemik greft iyileşmesi ve kritik boyutlu kemik defektlerinde osteogenez üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamız için sıçan zigomatik ark kritik boyutlu kemik defekt modeli (5 mm.) seçildi. Deney hayvan sarfinin azaltılması için 350-400 gram ağırlığında 32 adet Sprague-Dawley sıçanın sağ taraftaki zigomatik arklarının çalışma, sol taraftaki zigomatik arklarının ise kontrol grubunu oluşturması planlanarak (sıçan=32, n=64), denekler 16'şar zigomatik arkta oluşan 4 gruba ayrıldı. Grup 1 deneklerde sağ zigomatik arkta defekt oluşturulmasını takiben karşı taraftan elde edilen kemik grefti ile onarım uygulanırken, operasyon öncesi 7. günden başlayarak 45. güne kadar devam eden 200 microM/300 microL dozunda DFO (Desferal 0.5g flakon, Novartis, İsviçre) enjeksiyonu yapıldı. Grup 2 denekler ise, Grup 1 deneklerin kontrol grubunu oluşturdu ve Grup 1 ile aynı sıçanların sol zigomatik arkında oluşturulan defektler

sağ taraftan elde edilen greftlerle onarıldı. Bu grup deneklerde 1. Gruptan farklı olarak DFO yerine %0.9 NaCl enjeksiyonu uygulandı. Grup 3 ve 4 deneklerde defekt oluşturulması sonrasında herhangi bir onarım yapılmazken, Grup 3 deneklerde postoperatif 45 gün süresince DFO enjeksiyonu, Grup 4 deneklerde ise %0.9 NaCl enjeksiyonu uygulandı.

Cerrahi prosedür sonrasında 1 ve 6. haftada 8'er sıçan, 12. haftada ise geride kalan 16 sıçan sakrifiye edilerek histolojik inceleme yapıldı. Histolojik değerlendirme aşamasında örnekler alınırken çevre dokuda oluşan vaskülarite ve iyileşme klinik olarak değerlendirildi. Bunun dışında sıçanlara 2, 4, 8 ve 12. haftalarda bilgisayarlı tomografi yardımıyla radyolojik görüntüleme uygulanırken, 12. haftanın sonunda Grup 1 ve 2 deneklere 3 nokta eğme testi yapılarak biyomekanik özellikleri analiz edildi.

Grup 3 ve 4 deneklerdeki kemik defekt boyutundaki azalmanın radyolojik değerlendirmesinde 4, 8 ve 12. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, Wilcoxon testi) farklılık izlendi. 1 ve 2. Grupta kemik greft hacminde oluşan değişikliklerin değerlendirmesinde ise tüm haftalarda istatistiksel farklılığın ($p<0.05$, Wilcoxon testi) bulunduğu saptandı. Histolojik değerlendirmede Grup 1 ve 3'te yer alan deneklerde kontrol gruplarına oranla tüm haftalarda artmış osteoblastik yoğunluk izlenirken, vaskülarite oranının da benzer şekilde fazla olduğu ($p<0.05$, Eşleştirilmiş T testi) gözlemlendi. Bunun dışında osteoblastik aktivitenin değerlendirmesinde tüm gruplarda 6 ile 12. hafta arasında belirgin bir düşüş gözlemlenirken, osteoklastik aktivitede ise 1 ve 6. hafta arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$, Eşleştirilmiş T testi) bulundu. 12. haftanın sonunda örneklerin biyomekanik incelemesi sonucunda Grup 1 deneklerde artmış kemik gücü izlenirken, yapısal değişiklik saptanmadı.

Çalışmada DFO uygulamasının kemik greft inkorporasyonunu arttırdığı ve kritik boyutlu kemik defektlerinde, defekt boyutunda azalmaya yol açtığı gösterildi. Bu yönüyle DFO gerek riskli bölgelerde greft inkorporasyonunu arttırma, gerekse vaskülarize kemik grefti aktarımı için uygun olmayan hastalarda defekt boyutunun ve alıcı sahanın greftle onarıma uygun şekle getirilmesi amacıyla kullanılabileceği düşünüldü. Bunun dışında DFO uygulanan Grup 1 sıçanlarda hacimsel artışa bağlı

kemik gücünde artma saptanırken, bu etkinin kortikal kemik greftlerinde erken dönemde başlayan mekanik destek azalmasını sınırlandırabileceği öngörüldü.

DFO tedavisinin şuan için sadece intravenöz ve intramuskuler yünden uygulanması sebebiyle lokal tedaviye yönelik ek çalışmaların yapılması durumunda klinik kullanımda kendisine yer bulabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Desferroksamin, kemik greft iyileşmesi, kritik boyutlu kemik defekti, osteoblast, anjiyogenez, biyomekanik.

Yazar adı: Serbülent GÜZEY

Danışman: Serdar ÖZTÜRK

SUMMARY

Critical-size bone defect is known the smallest size defect in the bone which can't heal spontaneously throughout the life of an organism and therefore bone graft materials are needed during the repair. The use of free graft materials are limited when the defect is large and there is insufficient vascularization. Therefore vascularized bone grafts are needed for these defects. Even though osseous flap transfer is used routinely with the advent of microsurgical techniques, it can't be applied effectively in all patients due to the difficulties of the method, co-morbidities and complication rates of technique. For this reason, techniques which help the reduction of the size of the defect and improve graft incorporation take a significant place in the treatment.

Desferoxamine (DFO) has been used for a long time as an iron chelator in order to prevent chronic iron overload in the cases where blood transfusion is applied frequently. The studies about the effects of DFO on bone healing show that DFO increases synthesis of VEGF by means of increased levels of "Hypoxia inducible factor 1" (HIF-1). As a growth factor, increasing the vascularity, triggering osteoblastic activity and stimulating the osteoblastic differentiation are the well-known effects of VEGF on the bone tissue.

In this study we aimed to research the effects of DFO application on bone graft healing and osteogenesis in the critical sized bone defects.

In this study rat zygomatic arch critical-size bone defect model (5 mm.) was used. Thirtytwo Sprague-Dawley rats, weighing between 350-400 gram, were utilized and in order to reduce the number of animals both zygomatic arches of each animal were used (right arches as experimental and left arches as control, rat=32, n=64). The animals were divided into four groups (16 zygomatic arches each). In Group 1, after forming a defect on the right zygomatic arch the repair was done with the bone graft that was transferred from the other side. In this group, 200 microM/300 microL dosage of DFO (Desferal 0.5g flacon, Novartis, Switzerland) was injected at the zygomatic arch region starting at the 7th day preoperatively and lasting until the 45th day following the operation. Group 2 animals formed the control group of Group 1. In Group 2, same defects as the Group 1 were created on

the left zygomatic arches of the rats and repaired with the grafts that were obtained from the right side. Unlike Group 1, in this group 0.9 %NaCl injection instead of DFO was performed during the same period. In Group 3 and 4 there was no repair after the formation of defects and the rats were treated with DFO and 0.9 %NaCl for postoperative 45 days, respectively.

After the surgical procedure, in the 1st and 6th weeks, 8 rats and in the 12th week the remaining 16 rats were sacrificed and histological examination was performed. During the sampling vascularity that was formed in the surrounding soft tissue and healing were grossly evaluated. Moreover, radiological evaluation of the rats was performed with computerized tomography at 2nd, 4th, 8th and 12th weeks. At the end of 12th week zygomatic arches of Group 1 and 2 were analyzed with 3 point bending test for biomechanical features.

In the radiological evaluation, the decrease in the size of bone defect in Group 3 and 4 animals were statistically significant ($p < 0.05$, Wilcoxon test) at the 4th, 8th and 12th weeks. In Groups 1 and 2, the evaluation of bone graft volume showed a statistical difference at all weeks. In the histological evaluation it was observed when compared with control groups there is an increase in osteoblast number in Groups 1 and 3 at all weeks, and similarly vascularity rate was also high ($p < 0.05$, paired-samples T test). On the other hand, in the evaluation of osteoblastic activity showed a significant decrease in all groups between 6th and 12th weeks and in osteoclastic activity there was a significant difference ($p < 0.05$, paired-samples T test) between 1st and 6th weeks. At the end of 12th week, as a result of biomechanical evaluation of the subjects, there we increased bone strength but no structural change in Group 1 rats.

In this study, it has been shown that DFO treatment increased bone graft incorporation and caused reduction in the defect size of critical-size bone defects. In this aspect, it has been thought that DFO might be used to increase graft incorporation in risky areas, and reduce the defect size in patients who are not suitable for vascularized bone graft transfer, and prepare the recipient area for grafting. In addition, increased bone strength was found to be associated with volume increase, so it has been foreseen that this effect can limit the decrease in mechanical support that starts in early stages of cortical bone grafts.

Since it is used only in intravenous and intramuscular aspects for now, it is thought that DFO treatment can find a place for itself in local treatment. However, additional investigations are needed for clinical application.

Key Words: Desferoxamine, bone graft healing, critical sized bone defect, osteoblast, angiogenesis, biomechanic.

Author: Serbülent GÜZEY

Counsellor: Serdar ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iv
SUMMARY	vii
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Kemik Dokusu	5
2.2.1. Primer ve Sekonder Kemik Dokusu	6
2.2.3. Periost ve Endosteum	8
2.3. Kemiğin Histolojik Yapısı	9
2.3.1. İnorganik matriks	9
2.3.2. Kemik Hücreleri	9
2.3.2.1. Osteoprogenitör Hücreler	9
2.3.2.2. Osteoblastlar	10
Şekil 2.4. Osteoblastik-osteositik farklılaşmanın basamakları	11
2.3.2.3. Osteositler	11
2.3.2.4. Osteoklastlar	12
2.3.2.5. Kemik Yüzeyini Döşeyen Hücreler	15
2.3.3. Organik Matriks	15
2.4. Kemik Embriyolojisi	17
2.4.1. Enkondral Kemikleşme	17
2.4.1.1. Primer Ossifikasyon Merkezi	17
2.4.1.2. Sekonder Ossifikasyon Merkezi	18

2.4.2. İntramembranöz Kemikleşme	18
2.5. Kemiğin Vaskülaritesi.....	19
2.6. Kemik İyileşmesi	19
2.6.1. Primer Kemik İyileşmesi.....	20
2.6.2. Sekonder Kemik İyileşmesi	21
2.6.2.1. İnflamatuar Evre.....	21
2.6.2.2. Tamir Evresi.....	22
2.6.2.3. Remodelizasyon Evresi.....	24
2.7. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler.....	24
2.7.1. Lokal Faktörler.....	24
2.7.1.1. Anjiyogenez	24
2.7.1.2. Moleküler Etkenler.....	26
2.7.2. Genel Faktörler.....	28
2.8. Kemik Graft Materyalleri.....	29
2.8.1. Otojen Kemik Graftleri	30
2.8.1.1. Otojen Kemik Graftlerinde İyileşme.....	31
2.8.2. Allojenik Kemik Graftleri	32
2.8.3. Ksenojenik Kemik Graftleri.....	35
2.8.4. Alloplastik Kemik Graft Materyalleri (AKGM)	35
2.8.4.1. Büyüme Faktörleri İçeren AKGM	35
2.8.4.2. Hücrel İçeriğe Sahip AKGM	35
2.8.4.3. Seramik AKGM	36
2.8.5. Kemik Graft İyileşmesini Etkileyen Faktörler.....	37
2.9. Desferroksamin	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Deney Modeli.....	42
3.2. Operasyon Tekniği.....	44
3.3. Deney Protokolü.....	49
3.4. Değerlendirme Yöntemleri.....	50
3.4.1. Klinik Değerlendirme.....	50
3.4.2. Radyolojik Değerlendirme	51
3.4.3. Biyomekanik Değerlendirme	52

3.4.4. Histolojik Değerlendirme.....	53
3.4.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	53
4. BULGULAR.....	55
4.1. Klinik Bulgular.....	55
4.2. Radyolojik Bulgular.....	57
4.3. Biyomekanik Bulgular.....	64
4.4. Histolojik Değerlendirme.....	67
4.4.1. Birinci Hafta.....	67
4.4.2. Altıncı Hafta.....	70
4.4.3. Onikinci Hafta.....	73
5. TARTIŞMA.....	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	86
7. KAYNAKLAR.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALP	:	Alkalenfosfataz
ATP	:	Adenozintrifosfat
BMP	:	Kemik morfogenetik protein
BT	:	Bilgisayarlı tomografi
Cbfa1	:	“Core-binding factor $\alpha 1$ ”
COX	:	Siklooksijenaz
DFO	:	Desferroksamin
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
FGF	:	Fibroblast büyüme faktörü
H&E	:	Hematoksilen eozin
HAp	:	Kalsiyum hidroksiapatit
HIF	:	“Hypoxia inducible factor”
HIV	:	“Human immunodeficiency virus”
IHH	:	“Indian hedgehog”
M-CSF	:	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MSCs	:	Mezenkimal kök hücre
OCIF	:	Osteoklastogenez inhibitör faktörü
ODF	:	Osteoklast diferansiasyon faktörü
PDGF	:	Platelet derive büyüme faktörü
PTH	:	Parathormon
TCP	:	Trikalsiyum fosfat
TGF	:	Transforme edici büyüme faktörü
TNF	:	Tümör nekroz faktörü
VEGF	:	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Uzun kemiklerin morfolojik ve histolojik yapısı	6
Şekil 2.2.	Kortikal kemiğin morfolojik yapısı	7
Şekil 2.3.	Kansellöz kemiğin morfolojik yapısı	8
Şekil 2.4.	Osteoblastik-osteositik farklılaşmanın basamakları	11
Şekil 2.5.	Osteoklast farklılaşması ve morfolojisi	14
Şekil 2.6.	Enkondral kemikleşme	18
Şekil 2.7.	Desferroksamin metansülfanatın kimyasal formülü.....	40
Şekil 2.8.	Fenton reaksiyonu	40
Şekil 2.9.	DFO-Prolil hidroksilaz- HIF-1 α ilişkisi.....	41
Şekil 3.1.	Sıçanların her iki zigomatik arkında 5 mm. uzunluğunda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektinin şematik görünümü	43
Şekil 3.2.	Deney ve kontrol gruplarının şematik görünümü.....	44
Şekil 3.3.	Gruplar ve çalışma programının şematik görünümü	50
Şekil 4.1.	Tablo 4.3'te yer alan değerlerin grafiksel görünümü	60
Şekil 4.2.	Grup 1 ve 2 deneklerde greft hacimlerinin gruplar arası karşılaştırılması	61
Şekil 4.3.	Tablo 4.6'da yer alan değerlerin grafiksel görünümü	63
Şekil 4.4.	Grup 3 ve 4 deneklerde defekt boyut ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması	64
Şekil 4.5.	Grup 1 ve 2'de yer alan deneklerin maksimum kırılma yük verilerinin istatistiksel grafiği.....	65
Şekil 4.6.	12 haftada kurban edilen bir denekin biyomekanik test sonuçlarının yük-deformasyon eğrisinde görünümü. (N: Newton).....	67

Şekil 4.7.	1. haftada elde edilen örneklerin istatistiksel değerlendirmesi.....	70
Şekil 4.8.	6. haftada elde edilen örneklerin istatistiksel incelemesi	72
Şekil 4.9.	1. ve 6. haftalardaki osteoklastik aktivite farkı	73
Şekil 4.10.	12. haftada elde edilen örneklerin istatistiksel değerlendirmesi.....	76
Şekil 4.11.	6 ve 12. haftalar arasında osteoblast sayılarının karşılaştırılması	76

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 3.1.	Desferroksamin metansülfonatın ticari formu olan Desferal 0.5 g flakon (Novartis, İsviçre).....	44
Resim 3.2.	Horizontal insizyon sonrasında yumuşak dokuların uzaklaştırılarak zigomatik arkın ortaya koyulması.....	45
Resim 3.3.	5 mm. uzunluğunda kritik boyutlu kemik defekti oluşturulacak alanın sınırlarının işaretlenmesi.....	46
Resim 3.4.	Tespit deliklerinin açılması.....	46
Resim 3.5.	Osteotomilerin yapılması.....	47
Resim 3.6.	Sağ ve sol zigomatik arkta elde edilen 5 mm. uzunluğunda kemik greftleri	47
Resim 3.7.	Kemik greftlerinin 7/0 prolene sütür yardımıyla fiksasyonu	48
Resim 3.8.	İnsizyon hatlarının sütüre edilmesi.....	48
Resim 3.9.	Sıçanlara 45 gün süresince gün aşırı DFO ve %0.9 NaCl enjeksiyonu uygulandı	49
Resim 3.10.	Zigomatik arkların eksizyonu	49
Resim 3.11.	Sıçanların radyolojik değerlendirmesi.....	51
Resim 3.12.	Kemik greft hacimlerinin değerlendirilmesi.....	52
Resim 3.13.	Biyomekanik değerlendirme.....	53
Resim 4.1.	Her iki zigomatik arkı çevreleyen yumuşak dokuda vaskülaritenin makroskobik değerlendirmesi.....	55
Resim 4.2.	6. haftada “non-union” ve rezorbsiyon izlenen Grup 2 deneğin 3 boyutlu BT görüntüleri	56
Resim 4.3.	Altıncı haftada deneklerin klinik değerlendirmesi	56

Resim 4.4.	Grup 1 ve 2’de yer alan deneklerin 12. haftadaki klinik değerlendirmesi.....	57
Resim 4.5.	12. hafta sonunda defekt alanların klinik değerlendirmesi.....	57
Resim 4.6.	Grup 1 ve 2’de yer alan bir denekteki kemik greft hacminin 2, 4, 8 ve 12. haftalardaki BT görüntüleri.....	58
Resim 4.7.	Grup 1 ve 2’de yer alan bir denekteki kemik greft hacminin “Mimics®” programı ile değerlendirilmesi.....	58
Resim 4.8.	Grup 3 ve 4’te yer alan bir denekteki defekt alanının 2, 4, 8 ve 12. haftalardaki BT görüntüleri	61
Resim 4.9.	1. haftada Grup 1 ve 2 deneklerin histolojik incelemesinde osteoblast yoğunluğunun değerlendirilmesi	68
Resim 4.10.	1. haftada Grup 1 ve 2 deneklerin histolojik incelemesinde vaskülarite miktarının değerlendirilmesi	69
Resim 4.11.	Grup 1 ve 2 deneklerden elde edilen örneklerin 6. haftadaki histolojik değerlendirmesi	71
Resim 4.12.	12. haftada Grup 1 ve 2 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi	75

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 4.1.	Grup 1'deki deneklerin greft hacimlerinin haftalara göre değişimi	59
Tablo 4.2.	Grup 2'deki deneklerin greft hacimlerinin haftalara göre değişimi	59
Tablo 4.3.	Grup 1 ve 2'de yer alan deneklerin greft hacimlerinin 2, 4, 8 ve 12. haftalardaki ortalama ve minimum, maksimum değerleri	60
Tablo 4.4.	Grup 3'teki deneklerin defekt alanlarının haftalara göre değişimi	62
Tablo 4.5.	Grup 4'teki deneklerin kritik büyüklükteki defekt alanlarının haftalara göre değişimi	62
Tablo 4.6.	Grup 3 ve 4'te yer alan deneklerin defekt alanlarının 2, 4, 8 ve 12. haftalardaki ortalama ve minimum, maksimum değerleri	63
Tablo 4.7.	Grup 1 ve 2'de yer alan deneklerin maksimum kırılma yük değerleri	65
Tablo 4.8.	Grup 1 ve 2'de yer alan deneklerin 12. haftanın sonunda maksimum kırılma yük ölçümlerinin ortalama ve minimum, maksimum değerleri	65
Tablo 4.9.	Grup 1 ve 2'de yer alan deneklerin katılık modülü değerleri	66
Tablo 4.10.	Grup 1 ve 2'de yer alan deneklerin 12. haftanın sonunda katılık modülü verilerinin ortalama ve minimum, maksimum değerleri	66
Tablo 4.11.	1. haftada Grup 1 ve Grup 2 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler	68

Tablo 4.12.	1. haftada Grup 3 ve Grup 4 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler	68
Tablo 4.13.	1. haftada deneklerden elde edilen örneklerin ortalama ve standart sapma değerleri	69
Tablo 4.14.	6. haftada Grup 1 ve Grup 2 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler	71
Tablo 4.15.	6. haftada Grup 3 ve Grup 4 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler	71
Tablo 4.16.	6. haftada deneklerden elde edilen örneklerin ortalama ve standart sapma değerleri	72
Tablo 4.17.	12. haftada Grup 1 ve Grup 2 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler	74
Tablo 4.18.	12. haftada Grup 3 ve Grup 4 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler	74
Tablo 4.19.	12. haftada deneklerden elde edilen örneklerin ortalama ve standart sapma değerleri	75

1. GİRİŞ

Kemik doku defektleri; sıklıkla geçirilmiş travmalar, konjenital anomaliler, enfeksiyonlar ve onkolojik rezeksiyonlar nedeniyle oluşmakta ve onarımı esnasında kemik greft materyallerinin kullanımına ihtiyaç duyulabilmektedir (1).

Küçük kemik defekti alanları “sekonder iyileşme” ile kapanabilirken belirli büyüklüğün üzerindeki defektler bu mekanizma ile kapanamazlar (2). Kritik büyüklükteki kemik defekti adı verilen bu defektler, organizmanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki kemik içi defekti olarak tanımlanmakta ve yeni kemik oluşumu yerine fibröz bir bağ dokusuyla dolma eğilimi göstermektedirler. Kemik iyileşmesine yönelik araştırmalarda deney modeli olarak sık kullanılan kritik boyutlu kemik defektlerine yönelik yapılan araştırmalarda, sıçanların kraniyal kemikleri için sınırın 6-8 mm. çapında, zigomatik arkı içinse 5 mm. uzunluğunda olduğu ortaya koyulmuştur (3, 4).

Kritik büyüklükteki kemik defektlerin kapatılması amacıyla birçok farklı teknik denenmiş olsa da tedavide altın standart yaklaşım otojen kemik grefti uygulamalarıdır (5). Otojen kemik greftleri vücudun bir bölgesinden alınıp ihtiyaç duyulan farklı bir bölgesine nakledilen canlı kemik grefti olarak bilinir. Biyo-uyumluluğunun en üst seviyede olması, immün cevap oluşturmaması, osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerin tümüne sahip olması otojen kemik grefti uygulamalarının en önde gelen avantajlarını oluşturmaktadır.

Otojen kemik greft dokusunun yerleştirilmesi sonrasında başlayan iyileşme süreci birçok farklı değişkene bağlıdır. Bu değişkenlerin başında ise; greft materyalinin tipi, mekanik stres, oryantasyon, periost varlığı, fiksasyon ve alıcı sahanın oluşturduğu etkiler gelmektedir (6). Greft iyileşmesi aşamasında etkin rol oynayan değişkenlerden biri olan alıcı sahanın iyileşme üzerine en önemli etkisi ise vaskülarizasyon yönüyle olmaktadır. Vaskülarizasyonun fazla olduğu veya stimüle edildiği durumlarda greft yaşayabilirliğinde artma olduğu yapılan farklı çalışmalarca gösterilmiştir (7-9).

Streptomyces pilosus tarafından üretilen bir çeşit siderafor olan Desferroksamin (DFO), sık transfüzyon uygulanan olgularda kronik demir

birikiminin önüne geçmek amacıyla “demir bağlayıcı bir şelatör” olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Bu etkisinin yanında DFO’nin bir hipoksik faktör olan “hypoxia inducible factor 1” (HIF-1) seviyelerinde artış oluşturduğu ve bu etkiye bağlı olarak nükleus seviyesinde “Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF)” sentezini stimüle ettiği saptanmıştır (10). Bir büyüme faktörü olan VEGF ise kemik iyileşmesi esnasında anjiyogenezi tetiklemesinin yanında osteoblastik ve osteoklastik aktiviteyi düzenleyerek osteogenez yönünde etki sağlamaktadır (11, 12).

DFO uygulamasının kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla distraksiyon osteogenez ve tibia defekt modelleri üzerine incelemeler yapılırken, bu çalışmalar sonucunda hem vaskülaritede hem de kemik hacminde anlamlı derecede artış olduğu ortaya konulmuştur (13, 14).

Bu çalışmada; DFO uygulamasının sırasıyla HIF-1 α ve VEGF seviyelerinde artışa bağlı anjiyogenezi tetikleyici, osteoblastik aktiviteyi düzenleyici ve serbest oksijen radikallerini azaltıcı etkilerinden faydalanarak kemik greft iyileşmesi ve kritik boyutlu kemik defektlerinde osteogenez üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Son 50 yıl içerisinde biyomateryal teknolojisindeki gelişmeyle birlikte otojen kemik greftlerinin yanı sıra kemik greft materyallerinin kullanımı artmış olsa da, bu uygulamanın temeli tarih öncesi çağlara uzanmaktadır. Milattan önce 3000’li yıllarda Güney Amerika Kıta’sında yaşayan yerlilerin kraniyal trepanizasyon sonrasında oluşan defektleri metal plaklar ve su kabağıyla onarımı, kemik defektlerinin onarımında yardımcı materyaller kullanımına ait saptanan ilk bulguları oluşturmaktadır.

Kemik defektlerinin onarımına yönelik ilk resmi kayıtlı uygulama ise 16. yüzyılda gerçekleşmiş olup, bu belgede kraniyal defekt bulunan bir hastaya altın plak kullanılarak kraniyoplasti operasyonu uygulandığı saptanmıştır (15).

17. yüzyıla gelindiğinde ise Amsterdamlı bir cerrah olan Job Janszoon Van Meekeren tarafından kemik ksenogreft uygulaması ortaya atılmıştır (16). Meekeren yaptığı bir sunuda; kraniyal bölgesine kılıç darbesi sonucunda kemik defekti oluşan ve köpek kalvaryumundan alınan greftle onarım uygulanan bir Rus asilzadesini bildirmiştir. Elde edilen bilgilere dayanarak her ne kadar hastanın takip eden dönemde tamamen iyileştiği öne sürülse de ksenogreft uygulaması sebebiyle hasta kiliseden aforoz edilmiştir (15).

1809 yılında Daniel Merrem (1790-1859) intrakraniyal operasyonlar esnasında çıkarılan kemik dokunun tekrar yerine koyulduğunda çevre dokuya tutunma gösterdiğine yönelik gözlemini sunmuş, bu bilgi o dönem için çok önemli bir etki oluşturmuştur. Bu noktadan yola çıkan Paul Bert gibi araştırmacılar hayvanlardan elde edilen greftler üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmaya başlamışlardır. Hayvan çalışmaları bir taraftan devam ederken 1872 yılına gelindiğinde Richard von Volkmann, Berlin’de düzenlenen bir toplantıda yaptığı konuşmada; ateşli silah yaralanmalı bir olguda kemik segmentlerinin anatomik pozisyonlarına yerleştirilerek bırakıldığında iyi derecede iyileşme gösterdiğini bildirmiştir. Volkmann’ın bu açıklamasıyla aynı dönemlerde bir başka araştırmacı olan Ollier, osteogenez üzerine yoğun araştırmalar yapmaya başlamıştır (17). Ollier

yaptığı araştırmalar sonucunda, immünoloji ile ilgili fazla bilgi bulunmamasına rağmen, cilt greftlerine benzer şekilde kemik dokuda da sadece otogreftlerin yaşama şansının olduğunu öne sürmüştür. Ayrıca bu çalışmaları esnasında periostun kemik rejenerasyonu için çok önemli olduğunu kemik grefti ile birlikte periostunda transfer edilmesi gerekliliğini vurgulamıştır. Ollier birçok prensibi tanımlamadığı halde otolog kemik grefti uygulamalarında başarıya ulaşamamıştır. Oysaki 1912 yılında bu teknikleri kullanan Macewen, humeral defekti bulunan bir çocukta ilyak kemik grefti kullanarak başarılı sonuçlar elde ettiğini bildirmiştir. Ollier’le aksi görüşlere sahip Viyanalı bir cerrah olan Michael Barth, 1893-1908 yılları arasında yaptığı farklı çalışmalarca Rus bir tıp öğrencisi olan Radzimowski’nin tezini destekler bulgular elde etmiş ve kemik grefti içerisindeki hücrelerin transplantasyon sonrasında büyük oranda canlılığını yitirdiğini öne sürerek osseos rejenerasyonun nekrotik kemik greftinin “creeping substitution” ile yer değiştirmesi sonucunda gerçekleştiğini ortaya atmıştır. Barth’ın bu görüşleri kısa süre içerisinde kendisine N.J. Baschkirzew ve N.N. Petrow gibi araştırmacılar tarafından destek bulurken, bu çalışmacılar kemik grefti iyileşmesinde fizyokimyasal stimülanların rol oynadığını belirtmenin yanında periostun bu süreçte ne derece etkin olduğu konusunda kesin bilgiler bulunmadığını vurgulamışlardır. 1908 yılında Axhausen ise transplantasyon sonrası periost içerisinde bulunan hücrelerin viabilitesinin devam ettiğini ve yüksek osteojenik aktiviteye sahip olduklarını bildirmiştir. 1914 yılında Dallas B. Phemister isimli araştırmacı “The Fate of Transplanted Bone” adlı yazısını yayımlamış ve hem periostun hem de endosteumun transplantasyon sürecinde canlılığını koruduğunu ortaya koymuştur (18). Phemister’in yapmış olduğu bu çalışma tüm dünya üzerinde kısa süre içerisinde kabul görmüş, William Edward Gallie ve D.E. Robertson’un çalışmalarıyla da desteklenmiştir (19). Bu çalışmada periostun vaskülarizasyon aşamasındaki öneminin yanı sıra kansellöz kemik greftlerinin surveyinin kortikallere kıyasla daha fazla olduğu da ortaya konulmuştur. Kansellöz kemik greftlerindeki bu artmış sağ kalım ise poröz yapı nedeniyle osteoblastların daha iyi difüzyona uğramasıyla ilişkilendirilmiştir. 1920 yılından itibaren kemik greft uygulamalarının temel prensipleri çizilmiş ve sıkça uygulanır hale gelmiştir. 1960’lı yıllarda ise son olarak Mowlem tarafından greftin aslında tamamen rezorbe olan inorganik bir yapı olmadığı, aksine canlı hücrelerin taşınmasına imkân tanıyan bir skafold olduğu öne

sürülmüştür (20, 21). Kemik greftlerine ait bu görüş halen güncelliğini korumakta ve kabul görmektedir.

16. yüzyıldan başlayan ve günümüze kadar süregelen farklı çalışmalar doğrultusunda otojen kemik greftleri hakkında detaylı bilgiler edinilmesinin yanında greftlerin inkorporasyonunun arttırılmasına yönelik yaklaşımlar ve alternatif tedavi metodları tanımlanmış ve tanımlanmaya devam edilmektedir. Kemik greft materyallerinin kullanımına olan ihtiyaç fazlalığı ise bu yönde yapılan çalışmaların uzun bir süre daha devam edeceğinin başlıca göstergesi olarak kabul edilebilir.

2.2. Kemik Dokusu

Kemik; insan vücuduna yapısal destek sağlayan, altta yatan organları koruyan, mineral rezervuarı oluşturan, kas ve tendonların tutunmasına imkân tanıyarak destek doku olarak hareketi sağlayan, dinamik, konnektif bir bağ dokusudur (6). Bu görevlerin dışında kemik doku hematopoez ve sinüsler yardımıyla sesin tonunun düzenlenmesi sırasında da aktif rol oynamaktadır.

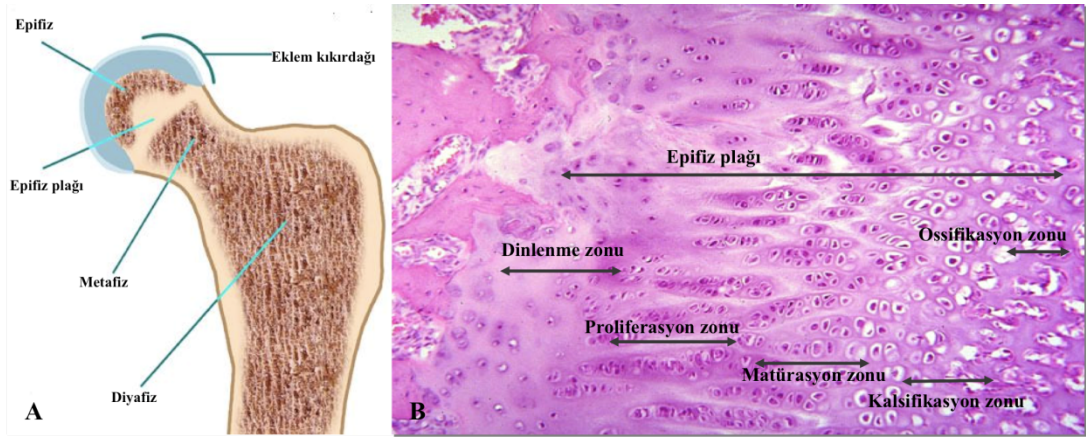
Kemik dokusu belli bir rejeneratif potansiyele sahip olup özellikle mekanik etkiler kemiğin şekillenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu etkilerle ilişkili olarak hacimsel olarak artma veya azalmalar gözlenebilirken edinsel şekil bozuklukları da ortaya çıkabilmektedir (22).

Yetişkin bir insanda 206 kemik bulunurken yeni doğanda bu sayı 300'e kadar ulaşmaktadır. Bu kemikler eklemler vasıtasıyla 2 ana bölümde incelenen iskelet sisteminin oluşumunu sağlamaktadır (23). İskelet sisteminin aksiyel kısmını (skelaton capitis, os hyoideum, columna vertebralis, skelaton thoracis) oluşturan toplam 80 adet kemik bulunurken, appendiküler iskelet (ossa membri superioris, ossa membri inferioris) ise 126 kemik tarafından oluşturulmaktadır (23).

Anatomik yerleşimine göre yapılan bu sınıflamanın yanı sıra kemiklerin bir diğer sınıflaması ise anatomik şekline göre tanımlanan sınıflamadır. Buna göre kemikler 5 farklı başlık altında gruplara ayrılmıştır. Bunlar;

- Uzun kemikler (örn: humerus)
- Kısa kemikler (örn: karpal kemikler)
- Yassı kemikler (örn: kalvarium kemikleri)
- Düzensiz (İrregüler) kemikler (örn: sfenoid kemik)
- Sesamoid kemikler (örn: patella) olarak bilinmektedir.

Uzun kemikler; orta kısımda yer alan diyafiz, her iki uç kısımda bulunan epifiz ve ikisi arasında yerleşim gösteren metafiz olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır (22, 24). Epifiz bölümü kemiğin boyuna büyümesinde başlıca sorumlu alan iken içerisinde dinlenme, proliferasyon, matürasyon, kalsifikasyon ve ossifikasyon alanlarını içermektedir (Şekil 2.1). Kemiğin enine büyümesi ise periost içerisinde yer alan hücrelerdeki osteoblastik aktivite artışı ile gerçekleşmektedir.



Şekil 2.1. Uzun kemiklerin morfolojik ve histolojik yapısı

A) Uzun kemiklerin yapısında yer alan metafiz, diyafiz ve epifiz bölgeleri. **B)** Epifiz plağının boyuma büyümesi esnasında gözlemlenen histolojik tabakalar.

2.2.1. Primer ve Sekonder Kemik Dokusu

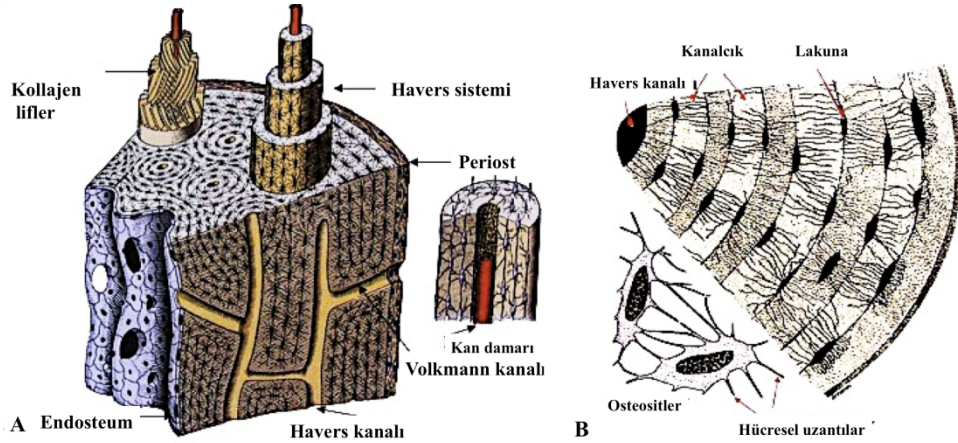
Kemiklerin sınıflamasında kullanılan bir diğer yaklaşım şekli de makroskobik ve mikroskobik yapıları doğrultusunda olan sınıflamadır. Mikroskobik yapısına göre kemikler *primer-immatür kemik* ile *sekonder-matür kemik* olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Primer kemik intrauterin hayatta şekillenirken geçici bir yapı olup ileriki dönemde sekonder kemiğe dönüşüm gösterir. Bu kemik yapısında kollajen lifleri rastgele, örgümsü dizilim sergiler ve bu dizilim süngerimsi bir yapının ortaya çıkmasına yol açar. Kollajen dizilimi dışında primer kemik içerisinde mineralizasyon oranı az, hücre yoğunluğu ise fazladır.

Sekonder kemik ise primer kemiğin olgun formu olup, kollajen lifleri birbirine paralel dizilim gösterir. Bu tip kemikte hücre yoğunluğu azalmış ve matriks mineralizasyonu tamamlanmıştır. Kafatası suturaları, alveoler bölgeler ve tendon yapışma noktaları dışında kalan bölgelerde kemik dokusu sekonder yapı sergilemektedir (25, 26).

2.2.2. Kortikal ve Kansellöz Kemik Dokusu

Makroskobik yapısına göre ise kemikler 2 alt grup içerisinde incelenmektedir. Bunlar kortikal (solid, kompakt kemik) ve kansellöz (trabeküler, spongiyöz) kemiklerdir.

Kortikal kemik; homojen ve kompakt bir yapı sergilemektedir. Yassı kemiklerin iç ve dış tabakaları ile uzun kemiklerin dış yüzünü oluşturur (27, 28). Her zaman sekonder kemik formundadır. Kortikal kemikler yapısı içerisinde kemiğe paralel uzanan “*Havers kanallarını*” barındırırlar. Bu kanallar içerisinde kemiğin beslenmesinde önemli rol oynayan vasküler yapılar geçer. Kollajen lifleri havers kanalları etrafında dairesel lameller şeklinde dizilim gösterirken sayıları 4-20 arasında değişen bu lamellere “*Havers lamelleri*” denir. Bu kanal ve lameller sistemlerin bir arada oluşturduğu yapı ise “*Osteon*” veya “*Havers sistemi*” olarak bilinmektedir. Bu sistem eksene paralel uzanım gösterirken kemik eksenine dik uzanım gösteren bir diğer kanal sistemi mevcut olup “*Volkman kanal*” sistemi adıyla bilinmektedir. Volkman kanalları periosttan kemik iliğine kadar horizontal planda uzanım göstermekte, bu sayede havers sistemi içerisinde bulunan vasküler yapılar ile periost birbirleri ile ilişki kurabilmektedir (Şekil 2.2).

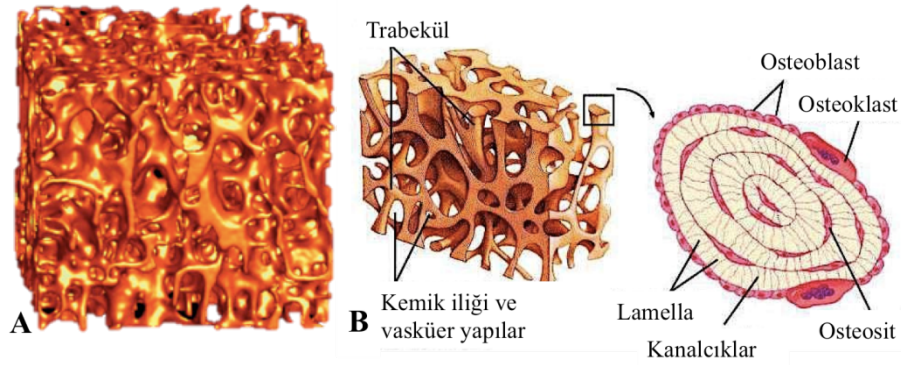


Şekil 2.2. Kortikal kemiğin morfolojik yapısı

A) Uzun eksene paralel seyreden Havers kanalları ve eksene dik seyreden Volkman kanallarının görünümü. **B)** Paralel ve farklı yönlerde dizilim gösteren kollajen liflerinden oluşmuş lameller yapının görünümü. (Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter eight, page: 144-146, 203).

Erişkin insan iskeletinin yaklaşık %80'ine yakını kompakt kemikten oluşurken, kemiğin bünyesinde barındırdığı mekanik güç başlıca osteonların sıkı dizilimine bağlıdır (28-30).

Kansellöz kemik dokusu; birbirleriyle ilişkili olan trabeküler yapılardan oluşmaktadır. Kortikal kemiğin iç yüzeyindeki kavitede yerleşim gösterir ve yapısındaki boşluklarda hematopoetik elemanlar içerirler. Kortikal kemiğe destek sağlayan kansellöz kemik mikroskobik olarak sekonder kemik yapısında olup Havers ve Volkmann kanalları içermez (Şekil 2.3). Beslenmesini trabeküller arasında bulunan kanaliküller yardımıyla kemik iliğinden sağlar. Erişkin bir insandaki kemik dokusunun kortikal kemik dışında kalan %20'lik kısmı spongiyöz kemik yapısındadır ve bu tip kemikler mekanik etkilere karşı dayanıksız, travma karşısında kolaylıkla kırılabilir bir yapı sergilemektedir (28, 30, 31).



Şekil 2.3. Kansellöz kemiğin morfolojik yapısı

A) Kansellöz kemiğin trabeküler yapısının görünümü. **B)** Kansellöz kemiğin trabeküler yapısının kesitsel görünümü ile kemik iliği ve kan damarlarının örgülü yapı içerisinde yerleşimi.

2.2.3. Periost ve Endosteum

Kemiğin en dış yüzeyinde periost adı verilen bir bağ dokusu katmanı bulunur (32). Periost başlıca iki tabaka olup kemik iyileşmesinde ve anjiyogeneizde önemli rol oynar. Dış tabaka (stratum fibrosum) kollajen ve fibrosit benzeri hücrelerden oluşmuş fibröz bir karakter sergilerken “*Sharpey lifleri*” denilen uzantılar sayesinde kemiğe tutunma gösterir (25). İç tabaka (stratum osteogenicum) ise kemiğin enine büyümesinde rol oynayan osteoprogenitör hücreler içerir.

Kompakt kemiklerin iç yüzünü ve spongiöz kemiklerin yüzeyini örten tek katlı bağ dokusu tabakası ise “*endosteum*” olarak adlandırılır. Endosteum tabakasıda

periost benzeri osteoprogenitör hücreler içerir ve kemik şekillenmesi sürecinde aktif rol oynar (33).

2.3. Kemiğin Histolojik Yapısı

Olgunlaşmış kemik yapısının %93'ü solid yapılardan, %7'si ise sudan oluşurken, solid kısım başlıca inorganik matriks, kemik hücreleri ve organik matriksten oluşmaktadır.

2.3.1. İnorganik matriks

Kemik dokusunun solid kısmın %70'lik bölümü inorganik bileşenler tarafından oluşturulur (34). İnorganik bileşenlerin başında kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonat gelirken, bunların dışında bir miktar bikarbonat, sodyum, potasyum, magnezyum ve sitrat da bulunmaktadır (23).

İnorganik matriksin temel yapı taşı olan kalsiyum fosfat (hidroksiapati kristalleri) kollajen yığınları arasına dağılmış olarak izlenir. Kemiğin sertliğini kollajen ile hidroksiapati kristalleri arasında bulunan bu ilişki sağlar. Eğer kemik dekalsifiye edilirse şekli korunmakla beraber kolay bükülebilir, esnek bir forma kavuşur (35). Kemiğin sert yapısının temelinde kristal yapı karakteri yatarken, dayanıklılığı ise kollajen desteği tarafından sağlanmaktadır. Osteogenesis imperfecta gibi kollajen sentezi bozukluklarında kırılmaya eğilimli kemik yapısının ortaya çıkmasının zemininde de bu mekanizmada ortaya çıkan aksaklıklar yatmaktadır.

2.3.2. Kemik Hücreleri

Kemiğin içerisinde yer alan başlıca hücresel elemanlar; osteoklastlar, osteoblastlar, osteositler ve kemik yüzeyini döşeyen hücrelerdir (27). Bu hücrelerin dışında periostun iç tabakası ile endosteumda bulunan osteoblastlara dönüşebilme özelliği bulunan mezenkimal kökenli osteoprogenitör hücreler de mevcuttur (36).

2.3.2.1. Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler; embriyonik mezenkimden köken alan işsi yapıdaki hücrelerdir. Periostun cambium tabakası ile endosteum tabakalarında bulunan hücreler, kemik iliği stromasındaki multipotansiyel mezenkimal hücrelerin

farklılaşmasıyla ortaya çıkarlar (6, 31, 37-39). Büyüme, travma veya endokrin etkiler sonucunda aktifleşebilen bu öncü hücreler iyi vaskülarize olan bölgelerde preosteoblastlara dönüşüm gösterirken, vaskülarizasyonun yetersiz olduğu bölgelerde ise kondroblast yönünde farklılaşma eğilimine sahiptirler (6). Osteoprogenitör hücreler özellikle yoğun kemik büyümesi esnasında aktif rol oynamaktadır.

2.3.2.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar; bazofilik boyanım gösteren, yuvarlak kemik hücreleridir (6). Osteoblastların bazofilik boyanması içerdiği geniş endoplazmik retikulum yapısı sebebiyle gerçekleşmekteyken, endoplazmik retikulum dışında hücresel organel olarak bol miktarda serbest ribozom ve poliribozom içermektedirler (6, 31).

Osteoblastların başlıca görevi “*osteoid*” adı verilen mineralize olmamış kemik matriksi oluşturan tip 1 kollajen, proteoglikan ve glikoprotein üretimi yapmaktır. Osteoblastlar kemik matriks üretimi yanında, sitokin ve büyüme faktörü üretiminde de aktif rol oynamakta olup yüzeylerinde parathormona (PTH) özel reseptörler barındırırlar (39). PTH kemik üzerine katabolizan bir etki yaratırken bu etkisinin birinci basamağını ise paradoksal olarak matriks yapımından sorumlu hücreler olan osteoblastlar oluşturmaktadır. Osteoblastlar, PTH’un osteoklastları uyarma aşamasında varlıkları şart olan hücrelerdir ve yüzeyinde bulunan PTH reseptörlerinin uyarımı durumunda “*Osteoklast stimulan faktörü*” salgılayarak kemik rezorbsiyonunu dolaylı yoldan tetiklemektedirler (40).

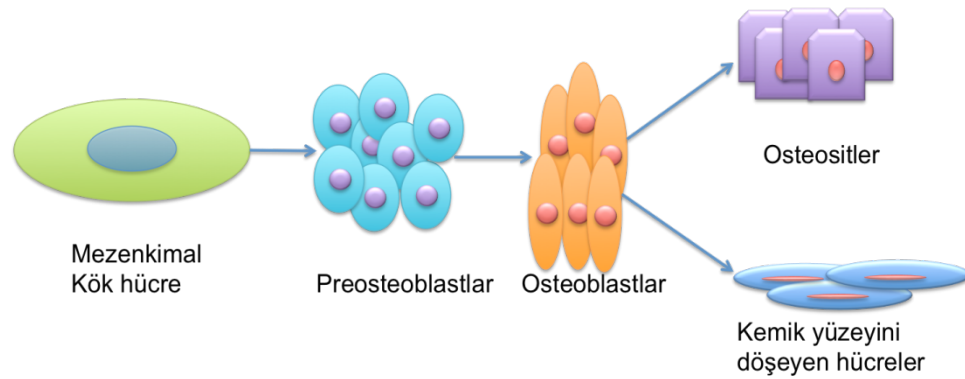
Osteoblast farklılaşmasının temelinde mezenkimal kök hücreler yer almaktadır. Bu hücrelerin aktivasyonu ile birinci aşamada preosteoblastlar oluşur. Preosteoblastlar kemik üretimi esnasında osteoblastlara bir iki hücre mesafede yer alırlar ve alkalen fosfataz (ALP) sentezleme kabiliyetine sahip olup matriks mineralizasyonunda görev alabilirler (6). ALP matriksin kalsifikasyon sürecinde rol alan önemli bir enzimdir. Bu enzim fosfatın hidroliziyle inorganik fosfat konsantrasyonunu arttırırken, bunun kalsiyum iyonları ile birleşmesiyle kalsiyum tuzları halinde dokuya çökmesinde rol oynamaktadır.

Osteoblastik farklılaşma 2 farklı gen ürünü tarafından kontrol edilmektedir. Bu genler sırasıyla “*Indian hedgehog*” ve “*Core-binding factor $\alpha 1$* ”’dir (6).

Core-binding factor $\alpha 1$ (Cbfa1): Bir transkripsiyon faktörüdür. Osteoblastik farklılaşmanın en erken ve en spesifik belirtecidir (41). Cbfa1'in fibroblast gibi osteoblastik olmayan hücreler üzerinde ektopik ekspresyonu, osteokalsin gibi osteoblastlara özel proteinlerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir (42). Bunun yanı sıra Cbfa1 geninin silindiği farelerde kemikleşmenin gerçekleşmediği, kıkırdak iskelet oluşumunun ortaya çıktığı izlenmiştir. (43, 44).

Indian hedgehog (IHH): Bir büyüme faktörü olup osteoblast ve kondrosit diferansiasyonunda rol almaktadır. Eksikliğinde enkondral kemikleşmede osteoblast oluşumu izlenmezken, intramembranöz kemikleşmede osteoblastların bulunduğu gözlemlenmiştir (20). Şuan için etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da osteoblast farklılaşmasında çok önemli rol üstlendiği düşünülmektedir (6, 45).

Osteoblast farklılaşmasının bir sonraki basamağı ise osteosit veya kemik yüzeyini döşeyen hücre oluşumudur (Şekil 2.4). Olgun osteoblastların %10-20 arasında bir kısmı kemik matriks ile ilişkilenecek osteosit formuna dönüşüm göstermektedir (46, 47).



Şekil 2.4. Osteoblastik-osteositik farklılaşmanın basamakları

2.3.2.3. Osteositler

Osteositler; kemik matriks içerisinde yer alan, lakünalar içine yerleşmiş osteoblastların matür, metabolik olarak aktif olmayan formlarıdır. Kemiğin her mm³'ünde 20.000-30.000 arasında osteosit bulunmaktadır. Esas fonksiyonları bilinmemekle birlikte her bir osteositten çıkan sitoplazmik uzantılar yardımıyla bir ağ oluşturup, komşu osteositler ve periost ile iletişim kurmaktadır (6, 29). Bu

bağlantılar yoluyla oluşan mekanik yükün taşınmasında rol oynadıkları öngörülmektedir.

Osteosit farklılaşma mekanizması tam olarak ortaya konulamamış olup, metabolik aktivitenin azaldığı durumlarda intrasellüler osteoblastların organel oranında azalma olduğu ve sonuçta osteositlerin ortaya çıktığı düşünülmektedir. Osteosit oluşumu osteoblastların farklılaşmasıyla gerçekleşirken bunun tam tersi dönüşümün olabileceği öne sürülse de şüana dek gösterilememiştir.

Osteositler kemiğin mekanik yüklere karşı verdiği tepkide önemli bir rol almaktadır. 1892 yılında Wolfe tarafından tanımlanan ve “*Wolfe kanunu*” olarak bilinen bu kanunda mekanik yük karşısında kemiğin geometrisinin ve hacminin değiştiği savunulmaktadır (48). Wolfe kanununa göre mekanik yük artışı kemik içerisinde yer alan sıvının kanallar sisteminden kaçışına yol açarken bu kaçış mekanosensöriyel bir hücre olan osteositleri uyarmakta ve osteositler tarafından biyokimyasal sinyalleri oluşturan prostoglandin, nitroz oksit gibi ikincil ara maddelerin salınımına yol açmaktadır (6, 49-53). Bu sitokinlerde osteoprogenitör hücre grupları üzerinden kemik remodelizasyon sürecini aktifleyip kemik hacminin değişmesine sebep olmaktadır.

Osteositlerin kemik remodelizasyon süreci üzerine bir diğer etkisinin ise apoptoz yoluyla olduğu düşünülmektedir (53). Osteosit apoptozu; radyasyon, ilerlemiş yaş, ovaryan hormon değişiklikleri yanında azalmış veya çok fazla artmış mekanik yük ile yakın ilişkilidir. Fizyolojik dozlar dâhilindeki mekanik yük kemik remodelizasyonunu stimüle ederken, yük oranında aşırı artma veya azalma apoptozu tetikleyerek kemik rezorbsiyonuna yol açmaktadır (44, 54).

2.3.2.4. Osteoklastlar

Kemik gelişimi, fraktür onarımı ve kalsiyum hemostazı için gerekli olan kemik rezorbsiyonundan sorumlu hücrelerdir (6). Çoğunlukla endosteal ve periosteal yüzeylerde “*Howship lakünaları*” içerisinde bulunurlar. Yüzeylerinde kalsitonin reseptörü içerirler (55). Kalsitonin, preosteoklast ile osteoklast üzerine oluşturduğu doğrudan etki ile kemik yıkımını ve kalsiyumun salınımını azaltır (31).

Osteoklastlar hematopoetik mononükleer/fagositik seri hücrelerinden köken alırlar (Şekil 2.5A) (56-62). Bu sebeple prekürsörleri kemik iliği dalak, akciğer,

periton ve kanda da bulunabilmektedir (56). Diferansiyasyon aşamasında “*Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF)*” major rolü oynar (63). Bu faktörün baskılandığı fare deneylerinde az sayıda osteoklast oluşumu izlenirken, osteopetrotik fareler elde edilmiştir (64, 65). M-CSF dışında osteoklast farklılaşmasında tanımlanan birçok farklı transkripsiyon faktörü (PU.1, c-fos) bulunmakla birlikte bunların başlıcaları; “*Osteoklast diferansiyasyon faktörü*” ve “*Osteoklastogenez inhibitör faktör*”dür.

Osteoklast diferansiyasyon faktörü (ODF): Osteoprotegrin ligand olarak bilinir. TNF ailesinin bir üyesidir. ODF’nün üretimi 1 α ,25-dihidroksivitamin D3, deksametazon, IL-1, PG-E₂ ve PTH tarafından düzenlenir. M-CSF varlığında osteoklast maturasyonu için tek gerekli olan madde ODF’dür (6, 66).

Osteoklastogenez inhibitör faktör (OCIF): Osteoprotegrin olarak bilinir. Çözünebilir bir reseptördür ve stromal hücreler tarafından üretilir. ODF’ne yüksek afinite gösterir ve ODF’nü inaktive ederek etki sağlar.

Kemik rezorpsiyonu osteoklastik aktivitenin bir sonucu olup kompleks olaylar zinciri sonucunda oluşmaktadır. Rezorpsiyon esnasında aktive olan bir osteoklast başlıca 4 morfolojik bölge içermektedir:

1)*Bazal bölge*: Howship lakünasına en uzak bölgede yerleşir ve organellerin büyük kısmı bu alan içerisinde yer alır.

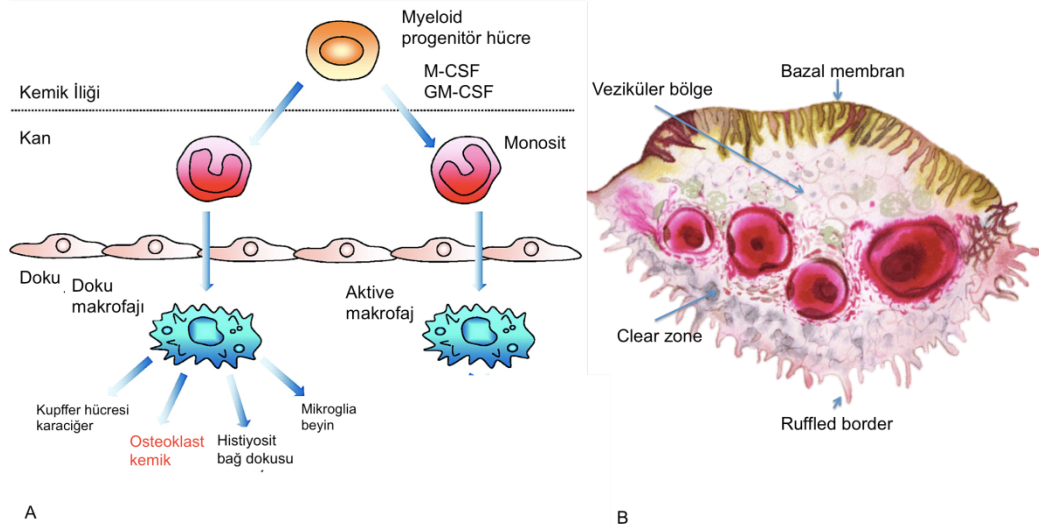
2)*“Ruffled border”*: Kemik rezorpsiyonunda aktif rol oynayan bölgedir. Fırçamsı uzantılar içerirken, rezorpsiyon alanlarında sıkça konfigürasyon değişikliği gösterirler.

3)*“Clear” bölge*: “Ruffled border”ı çevreleyen alandır. Organel bulunmaz. Çok sayıda aktin mikroflamanı içerir ve bu flamanlar aktin halkasının oluşumunda rol oynar.

4)*Veziküler bölge*: Bazal bölge ile “Ruffled border” arasında yer alır. Bol miktarda endo ve egzositik vezikül içerir. Lizozomal enzimlerin sentezini sağlarken yıkım ürünleri de bu bölge toplanmaktadır (Şekil 2.5B) (35).

Kemik rezorpsiyonu esnasında öncelikle osteoklastların aktive olup ortama göçü gerçekleşirken takiben yapışma, membran polarizasyonu, hidroksiapati çözülmesi, organik matriks degradasyonu, debrislerin uzaklaştırılması ve hücrel inaktivasyon basamakları ortaya çıkar. Bu süreç içerisinde osteoklastların nasıl

aktive olup göç ettikleri ise net olarak bilinmemekle birlikte hasarlı alandan salınan sitokinlerin bu aşamada önemli rol oynadığı öngörülmektedir.



Şekil 2.5. Osteoklast farklılaşması ve morfolojisi

A) Kemik iliği kaynaklı progenitör hücrelerden osteoklast oluşum şeması. **B)** Kemik rezorpsiyon sürecindeki aktive bir osteoklastın morfolojik görünümü.

Osteoklastlar migrasyonu takiben rezorbe olacak alanın çevresinde kemik matriksinden yoğun bir bariyer oluşturulur (“sealing zone”) ve bu bariyer diğer kısımların rezorpsiyonunu önler. Bu alan oluşuktan sonra osteoklast içinde yer alan karbonik anhidraz enzimi yardımıyla karbondioksit ve su birleşerek karbonik asit oluşumu gerçekleştirilir. Oluşan karbonik asit ise bir sonraki aşamada H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrılır. “Ruffled border”da yer alan proton pompaları tarafından ortama salınan hidrojen iyonu ortamda asidik bir PH oluşumuna yol açarken, asidik ortam matriksin inorganik komponentinin çözülmesine sebep olur. Ortaya çıkan iyonlar osteoklast tarafından rezorbe edilir ve aynı esnada organik komponentin yıkılması için ortama hidrolaz ve metalloproteinazlar salınır. Organik komponent yıkım ürünleri de benzer şekilde endositoz ile osteoklast içerisine alınır ve yapı taşlarına ayrıldıktan sonra komşu kapillerlere salınır (35, 67, 68).

Osteoklastların etkilerini bifosfonatlar, kalsitonin ve östrojen azaltırken, paratiroid-tiroid hormonları ve D vitamini artırır (25, 27, 31, 37, 40). Ortalama

yaşam süreleri 3-4 hafta olan bu hücrelerin apoptozunu uyaran başlıca faktörler ise östrojen ve TGF- β_2 'dir (40).

2.3.2.5. Kemik Yüzeyini Döşeyen Hücreler

Kemik yüzeyinde yer alan yassı, ince, uzun yapıda hücre tipleridir. Sıklıkla aktif remodelizasyon veya sentez olan bölgelerde bulunmazlar. Genel görüş osteoblastların inaktif bir şekli oldukları yönündedir. Her ne kadar aktif osteoblasta dönüşebilecekleri düşünülse de şuana dek bu ispatlanamamıştır (38, 69).

Kemik ile ekstraselüler sıvı kompartmanı arasında bariyer görevi gördükleri ve yeni kemik oluşumu ya da rezorbsiyonunun hangi bölgede gerçekleşeceğini düzenledikleri tahmin edilmektedir (70).

2.3.3. Organik Matriks

Başlıca kollajen, fosfoprotein ve proteoglikan gibi protein yapılarından oluşur. Bu proteinler kemiğe özel olmamalarına rağmen bulunma oranları ve kalsiyumun birlikteliği nedeniyle rejenerasyon ve remodelizasyon aşamasında önemli rol alırlar.

Kemik organik matriksinin %90'lık kısmını majör olarak osteoblastlardan sentezlenen kollajen oluşturmaktadır. Asıl görevi kemiğin primer skafoldunu oluşturmak ve kemiğe esnekliğini sağlamak olan kollajenin kemik dokusunda bulunan baskın formu; 2 adet alfa-1 ve 1 adet alfa-2 zincirinden oluşan tip 1 yapısındadır. Tip 1 kollajen dışında kemik dokusu içerisinde az miktarda tip 5 kollajende yer almaktadır (6).

Kollajen sentezinin birinci basamağı ribozomlarda gerçekleşir ve nükleusta sentezlenen mRNA'nın translasyonu sonucunda pre-pro-kollajen sentezi oluşur. Pre-pro-kollajen yapısı granüllü endoplazmik retikulum içerisinde prolil 4-hidroksilaz, prolil 3-hidroksilaz ve lizil hidroksilaz tarafından hidroksillenirken, enzimler hidroksilasyon için askorbik asit, Fe⁺², α -ketoglutarat ve moleküler oksijene ihtiyaç duyarlar. Öncül proteinlerin hidroksillenmesi sonrasında sitozole salınım oluşur ve burada glikozilasyon aşaması gerçekleşir. Glikolizasyonu takiben sitozol içerisinde 3 tane alfa zincirinin birleşmesi sonucunda prokollajen formuna dönen proteinler üçlü heliks şeklinde ekstraselüler alana salınırlar. Ekstraselüler bölgede ilk aşamada N ve

C uçlarındaki spesifik protein yapıları kesilerek tropokollajen formunu alırlar. Bu tropokollajenlerin içerisinde yer alan lizinler arasında çapraz bağların kurulması sonucunda da olgun kollajen yapısı ortaya çıkar.

Kemiğin organik matriksinin içerisinde kollajen dışında en az 7 farklı nonkollajen fosfoprotein bulunmaktadır. Bu nonkollajenöz fosfoproteinlerin rolü tam olarak bilinmese de birçok farklı görüş mevcuttur. İn vitro mineralizasyon çalışmalarında kollajen, ALP, osteonektin ve osteopontin ekspresyonunun mineralizasyon öncesinde artış gösterirken, kemik sialoprotein ekspresyonunun aynı anda, osteokalsin ekspresyonunun ise mineralizasyon sonrasında gerçekleştiği ortaya konulmuştur (71-73).

Nonkollajenöz fosfoproteinlerden *ALP*; osteoprogenitör hücrelerin migrasyonu, adezyonu ve diferansiasyonunda rol oynamasının yanında ekstrasellüler matriksin mineralizasyonunda da görev yaptığı saptanmıştır (74). Bir başka fosfoprotein olan *Osteonektin* ise kalsiyum ve tip 1 kollajen bağlayıcı özelliği mevcut olup kalsiyum “turnover”ı, kemik mineralizasyonu ve remodelizasyonunda önemli görev oynadığı düşünülmektedir (73, 75). *Osteopontin* de osteonektine benzer şekilde kalsiyum bağlayıcı özelliğe sahip olmasına rağmen mineralizasyonda görevli olduğu düşünülmemektedir. Bunun başlıca nedeni ise farelerde yapılan çalışmalarda osteopontin eksikliği bulunması durumunda kemik mineralizasyon defektinin ortaya çıkmamış olmasıdır (76, 77).

Kemik sialoproteini ise osteopontine çok benzer fakat ondan farklı olarak öncelikle osteoblast, osteosit gibi kemik hücrelerinde eksprese edilmektedir (78). Bu nedenle kemik sialoproteini kemik dışında ektopik odaklarda izlenmez. Tam olarak görevi bilinmemekle birlikte hücre adezyonunda görev aldığı düşünülmektedir (6, 73).

Osteokalsin, Kemik Gla proteini olarakta bilinen başlıca olgun osteoblastlardan sentezlenen ve bu aşamada K vitaminine ihtiyaç gösteren bir ekstrasellüler matriks proteinidir. Bu molekül kalsiyum ve diğer minerallere yüksek afinite gösterirken, kemik “turnover”ında önemli rol oynar. Eksikliğinde farelerde osteopetrozis oluşumu gözlemlenmiştir (79, 80).

Bunların dışında ekstrasellüler matriks içerisinde bol miktarda proteoglikan da içermektedir. Bu moleküller matriks organizasyonunda görevlidirler. *Biglican*; en çok

bulunan proteoglikan olup hidroksiapati kristalleri oluşumunda düşük dozlarda aktive edici, yüksek dozlarda ise inhibe edici bir etki oluşturur (81).

2.4. Kemik Embriyolojisi

Kemik oluşumu enkondral ve intramembranöz olmak üzere iki şekilde gerçekleşir.

2.4.1. Enkondral Kemikleşme

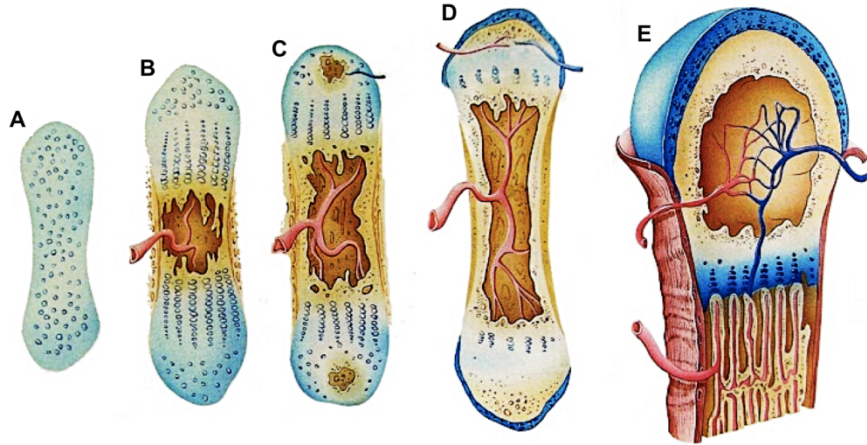
Enkondral kemikleşme primer ve sekonder ossifikasyon merkezlerinin oluşması sonrasında, hyalin kartilaj dokusunun kemik dokuya dönüşümü yoluyla gerçekleşmektedir. Uzun ve kısa kemiklerdeki ossifikasyon bu tipte kemikleşmeye örnektir (Şekil 2.6).

2.4.1.1. Primer Ossifikasyon Merkezi

Primer ossifikasyon merkezi oluşumunda birinci basamak progenitör hücrelerin kondroblastlar yönünde farklılaşması ve kıkırdak çatinın oluşumudur. Kıkırdak çatinın diyafiz ile uyumlu bölgesinde yer alan perikondriyuma doğru zamanla gelişen vaskülarite iç tabakada bulunan progenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasına yol açar. Ortaya çıkmaya başlayan osteoblastlar subperikondriyal alanda kemik matriks sentezine başlarken bu matriks kondrositlerin yüzeyini kaplar. Kemik matriks nedeniyle beslenmesi bozulan kondrositlerde sırasıyla hipertrofi ve ölüm gerçekleşir. Periosteumda yer alan bir diğer hücre grubu olan osteoklastlar ise bu esnada aktiflenerek yeni oluşan kemik üzerinde vasküler yapıların içeri girişine imkan tanıyan foraminalleri açarlar. Periosteumdaki kan damarları bu deliklerden geçerek, osteoprogenitör ve hematopoetik hücreleri içeriye doğru taşınmasına imkân tanırırlar. Kan akımı sonucunda ortama gelen kalsiyum ve fosfor iyonları ise alkalen fosfataz aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrikse çöker ve diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Bu sürecin devamında kıkırdak modelin ortasında birbirleriyle devamlılık gösteren boş kavitelerin oluşumu gözlemlenirken, bu kavitelere ileriki dönemde kemik iliği yerleşim gösterecektir. Bu olaylar zinciri diyafizde ortaya çıkan primer ossifikasyon merkezinin epifiz dışında kalan kemik dokuyu oluşturmasıyla sonlanır (Şekil 2.6).

2.4.1.2. Sekonder Ossifikasyon Merkezi

Primer ossifikasyon merkezinden başlayan enkondral kemikleşme epifizlere yaklaşıncı, epifizin içinde sekonder ossifikasyon merkezi ortaya çıkar ve bu odak başlıca epifiz bölgesinin ossifikasyonundan sorumludur. Primer ossifikasyon merkezinin yanı sıra sekonder ossifikasyon merkezinde de kemikleşme başlamasına rağmen her iki odak arasında kemikleşmeye uğramayan bir kıkırdak dokusu kalır ve epifiz plağı olarak adlandırılır. Kemikleşme sürdüğü müddetçe epifiz plağının diyafize bakan kısmında yer alan kondroblastlar çoğalarak yeni kıkırdak yapımını sağlarken, bu kıkırdakta devamlı olarak kemik dokusuna dönüşüm gösterir. Bu süreç büyümenin sonlanıp epifiz plağının ossifikasyonu aşamasına kadar devam ederek kemiklerin boyuna büyümesini sağlar.



Şekil 2.6. Enkondral kemikleşme

A) Hyalin kıkırdak yapısındaki çatının oluşumu. B) Diyafiz bölgesindeki perikondriyumda yer alan progenitor hücrelerin osteoblasta farklılaşması ve primer ossifikasyon merkezinin oluşumu. C) Sekonder ossifikasyon merkezinin oluşumu. D) Primer ve sekonder ossifikasyon merkezi arasında kalan epifiz plağının görünümü. E) Epifiz plağındaki kondrositlerin çoğalarak kemiğin boyuna büyümesini sağlaması (Gartner L.P., James L.H. Color Atlas of Histology, 3rded. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Chapter 4, page 73, 2000).

2.4.2. İntramembranöz Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme embriyonik hayatın 8. haftasında başlar ve vasküleriteden zengin mezenkimal doku içerisinde oluşur (6). Bu kemikleşme tipinde mezenkimal dokunun direkt osteoblasta farklılaşması ve osteoid üretimi izlenir.

Kalsifikasyonu takiben osteoblastlar osteosite dönerken, kalsifiye olmayan çevre mezenkim ise periost ve endosteuma dönüşüm gösterir. Kraniyal kemikler gibi yassı kemikler ve uzun kemiklerin enine büyümeleri bu kemikleşme tipine örnek oluşturlar (73).

2.5. Kemiğin Vaskülaritesi

Kemik dokusunun dolaşımı üç adet farklı, fakat birbiri ile anastomozlarla yakın ilişkisi olan sistemler tarafından sağlamaktadır (1). Bunlardan medullar sistem; nutrient arterden köken alıp diyafiz bölgesinin beslenmesinden sorumlu kısmı oluştururken, metafizyel sistem; metafiz bölgesindeki kansellöz kemik yapılarının dolaşımını, periostal sistem ise kemiğin dış kortikal dolaşımdan sorumlu sistemi oluşturmaktadır. Bu üç vasküler ağın birbirleriyle olan yakın ilişkileri sebebiyle herhangi birinde hasarlanma olması durumunda sağlam kalan sistem baskın hale geçmektedir.

2.6. Kemik İyileşmesi

Kemik iyileşmesi mekanizması halen tam olarak açıklanamayan kompleks biyolojik olaylar sonucunda gerçekleşmektedir. İyileşme süreci kırığın oluşmasını takiben başlarken öncelikli amaç fonksiyonel olarak optimal sonuca ulaşılmasıdır. Bu süreçte gerek intrasellüler gerekse ekstrasellüler sistemler görev alır ve iyileşmenin derecesi; kemik doku hasarı, kemik iliği, periost ve çevre yumuşak dokunun yanında büyüme faktörleri, vaskülarite, oksijenizasyon, PH, hormonlar, elektriksel yoğunluk ve mekanik stabilite gibi birçok farklı faktöre bağlıdır. Kemik iyileşmesi sürecinde skar oluşmayıp iyileşmenin rejenerasyonla sonuçlanması ise kemik dokunun iyileşme sonrasında normal aktivitesini tekrar kazanabilmesine imkân tanır (6).

Kırık iyileşmesi primer (direk) ve sekonder (indirekt) olarak iki şekilde olabilir (6, 22). Primer iyileşme çok küçük defektlerin iyileşmesi ile rijit fiksasyon uygulanan durumlarda izlenirken, diğer tüm kırık iyileşmeleri sekonder formda olmaktadır.

2.6.1. Primer Kemik İyileşmesi

Primer kemik iyileşmesi sıklıkla kraniyofasiyal fraktürlerin onarımı sonrasında izlenir. Primer kemik iyileşmesi sırasında eksternal kallus formasyonu izlenmezken, kırıldak gözlenmesi yetersiz fiksasyonun ve sekonder kemik iyileşmesinin başladığının bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu tip iyileşmede çok az hatta hiç denebilecek boyutta hematoma oluşumu izlenmesinin yanında inflamasyon orta derecededir.

Başarılı bir primer kemik iyileşmesi için 4 ana prensibin birlikteliği önerilirken bu prensipler şunlardır (82, 83);

1. Anatomik redüksiyon
2. Rijid internal fiksasyon
3. Atravmatik cerrahi teknik
4. Erken, ağrısız, aktif hareket

Primer kemik iyileşme sürecinde ilk basamak canlı ve nekrotik kemik segmentleri arasında yer alan osteoklast aktivasyonudur. Osteoklastlar kesici koniler oluşturarak Havers kanallarından geçip kemik matriks rezorbsiyonuna başlarlar (84). Kesici konilerin ön kısmında osteoklastlar bulunurken arka kısımlarında ise kemik üretiminden sorumlu osteoblastlar yerleşim gösterirler. Başta osteoklastların oluşturduğu bu kesici konilerin ilerlemesi sonucunda arkada vasküler yapılar içeren osteonların oluşumu gerçekleşir. Bu esnada oluşan kemik dokusu öncelikli olarak immatür bir karakter sergilerken, matürasyonu için birkaç aya gereksinim göstermektedir.

Periost osteoprogenitör hücreler içermesi sebebiyle primer kemik iyileşmesinde çok önemli bir role sahiptir. Normal şartlar altında teorik olarak periostal kökenli intramembranöz kemikleşme kemik çapının yarısına kadar ulaşabilirken pratikte kontaminasyon, yaralanma tipi gibi etkenlerden dolayı katkı daha sınırlı olmaktadır (6, 84).

Kompresyon plaklarıyla onarım uygulanan durumlarda ise en önemli dezavantajların başında periostun serbestleştirilmesi gelmektedir. Yapılan bu diseksiyon ile periostal kan akımı kesilmiş olurken, preosteoblast havuzunda ortamdan uzaklaşmaktadır. Bu sebepten dolayı kompresyon plakları ile onarım uygulanan kırıklardaki primer iyileşme, sekonder iyileşmeye kıyasla daha geç olmaktadır.

2.6.2. Sekonder Kemik İyileşmesi

Rijit fiksasyon veya çok küçük kemik defektleri gibi primer iyileşme tabloları dışında kemik dokudaki tüm kırıklarda ortaya çıkan iyileşme sekonder yapıdadır. Sekonder kemik iyileşmesi 3 faz altında incelenir;

1. İnflamatuvar evre
2. Tamir evresi
3. Remodelizasyon evresi

2.6.2.1. İnflamatuvar Evre

İnflamatuvar evre; kemik travmasını takiben oluşan ve hematoma organize olmasıyla son bulan, 1-4 gün arası süren kemik iyileşme sürecinin birinci evresini oluşturur. Travmayı takiben kırık oluşumu beraberinde matrikste hasarlanma, hücrelerde nekroz, periost ve endosteumda laserasyonların oluşumuna ve kırık uçlarının yer değiştirmesine yol açar. Hasarlanan periost ve çevre yumuşak dokularda oluşan yaralanma nedeniyle vasküler bütünlükte bozulma gerçekleşir. Vasküler yapıda ortaya çıkan bu hasarlanma komşu Haversiyen sistemler arasında anastomozun çok yoğun olmaması sebebiyle osteositlere giden kan akımının bozulmasına yol açarak osteositlerin piknotik bir hal alıp, lizis oluşumuna ve geride boş lakünaların ortaya çıkmasına sebep olur. Diğer taraftan vasküler hasarlanma kırık bölgesinde kan ve lenf birikimi oluşturarak hematoma gelişimine yol açar. Yaralanma sonrasında 48 saat içerisinde hematoma alanı organize bir hal alıp fibrinden zengin bir yapıya döner. Bu yapı stabilizasyon sağlarken içerdiği farklı hücrelerden (başta trombosit olmak üzere) salgılanan büyüme faktörleri yardımıyla da iyileşme süreci üzerine düzenleyici etki gösterir (85). Hematom kırık iyileşmesinde önemli bir aşama olup kırık uçlarını bir arada tutarken, açık kırıklarda hematoma dışarıya disloke olmasıyla iyileşme gecikmektedir.

Kırık oluşumunu takiben erken dönemde adrenalın deşarjına bağlı çevredeki vasküler odaklarda vazokonstriksiyon izlenirken, ilerleyen dönemde mast hücre artışı ve histamin salınımına bağlı vazodilatatuvar evre oluşmaya başlar. Vazodilatasyon ilk 24 saat içerisinde ödem oluşumuna yol açarken, polimorf çekirdekli lökositler, monosit ve lenfositleri içeren akut inflamasyon hücreleri, bu bölgeye doğru göç etmeye başlar. Ortama gelen inflamatuvar hücreler ise

salgıladıkları IL-1, IL-6, TGF- α ve PDGF gibi sitokinler vasıtasıyla iyileşme sürecinin biyokimyasal yollarının oluşumunda rol oynarlar (30).

2.6.2.2. Tamir Evresi

Kırık iyileşmesinin en önemli basamağı olup 2. gün başlayıp 40. güne kadar devam etmektedir. Bu evrede primer kallus yapısının oluşumu ve bunun kemik dokuya dönüşümü gözlemlenirken süreç; kimyasal, mekanik ve elektriksel faktörlerin bir bütün halinde etkileşimi sonucunda gerçekleşmektedir.

Tamir evresi hematoma organize olmasıyla başlar ve asıl iyileşme dönemini oluşturur. Bu aşamada lokal uyaranlara cevap veren periosteal ve endosteal bölgede yer alan progenitor hücreler fibroblast, osteoblast, kondroblast oluşturmak üzere farklılaşır ve oluşmuş olan hematoma organize etmeye başlarlar. Tamir evresinde hücrelerin aktivasyonu için travma bölgesindeki elektriksel akımın önemli bir yer tuttuğu düşünülürken, akımın kırık alanında 2-3 hafta içinde düşüş gösterdiği saptanmıştır (85). Progenitor hücrelerin farklılaşmasıyla ve hematoma organizasyonu ile oluşan yumuşak granülasyon dokusu bu süreçte kırık bölgesinde bir miktar stabilite oluşumuna imkân tanır (37, 70). Granülasyon dokusunda yerleşim gösteren fibroblastlar kollajen sentezini sağlarken, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoid sentezini gerçekleştirirler (85).

Tamir evresinin 2-3. gününde kırık alanına doğru anjiyogenez oluşmaya başlar. Anjiyogenez inflamatuvar evrede ortama göç eden başta makrofaj olmak üzere farklı inflamatuvar hücrelerden salınan TNF- α , VEGF, FGF-2, EGF gibi büyüme faktörlerinin çevredeki endotel hücrelerini uyarmasıyla oluşmaktadır. Erken dönemde vaskülaritenin asıl kaynağını perioste ve çevre yumuşak doku oluşturmakta iken iyileşmenin ilerleyen evrelerinde nutrient arterin etkisi ön plana çıkar. Anjiyogenez her ne kadar erken evreden itibaren oluşmaya başlasa da osteojenik hücre çoğalmasına paralel seyredememekte ve daha yavaş gelişmektedir. Bu yüzden anjiyogenezin fazla olduğu kemiğe yakın bölgelerde progenitor hücrelerde osteoblast yönünde farklılaşma izlenirken, kırığın uç kısımlarına yakın bölgelerde ise kondroblast oluşumu ön planda olup kırık dokusu oluşumu izlenir. Bu aşamada perioste altında osteojenik hücre yoğunluğu, altında kırık dokusu, endosteum komşuluğunda ise yine osteojenik aktivite artışı ve immatür kemik oluşumu

gözlemlenir. Zamanla her iki kırık parçasının ucunda oluşan kıkırdak dokusu birleşerek dış kallusu oluştururken, buna paralel şekilde endosteum komşuluğunda da iç kallus oluşumu gerçekleşir. Primer kallus (yumuşak kallus) adı verilen bu yapı kırık sonrasında ortalama 7-12. günlerde ortaya çıkar ve başlıca kıkırdak, immatür kemik, fibröz doku, osteoid ile yeni oluşan az miktarda vasküler yapıları içerir (35).

Kırık hatları primer kallus yapısıyla bağlanınca kallus yapısı olgunlaşarak sert kallusa (sekonder kallus) dönüşür. Primer kallus yapısının sekonder forma dönüşmesi aşamasında en önemli basamağı vasküleritenin gelişimi oluşturmaktadır. Çünkü gerek damar endotelinin içerdiği sialik asit, gerekse kıkırdak dokunun yapısında bulunan proteoglikanlar negatif yüklüdür ve zıt kutupların birbirine olan itme gücü anjiogenezin kıkırdak doku içerisine doğru ilerlemesinin önünde büyük bir engel oluşturmaya başlar. Kalsiyum bu aşamada önemli rol oynar ve ortamdaki negatif yükü pozitifçe çevirerek anjiogenezin kıkırdak doku içerisine ilerlemesine imkân tanır. Sonuç olarak sekonder kallus gelişebilmesi için vaskülarite, bunun oluşumu içinse osteoidin mineralizasyonu (kalsifikasyonu) gerekmektedir.

Osteoidin mineralizasyonu osteoblastların, tropokollajen salgılamasıyla başlar. Tropokollajen kollajene polimerize olurken kollajen lifleri üzerine kalsiyum hidroksiapatit kristalleri çöker ve mineralizasyon gerçekleşir. Kalsiyum hidroksiapatit kristallerinin kollajen çatı üzerine çökmesine yönelik ortak teori ise osteoid içerisinde yer alan matriks veziküllerine dayanmaktadır. Bu teoriye göre matriks vezikülleri, osteoblast ve kondrosit kökenli olup yüksek konsantrasyonda kalsiyum, fosfat, cAMP, ATP, ATPaz, kalsiyum bağlayıcı protein, ALP, pirofosfataz ve fosfoserin içerirler. Vezikül içine alınan iyon konsantrasyonu arttığında, kristalizasyon ortaya çıkmaya başlar ve büyüyen kalsiyum hidroksiapatit parçaları vezikülü patlatır. Pirofosfataz enzimi, ortamda bulunan kalsifikasyonu önleyen pirofosfatları parçalarken, ALP ise fosfat esterlerinden fosfat iyonunu serbestleştiririp kalsiyumun çökmesini sağlayarak bu sürece katkıda bulunmaktadır (35). Kalsifiye doku içinde kalan kondrositler ise difüzyonla beslendiğinden bu aşamada ölür ve bulundukları yerde lakünalar meydana gelir. Kondroklastik faaliyetle bu bölgelerin rezorbsiyonu artarken lakünalar genişler ve bu boşluklara vasküler yapılar ile kemik hücreleri girmeye başlar.

2.6.2.3. Remodelizasyon Evresi

Kemik iyileşmesinde en uzun aşamayı oluşturur (25-100 gün). Daha çok immatür formda olan kemik yapısının lamellar kemik şekline dönme sürecidir. Bu aşamada osteoklastik aktivite sayesinde sert kallus dokusu rezorbe olurken osteblastik aktiviteyle de matür kemik oluşturulur (86). Klinik olarak remodelizasyon döneminde ağrı ortadan kalkar ve normal fiziksel aktivite izlenebilir.

2.7. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kırık iyileşmesinde rol oynayan etkenler başlıca lokal ve sistemik faktörler olarak iki grup altında incelenir.

2.7.1. Lokal Faktörler

İyileşme sürecinde rol oynayan lokal faktörlere örnek olarak travmanın derecesi, kırık uçlarının birbirine göre konumu, kırık alanının vaskülaritesi, kırılan kemiğin türü, kırık çizgisinin özelliği, cilt ve yumuşak doku yaralanması, periost hasarı, kan akımı, enfeksiyon, elektrik yükü, moleküler etkileşimler ve denervasyon gibi çok fazla değişken sayılabilir (85).

2.7.1.1. Anjiyogenez

Anjiyogenez ile kemik iyileşmesi arasındaki ilişki uzun yıllar boyunca üzerinde çalışılmış bir konu olup araştırmaların temelinde osteositlerin canlılığını sürdürebilmesi için nutrient damarlara 0,1 µm mesafeden daha yakın olma gereksinimi ve kemik grefti içinde yer alan osteositlerin yaşayabilirliğinin konulduğu alandaki vasküler yatakla yakın ilişkili olması yatmaktadır (87). Fare deneylerinde epifiz büyüme plaklarında anjiyogenin inhibe edildiği durumlarda ossifikasyonun hasarlanması, radyoterapinin kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri ve radyoterapi almış dokularda anjiyogenin stimüle edilmesi sonucunda osteogenin yoğun olarak izlenmesi ise anjiyogenez ile osteogenin arasındaki yakın ilişkiyi ortaya koymaktadır (88).

Kemik iyileşmesi esnasında anjiyogenez oluşumunda temel rolü VEGF ve FGF-2 oynamaktadır. VEGF dimerik yapıda bir heparin bağlayıcı glikoprotein olup, anjiyogenez gelişen dokularda yoğun şekilde bulunmaktadır (89). 7 farklı tipi

tanımlanan VEGF'nün en çok araştırılan ve baskın formu VEGF-A olup etkisini hücre yüzeyinde yer alan iki adet VEGF-R1 ve VEGF-R2 isimli tirozin kinaz reseptörü üzerinden göstermektedir (90, 91).

VEGF'nün farklı stimülatörleri bulunmakla beraber en potent stimütatörü transient hipoksidir (92, 93). Hipoksi durumunda çok sayıda hücre içerisinde bulunan bir transkripsiyon faktörü olan “hypoxia-inducible factor” (HIF) aktiflenir ve buda VEGF seviyelerinde artışa yol açar (94). HIF; alfa ve beta alt unitelerinden oluşan heterodimerik yapıda bir proteindir. HIF α , insanda 3 ayrı izoforma sahip olup üzerinde en çok durulan tipi ise HIF-1 α 'dır. Hipoksi oluşması durumunda HIF-1 α nükleusa doğru yer değiştirerek HIF-1 β ile birleşir ve aktive, dimerik bir form oluşturur. Oluşan bu transkripsiyon faktörü ise nükleus içerisinde DNA'ya bağlanarak VEGF ekspresyonunda artışa yol açmaktadır (95). HIF'lerin nükleus üzerinde aktive ettikleri genler VEGF artışı dışında eritropoez, demir metabolizması, anaerobik metabolizma, sitrik asit siklusunun inhibisyonu, hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine de etki göstermektedir (96).

VEGF'nün fizyolojik etkileri; vasküler geçirgenliği artırma, anjiogenez sürecinde rol alan enzimleri aktive etme, inflamatuvar süreçte regülatör rol oynama ve endotelial hücre adezyonu ile migrasyonu olarak bilinmektedir (91, 97). VEGF'nün kemik iyileşmesi sürecine etkisi ise sadece vaskülarite artışı ile sınırlı kalmayıp osteoblastik aktivite üzerine yapılan çalışmalarda, VEGF'nün osteoblastların kemotaksisini ve proliferasyonunu uyardığı ortaya konulurken, osteoblastların apoptozunda baskıladığı öne sürülmektedir (11, 12). Bunun dışında VEGF osteoklast aktivitesi ve kemotaksisini de stimüle etmektedir (98).

VEGF'nün encondral tipte osteogenez üzerine etkilerine yönelik çözünebilir reseptör kullanılarak fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, anjiogenezin inhibe olduğu ve trabeküler kemik oluşumunun daha fazla olduğu gözlenmiştir (6). Carlevar ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği ve VEGF antikorları uyguladıkları bir başka çalışmada da benzer şekilde deney gruplarında encondral kemikleşme esnasında ciddi defektlerin olduğu saptanmıştır (99). Encondral kemikleşme dışında VEGF'nün membranöz tipte kemik iyileşmesi üzerine etkileri konusunda ise daha az bilgi bulunmaktadır. Saadeh ve arkadaşlarının bu yönde yapmış oldukları çalışmalarda sıçan mandibula iyileşmesi esnasında yüksek miktarda VEGF

ekspresyonu izlenirken, bunun iyileşmenin bir parçası olduğu savunulmuştur (100, 101).

Anjiogenez esnasında kritik rol oynayan bir diğer büyüme faktörü ise FGF-2'dir. VEGF'ne benzer şekilde bir heparin bağlayıcı büyüme faktörü olan FGF-2; endotelial hücre migrasyonu, proliferasyonu ve yeni damar oluşumunun önemli bir stimülatörüdür (102, 103). Distraksiyon osteogenez süreci üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda osteoblastlardan salınan ve matriks içerisinde proliferen olan kondrositlere yakın bölgelerde yerleşim gösteren FGF-2'nin osseoz rejenerasyon esnasında anjiogenezin önemli bir regülatörü olduğu ortaya konulmuştur (104-106). Anjiogenez oluşum sürecinin temelinde rol alan bu iki büyüme faktörlerinin etkileri ise birbirileri ile yakın ilişkilidir ve osteoblastlar dâhil birçok hücre serisinde VEGF ekspresyonu FGF-2 ile regüle edilmektedir (100, 107-108).

2.7.1.2. Moleküler Etkenler

İyileşme esnasında anjiogenez tetikleyen büyüme faktörleri dışında inflamatuvar hücrelerin göçü, farklılaşması, proliferasyonu ile kallus ve kemik oluşumu sırasında tetik çekici rol üstlenen bazı mikromoleküllerde etkin rol oynamaktadır. Bu moleküllerin başlıcaları;

- Kemik morfogenetik proteinler (BMP)
- Transforme edici büyüme faktörleri (TGF)
- Platelet derive büyüme faktörleri (PDGF)
- Fibroblast büyüme faktörleridir (FGF)

Kemik Morfogenetik Proteinler (BMP): TGF- β ailesinin bir üyesidir (109). 15 farklı izoformu tanımlanmış ve bu formlar 3 ana alt grup altında sınıflandırılmıştır. BMP'ler sinyal peptiti içeren geniş moleküller olarak salınır ve etkilerini hücre yüzeyinde yer alan serin treonin kinaz reseptörleri (IA, IB, II) üzerinden gösterirler (110, 111). Aktive olan reseptör ise hücre içi SMAD yollarını kullanarak nükleus üzerinde transkripsiyonel faktörlerin tetiklenmesine yol açar.

BMP'ler kemik gelişimi ve kırık iyileşmesinin birçok aşamasında görev alırlar. Başlıca osteoblastların ve osteoblast öncülerinin mitogenezini ve kemotaksisini stimüle ederken progenitor hücrelerin kemik ve kartilaja dönüşmesine yol açabilmektedirler (112-116).

Kırık iyileşmesi esnasında BMP'ler 3. günde ortaya çıkmaya başlar, 2. haftada yoğun olarak bulunur ve 3. haftada miktarlarında azalma izlenir. Aslında iyileşme esnasında BMP'lerin alt tiplerinin görülme zamanları farklılık göstermektedir. Sıçan mandibulası üzerinde yapılan bir çalışmada kırık oluşması sonrası erken dönemde BMP-7 yüksekliği gösterilirken, iyileşme esnasında miktarın düzenli şekilde düşme eğiliminde olduğu saptanmıştır (117). Buna karşın BMP 2 ve 4 seviyelerinin ise erken dönemde daha düşük olduğu, 1. haftadan sonra artma yönünde değişim gösterdiği gözlenmiştir.

BMP'lerin kemik iyileşmesi üzerine oluşturdukları bu pozitif etki sebebiyle insan BMP'lerinin rekombinant formları üretilmiş, deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılarak iyileşmeyi stimüle ettiği ortaya konulmuştur (118-125).

TGF- β : 3 farklı izoformu bulunmaktadır. Üzerinde en yoğun çalışılan tipi TGF- β_1 olup kemik iyileşmesi sırasında osteoblast kemotaksisi ve öncülerinin proliferasyonunda görev almaktadır (126). Osteoklastlar üzerinde inhibe edici etki gösterirken hücrenin integrin reseptörlerini uyarmak yoluyla hücre dışı matriks bileşenlerinden olan kollajen, fibronektin ve proteoglikanların oluşumunu artırır. Bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılar ve granülasyon dokusu oluşumuna pozitif yönde etki eder.

FGF: 9 farklı izoformu mevcuttur. FGF-1 başlıca beyin ve retinada bulunurken, kemik iyileşmesi ve gelişimi sürecinde aktif rol oynayan tipi FGF-2'dir (127-129). Diğer formlar ise embriyolojik hayatta aktif rol üstlenmektedir. Bu molekülün eksik olduğu durumlarda kemik hacmi ve oluşumunda hasarlanmaların olduğu saptanmıştır (130). Osteoblast kültürleri üzerine yapılan in vitro çalışmalarda FGF stimülasyonunun hücresel proliferasyonu arttırdığı gözlemlenmiştir (131-134). Buna ek olarak FGF, osteoblast proliferasyon artışına bağlı kollajen miktarında da artışa yol açabilmektedir (132).

PDGF: Başlıca trombositlerden köken alan, inflamatuvar reaksiyonların düzenlenmesi, hücresel proliferasyon ve kemotaksis esnasında aktif rol oynayan bir büyüme faktörüdür. Dimerik moleküller olup A ve B polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Osteoblastlarda başlıca homodimerik PDGF-AA formu bulunmaktadır (135). Osteoblastların kemotaksisini, proliferasyonunu arttırırken, diferansiasyonu

azaltır (136-138). Kollajen sentezini stimüle ederken aynı esnada kollajenaz aktivitesini artırarak kollajenin yıkımını da tetiklemektedir (139, 140).

2.7.2. Genel Faktörler

Genel faktörler kişinin komorbidite durumlarından, kullandığı medikal tedavilere kadar çok geniş bir yelpaze dâhilinde yer almaktadır.

Kırık iyileşmesinde yaşın etkisi özellikle periost sebebiyle önem gösterir. Genç yaşlarda periost matüritesi tamamlanmamış olması nedeniyle mezenkimal hücre farklılaşması daha hızlı şekilde olurken, periost matüritesini tamamladıktan sonraki dönemde yaşın iyileşme üzerine çok ciddi etkisi olmamaktadır (6, 141).

Yaşın yanı sıra diyabet, anemi, tüberküloz, raşitizm gibi kronik hastalıklarda kırık iyileşmesi üzerine negatif etki yaratmaktadır. Kronik hastalıklara bağlı inflamatuvar süreç kalsiyum tuzlarının çözünmesini etkilerken, artan lökositlerin proteolitik enzimleri ise matriksin bozulmasına neden olmakta ve osteoid oluşumunu engellemektedir. Bu nedenlerle inflamatuvar sistemik hastalıklar kemikleşmede azalma ve osteoporoz eğiliminde artışa yol açmaktadır.

Hormonlar, kemik iyileşme süreci üzerine etki gösteren bir diğer sistemik faktördür. PTH'nun, osteoklast sayısını artırıcı ve osteolizi hızlandırıcı etkileri nedeniyle kemik kaybına ve kırık iyileşmesinin yavaşlamasına yol açarken, PTH'nun antagonisti olan kalsitonin kompakt ve trabeküler kemik yapımını artırmaktadır. Kalsitonin dozu ve yeni kemik oluşumu arasında doğru orantı bulunmakla birlikte iyileşmeyi olumlu yönde etkileme mekanizması henüz açıklanamamıştır.

Kortikosteroidlerin osteoblast prekürsörlerinin osteoblastlara dönüşümünü engellemesinin yanı sıra tamir için gerekli olan kemik matriks sentezini yavaşlatarak kemik iyileşmesini olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Steroidler bunlar dışında FGF, EGF ve PDGF üzerine antagonist etki yaparak kırık iyileşmesini negatif yönde etkilerler. Bunlar dışında kalan büyüme hormonu, tiroid hormonları, östrojen, insülin ve anabolizan hormonların ise kemik iyileşmesini stimüle ettiği bildirilmektedir (142-144).

Kişinin malnütrisyon tablosu ve vitamin düzeyleri de kemik iyileşmesi esnasında aktif rol oynar. A vitamini normal dozda mezankimal hücre farklılaşmasını uyarak kırık iyileşmesini stimüle ederken eksikliğinde osteoblast düzenlenmesinde

ve osteoklast aktivitesinde bozulma olur ve kemik oluşumu hasarlanmaya uğrar. A vitamini fazlalığında ise kıkırdak dokuda erozyon meydana gelirken, osteoklastlara farklılaşma artar ve iyileşme gecikir. C vitamini, kollajen sentezinde rol alması sebebiyle dolaylı yoldan olmakla birlikte kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkiler gösterir (145). D vitamini, kalsiyumun kemikten kana geçişi yanında, kemik hücrelerinde sitrat üretimini artırır. D vitamini normal dozda iyileşmeyi hızlandırırken, toksik dozda olumsuz yönde etki eder. B₆ vitamini eksikliği ve K vitamini antagonistleri de kemik iyileşmesine olumsuz etki ederler.

2.8. Kemik Greft Materyalleri

Kemik dokusu geniş bir rejenerasyon kapasitesine sahip olup belirli ölçülere kadar kendisini tamamen onarabilme yeteneği mevcuttur. Bu rejenerasyon kapasitesinin dışında kalan ve kemik dokusunun yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşmeyecek en küçük kemik defektine ise kritik boyutta kemik defekti adı verilmektedir (146). Bu tip defektler yeni kemik oluşumu yerine fibröz bir bağ dokusu ile iyileşme eğilimi gösterir ve kemik greft materyallerinin kullanımına ihtiyaç duyarlar (2).

Kemik dokuda ortaya çıkan boşlukların doldurulması veya projeksiyon sağlanması amacıyla kullanılacak kemik greft materyalinin optimal yarar sağlayabilmesi için osteoindüktif, osteokondüktif ve osteojenik etkilerden en az bir, tercihen tamamını içermesi istenir (147).

Bu kavramlardan osteojenik etki; greft materyali içinde kalan hücresel elemanların transplantasyon sonrası hayatta kalarak bu noktalardan yeni kemik oluşumunu sağlaması, osteokondüksiyon; alıcı sahadaki vasküler ve perivasküler yapıların grefte ilerlemesi için greftin skafold görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesidir. Osteoindüksiyon ise gerek sitokinler yoluyla çevre dokudaki kök hücrelerden, gerekse kendi üzerindeki kök hücrelerden osteoblast gelişimine bağlı kemik oluşmasıdır.

Kritik boyutlu kemik defektlerinin onarımında sıklıkla tercih edilen ve organizmada kandan sonra en sık transplante edilen doku olan kemik greftlerinin elde edilme ve hazırlanma özelliklerine göre birçok farklı tipi tanımlanmış olup

bunların tamamı birbirinden farklı osteokondüktif, osteoindüktif ve osteojenik etkiye sahiptir.

2.8.1. Otojen Kemik Greftleri

Kişinin bir bölgesinden alınıp ihtiyaç duyulan farklı bir bölgesine nakledilen canlı kemik greftine otojen kemik grefti denir. Otojen kemik greftleri, biyoyumluluğun en üst seviyede olması, immün cevap oluşturmaması, osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerin tümüne sahip olması sebebiyle kemik greft uygulamalarında altın standardı oluşturmaktadır (148). Otojen kemik grefti uygulamalarının başlıca dezavantajları ise; donör saha morbiditesi oluşturmaması, sınırlı miktarda elde edilebilmesi, enfeksiyon riski, anestezi süresindeki uzama ve kanamadır (149, 150).

Otojen greftler kortikal, kansellöz ve kortiko-kansellöz formda olabilmektedir. Kortikal greftler hızlı bir mekanik destek sağlarken, kansellöz greftlerde erken dönemde mekanik destek gücü daha az oranda izlenmekte ve kortikal greftin sağladığı desteğe ulaşması için 6-12 ay arasında bir zamana ihtiyaç göstermektedir (151). Kansellöz formdaki greftler yapısı nedeniyle kortikallere kıyasla sekiz kat daha aktifken, kortikal greftler ise kansellözlere oranla 4 kat daha fazla mekanik destek sağlamaktadır.

Kortikal ve kansellöz kemik greftleri arasında diğer bir fark ise kansellöz kemik greftlerinde osteojenik hücrelerin daha yoğun oranda bulunması ve boşluklu yapısı sayesinde hücrelerin vasküler zeminden difüzyonunun daha kolay olabilmesidir (152-154). Bu tipteki greftler hızlı bir revaskülarizasyona uğrayıp, tamamen rezorbe olarak yeni kemik oluşumunu yoğun derecede stimüle ederken buna karşılık kortikal greftlerde rezorbsiyon tam olamamaktadır.

İyileşme esnasında ortaya çıkan farklılıklar, kortikal ve kansellöz kemik greftlerinin bir diğer ayırım noktasını oluşturmaktadır. Kansellöz greftler osteokondüktif, osteoindüktif ve osteojenik etkilerin tamamına yüksek oranda sahipken, kortikal greftlerde iyileşme sürecinde asıl etki ise osteokondüktif yönden oluşsa da içerisinde yer alan osteoblastlar sebebiyle kısmi bir osteojenik etki ve az miktarda osteoindüktif etki de oluşabilmektedir (155, 156). Bu yönüyle kansellöz

greftler iyileşme açısından daha yüksek bir potansiyele sahip olup mekanik destek ihtiyacı olan alanlar dışındaki bölgelerde kullanımı daha fazla tercih edilmektedir.

Kortikal kemik kadar mekanik destek istenmesi ve kansellöz kemik greftleri kadar yüksek rejenerasyon kapasitesinin hedeflenmesi kortikokansellöz kemik greftlerini ortaya çıkarmıştır. Bu yöntem her ne kadar popülerite kazanmış ve sık kullanılır hale gelmiş olsa da, beklenildiği gibi hem kortikal hem de kansellöz kemiklerin özelliklerini aynı derecede kombine etmemektedir. Bu greftler, kansellöz kemik greftleri kadar osteogenezi tetikleyici özelliğe sahip değil iken bunun başlıca sebebi dış kısmında daha gözeneksiz yapıdaki kortikal kemik tabakası içermesidir. Kortikokansellöz greftlerin en büyük avantajı ise eşit miktarda olmamakla birlikte kortikal greftler gibi mekanik sağlamlık ve form kazandırmanın yanında kansellöz greftlerdeki gibi osteogenezde de aktivasyon oluşturarak iki etkiden kısmen de olsa eş zamanlı faydalanılmasına imkân tanınmasıdır (157).

2.8.1.1. Otojen Kemik Greftlerinde İyileşme

Kemik greftinin iyileşmesinin kırık iyileşme sürecine benzerlik göstermektedir. Erken dönemde inflamasyon ve granülasyon dokusu oluşumu izlenirken, granülasyon dokusu hem greftin revaskülarizasyonu hemde osteoprogenitör hücrelerin ortama yerleşmesi yönünden önem taşımaktadır. Granülasyon doku oluşumunu takiben iyileşme basamakları greft materyalinin kortikal veya kansellöz olmasına göre bazı farklılıklar sergilemektedir (6).

Kortikal kemik grefti iyileşmesinde ilk basamak inflamatuvar hücrelerin ortama göçü iken bunu takiben osteoklastik aktivitede artış gerçekleşir. Kortikal kemik greftlerinde kansellöz greftlerden farklı olarak iyileşme osteoklastik aktiviteyle başlayıp “creeping substitution” yoluyla sürer. Osteoklastik aktivite artışı sonucunda nekrotik odakların debritlemesi sağlanırken 1. haftanın sonunda periferel vasküler penetrasyon gerçekleşmeye başlar (158-160). Revaskülarizasyon önce Volkmann kanallarına oradanda Haversiyen kanallarına doğru ilerler ve tamamlanması 1-2 aya kadar uzayabilir (161). Greft revaskülarizasyonundaki artmış zaman aralığı; kortikal kemiğin vaskülarizasyon için kansellöz kemik kadar geniş ve uygun bir yüzeye sahip olmaması, vaskülarizasyonun periferel yüzeyden gelişmesi ve osteoklastik aktivite sonucunda neoanjiyogenozun ilerleyebileceği deliklerin

oluşması için gereken zamanın artması nedeniyle olduğu savunulmaktadır (161, 162). Kortikal kemik grefti iyileşmesinde osteoklastik rezorbsiyondan bir sonraki basamak ise osteoblast aktivasyonudur. Osteoblastik aktivasyon sonucunda ise immatür kemik dokusu oluşumu gerçekleşir ve bu kemik doku takip eden dönemde matür kemik formuna dönüşüm gösterir.

Kortikal kemik greftlerinde osteoklast aktivasyonuna bağlı erken dönemde kemik mekanik desteğinde %40'a varan bir azalma izlenirken 1-2 yıl içerisinde tamamlanan remodelizasyon aşaması sonunda normal kemik direncine ulaşabildiği saptanmıştır (143). Greftin mekanik desteğinin azaldığı 6-18 ay arası dönemde ise greft materyali içerisinde kalan ufak nekrotik kemik sekestreleri yorgunluk kırıklarının ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (159).

Kansellöz kemik grefti iyileşmesinde ise kortikale benzer şekilde öncelikle inflamatuvar hücrelerin ortama göçü gerçekleşirken bir sonraki basamakta farklı olarak osteoblastik hücre aktivasyonu ortaya çıkar. Osteoblastik aktivasyon osteoid üretiminde artışa yol açar ve mekanik destek gücünün de fazlaşmasına imkân tanır. Bu tipte greftlerin iyileşmesi esnasında vasküler penetrasyon 2. gün gerçekleşmeye başlar ve revaskülarizasyonun başlaması için kortikal greftten farklı olarak osteoklastik aktivasyona ihtiyaç duyulmaz. Kansellöz greftlerde revaskülarizasyon trabeküler yapı sebebiyle hem periferale hem de santral bölgeden ilerler. Anjiyogenezin erken dönemde ortaya çıkması osteoindüktif etkiyi tetikleyerek greft içerisinde ve de greft çevresinde bulunan öncül hücrelerin osteoblast yönünde farklılaşmasına imkân tanıyarak erken dönemde yoğun kemik üretimi gerçekleşmesini sağlar (163). Kansellöz kemik grefti uygulamalarında erken dönemde direk grafilerde radyoopasite artışının temelinde bu mekanizma yatarken, ilerleyen dönemde osteoklastik aktivitedeki artışla opasite yoğunluğunda azalma izlenir. Kansellöz kemik greftlerinde revaskülarizasyon aşaması 2. haftada tamamlanır ve oluşan immatür kemik formunun “creeping substitution” yoluyla matür hale dönmesi içinse uzunca bir süre gereklidir (6).

2.8.2. Allojenik Kemik Greftleri

Otojen kemik grefti uygulamalarının beraberinde getirdiği dezavantajlar klinik olarak farklı arayışlara yol açmış ve allogreftlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

Bu tip greftler aynı türden, fakat genetik olarak farklı bireylerden elde edilmektedir. Osteokondüktif ve osteoindüktif etkilere sahip olmalarına karşı osteojenik etki oluşturmazlar. Allojenik kemik greftlerin klinik kullanımda en önemli avantajı ise istenilen boyut ve şekilde greftlerin hazırlanabilmesine imkân tanınmalarıdır (164).

Allojenik greft materyallerinin içerdiği hücre yapısı (en antijenik olan kemik iliği hücresidir) ve matriks antijenleri nedeniyle alıcıda bir takım hücrel ve humoral immün yanıt oluşumuna yol açarken, kemik matriksin inorganik kısmı ise herhangi bir antijenik özellik taşımamaktadır (165). Bu tipte greftlerin kullanılabilmesi için hücrel yapı ile matriks proteinlerinin antijenik özelliklerinin ortadan kaldırması gerekliliği bulunmakta ve bunun içinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu işlemlerden bazıları;

- Dondurma
- Dondurup kurutma
- Radyasyon uygulaması
- Etilen oksit uygulaması
- Demineralizasyon
- Deproteinizasyon yöntemleridir.

Allojenik kemik greftlerinin en antijenik formu taze kemik grefti şeklinde kullanılan tipidir ve etilen oksit uygulaması ile birlikte kullanımı büyük oranda terk edilmiştir (166, 167). Radyasyon uygulaması ise < 20 kGy'in altında uygulandığı durumlarda bakterilerin uzaklaştırılması için yeterli bir etki oluştururken, mekanik özelliklerde minimal değişikliğe yol açmakta olup, dozunun >30 kGy'e yükseltildiği durumlarda ise viral ajanların nötralizasyonu sağlanmasına rağmen greftin mekanik gücünde ciddi bir azalmaya sebep olmaktadır (168, 169).

Bu yöntemlerden en sık tercih edilen yaklaşım ise dondurma ve dondurup kurutma teknikleridir. Çok düşük derecelere hızlı şekilde soğutma sonrasında greftin içerdiği sıvının vakum sistemi yardımıyla çekilerek dehidrate edilip, liyoflize greftlerin hazırlanması temeline dayanmaktadır. Bu yaklaşım sayesinde antijenite büyük oranda giderilebilirken, dondurularak kurutma uygulandığı durumlarda mekanik destek gücünde azalma oluşabilmektedir.

Hazırlanma süreci baz alındığında allojenik greftlerin başlıca kullanım tipleri; dondurulmuş, taze dondurulmuş, dondurulup kurutulmuş, demineralize dondurulup

kurutulmuş ve radyasyon ile muamele edilmiş formlarıdır (170). Dondurularak kurutulmuş greftler, mineralize veya demineralize formda olabilmektedir. Demineralizasyon işlemi kemik proteininin %1'ini oluşturan BMP'lerin ortaya çıkmasını sağlarken, minerallerin büyük oranda uzaklaşmasına yol açar. Bu tipteki greftler hızlı revaskülarize olmasına rağmen, yapısal destek sağlayamayıp erken dönemde rezorbsiyona uğrarlar. Demineralize dondurularak kurutulmuş greft materyallerinin indüksiyonu encondral yolak üzerinden oluşurken, demineralizasyon aşamasında kullanılan ürünler indüksiyon için çok önem taşımaktadır. Hidroklorik asit, formik asit, sitrik asit gibi ürünler bu tipteki greftlerin osteoindüktif etkisine zarar vermezken, asetik asit, nitrik asit ve alkol osteoindüktif etkiyi önemli derecede azaltmaktadır (112, 171).

Allojenik kemik greft materyallerinde ortaya çıkabilecek rejeksiyon sürecinin tanımlanması serum biyolojik bulguların olmaması sebebiyle solid organlardaki kadar kolay olmamaktadır. Rejeksiyon genellikle rezorbsiyon ve prematür mekanik fonksiyon kaybıyla ortaya çıkmaktadır. Kronik rejeksiyon tanısı ise fibröz kapsülle sarılmış sekestre kemik materyalinin görülmesi sonrasında konulabilmektedir (6).

Allojenik greftlerde karşılaşılabilecek bir diğer sorun ise enfeksiyon geçişidir. Bu aşamada en çok endişe uyandıran ajanlar ise HIV, Hepatit B ve Hepatit C virüsleridir. Allogreft uygulamalarında asellüler yapı sebebiyle HIV geçiş riski 1/1.6 milyon olarak bildirilmektedir (172). Fakat literatürde aynı donörden elde edilmiş, donörün kan ve kemik iliğinin de içeren taze donmuş greft uygulamasına bağlı üç adet HIV geçişi bildirilmiştir. Buna karşın aynı donörden elde edilen ve dondurularak kurutma işlemi uygulanmış greft materyalleri kullanılan 38 hastada enfeksiyon geçişi saptanmamıştır (169).

Allojenik kemik greftlerinin iyileşmesi, kırık iyileşmesine benzerken inflamasyon sürecini takiben vaskülarizasyon, rezorbsiyon, kemik oluşumu ve remodelizasyon aşamaları gerçekleşir. Kansellöz formların inkorporasyonu daha hızlı olurken kortikal formlarda bu süreç daha uzun sürmesine rağmen allogreftlerdeki alıcı ile donör arasındaki genetik farklılık, otogreftlere kıyasla daha uzun bir onarım sürecinin gereksinimine yol açmaktadır (6).

2.8.3. Ksenojenik Kemik Greftleri

Alıcı ve donörün farklı türlerde olduğu greft tipleridir. Sığırdan ve mercandan elde edilen iki ayrı formu bulunmaktadır. Başlıca osteokondüktif etki göstermekte olup klinik kullanımda çok fazla tercih edilmemektedirler (170).

2.8.4. Alloplastik Kemik Greft Materyalleri (AKGM)

Otojen kemik greftlerinin yol açtığı dezavantajların üstesinden gelinmesi amacıyla ortaya çıkan allojenik greftlerde, onarım sonrasında karşılaşılabilen immun yanıt ve enfeksiyon geçişi endişesi, alloplastik kemik greft materyallerinin doğmasına yol açmıştır. Bu amaçla birçok farklı özelliğe sahip alloplastik materyal tanımlanmış ve yeni materyallerin keşfine yönelik çalışmalar devam etmektedir.

2.8.4.1. Büyüme Faktörleri İçeren AKGM

AKGM'lerinin farklı büyüme faktörleri ile kombine edilmiş şekilleridir. Bu amaçla en sık kullanılan büyüme faktörleri ise; TGF- β , PDGF, FGF, VEGF ve BMP'lerdir. Bu büyüme faktörleri çeşitli taşıyıcılar yardımıyla veya doğrudan kemik defektlerine uygulanabilmektedir. TGF- β kartilaj matriks sentezinde artma sağlarken, FGF kondrosit farklılaşmasını tetiklemektedir (173-175). VEGF anjiogenezi stimüle edip, osteoblastik aktivasyonu arttırırken, PDGF osteoblast kemotaksisi ve proliferasyonunu stimüle eder. Bunlar dışında BMP'lerde osteoblastlar üzerine oluşturduğu etkiler sebebiyle alloplastik materyal olarak uygulanabilmektedir (164).

2.8.4.2. Hücresel İçeriğe Sahip AKGM

Bu tipte alloplastik materyalleri sıklıkla kök hücreler ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Kök hücreler immatür farklılaşmamış hücrelerdir ve gerekli durumlarda değişik hücre gruplarına farklılaşma özelliklerine sahiptirler (176, 177). Erişkin kök hücreler, mezenkimal, hematopoetik, nöral, dermal gibi farklı kaynaklardan köken alabilmektedirler. Bu kök hücrelerin kemik iliği kökenli mezenkimal (MSCs) formları, bağ dokusu ve kemik dokuya farklılaşma kapasitesine sahip olup birçok çalışmada etkinlikleri incelenmiştir. Sıçan ve köpekler üzerinde

yapılan iki ayrı çalışmada MSCs'ler seramik taşıyıcı üzerinde segmenter kemik defektlerine yerleştirildiğinde artmış osteojenik potansiyel ortaya konulmuştur (178-108). Kök hücrelerin bu amaçla kullanımı umut verici olmakla beraber halen üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

2.8.4.3. Seramik AKGM

Kalsiyum Hidroksiapatit (HAp): HAp yüksek biyo-uyumluluğa sahip bir seramik skafolddur. Kalsiyum fosfatın yüksek ısıda işlem görmesi sonucunda kristallenmesi ile oluşmaktadır. Kemik mineralizasyon sürecine benzer bir yapı sergilemesi HAp'nin yüksek biyouyumluluğunu ve osteokondüktif etkisine imkân tanımaktadır (181, 182). Bunun dışında büyüme faktörleri için çok uygun bir taşıyıcıdır. Sertliğinin belirlenmesinde içerdiği Ca/P oranı önemli rol oynar. HAp molekülünün partikül genişliği ile emilebilirliği arasında ters ilişki bulunmakta ve partikül büyüklüğü arttıkça emilebilirlik azalmaktadır. Farklı cerrahi işlemler sırasında implantların yüzeyinin kaplanmasında kullanılan materyalin yavaş rezorbe olması sebebiyle bu amaçla kullanımı terk edilmiştir (183).

Biyoseramiklerin por genişliklerinin belli standartları olup <10 mikrometre sıvı geçişi için yeterli iken, kemik hücrelerinin kolonizasyonu için >50 mikrometre çapa gereksinim vardır. Yapılan inceleme sonucunda ise kemik gelişimi için ideal por genişliği 565 mikrometre olarak tanımlanmıştır (184). Porozitenin arttığı durumlarda greft materyalinin emilebilirliği artarken sağladığı kuvvet azalmaktadır. Bu materyallerin emilim sürecinde etkili olan bir diğer etken ise PH'tır. Enfeksiyon gibi PH'ın düştüğü asidik durumlarda da greft materyallerinde rezorbsiyon hızlanır.

Hap'nin seramik olmayan formları da bulunmaktadır. Bu formların özelliği seramik olanlara kıyasla şekillendirilmesinin daha kolay olması ve boşluklara rahatlıkla enjekte edilebilmesidir (6).

Trikalsiyum Fosfat (TCP): Bu tipteki materyaller aslında kalsiyum fosfat bileşikleri olup HAp'lere kıyasla daha fazla çözünebilirliğe sahiptirler. %36 porozite oranı ve 100-300 mikrometre por genişliği mevcuttur. Emililebilirliğinin hızlı olmasına karşın düzensiz ve yetersiz olması TCP'ları tek başına zayıf etkili bir kemik greft materyali kılmaktadır (185).

Hızlı rezorbsiyon nedeniyle TCP'ların maksillofasiyal bölge rekonstrüksiyonlarında kullanımı çok sık tercih edilmezken, genelde eldeki greft materyalinin fazlalaştırılması amacıyla uygulanmaktadırlar.

Biyoaktif Camlar: 1970'lerde kullanımına başlanan biyoaktif camlar başlıca osteokondüktif etkiye sahiptirler. Gerek kansellöz otogreftlerle, gerekse tek başlarına kemik onarımlarında çok sık kullanılmaktadır. Silikon, sodyum tuzları, kalsiyum tuzları ve fosfat, yapısını oluşturan başlıca moleküllerdir.

Biyoaktif camın yapısının poröz olmaması sebebiyle vasküler yapılar içerisine doğru penetrasyon gösteremez. Buna karşın bu materyaller kemiğin yanında oluşturdıkları reaksiyonla çevredeki bağ dokusu içerisinde yer alan kollajene yapışma gösterirler (170). Bu süreç greft materyalinin kemik doku ile yer değişimi ile sonlanır (186).

Kalsiyum Sülfatlar: Kalsiyum Sülfatlar; kolay şekillendirilebilen, osteoklastlar tarafından rezorbe edilen, osteoblastlar tarafından osteoid üretimine imkân tanıyan materyallerdir (187). Fakat kalsiyum sülfatların kullanımı biyo-uyumluluğunun tam olmaması ve toksite oluşturabilmesi nedeniyle büyük ölçüde terk edilmiş iken, yeni formları üzerinde çalışılmaya devam edilmektedir. Ortalama rezorbsiyon süresi 12 hafta olup ağırlık taşıyan bölgelerde kullanımından kaçınılmalıdır.

Bunlar dışında polimerik kemik greft materyalleri, titanyum temelli alloplastik implantlar gibi farklı tipte alloplastik materyaller de bulunmaktadır.

2.8.5. Kemik Greft İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Mekanik stres: Kemik greft iyileşmesi sürecinde mekanik stres önemli bir regülatör görevine sahiptir. Fizyolojik dozlarda olan mekanik stres kemik depozisyonu ve hipertrofisine yol açarken sınırlı stres ise kemikte rezorbsiyon ortaya çıkmasına yol açar (6).

Fiksasyon: Greft materyalinin uygun fiksasyonu mekanik stresin aktarımına izin vermesi ve revaskülarizasyonun daha hızlı gelişmesine yol açması nedeniyle iyileşme esnasında önemli bir rol oynamaktadır. Fiksasyon üzerine yapılan çalışmalarda, fiksasyon uygulandığı durumlarda greft yaşayabilirliğinde artış gerçekleştiği ortaya konulmuştur (7, 188, 189). Bunun yanında Lin ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmalarda ise hareketin fazla olduğu bölgelerde fiksasyonun greft syonunu arttırdığı halde hareketin az olduğu bölgelerde greft hacmi üzerine herhangi bir etki oluşturmadığı savunulmaktadır (190).

Periost: Kemik greftlerine dâhil edilen periost katmanı revaskülarizasyonun daha hızlı gelişimine imkân tanınması ve içerdiği öncül hücreler sebebiyle greft yaşayabilirliğini arttıran bir diğer önemli etkendir (191). Peer ve Vainio tarafından yapılan çalışmalarda gerek “inlay”, gerekse “onlay” greftlerde periost varlığının greft iyileşmesini arttırdığı saptanırken, Thompson ve Casson tarafından yapılan çalışmada ise periostun iyileşme üzerine %10'luk bir katkısı olduğu değerlendirilmiştir (192-194).

Alıcı saha: Alıcı sahanın greft inkorporasyonu üzerine oluşturduğu etki multifaktöriyel olup bu etkinin temelinde ise revaskülarizasyon yatmaktadır. Aslında vaskülarizasyonun greft yaşayabilirliği üzerine etkisi uzun yıllar boyunca tartışılmagelmiş ve üzerinde birçok çalışmalar yapılmış bir konudur. Kusiak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada membranöz kemik greftlerinin artmış olan sağ kalımı revaskülarizasyonla yakın ilişkili olduğu belirtilmiştir (195). LaTrenata ve arkadaşları ise doku genişletme işlemi sonrası yerleştirdikleri kemik greftlerinde kontrol grubuna kıyasla canlılığın daha fazla olduğunu saptamışlar ve bu etkiyi doku genişletme sonrası oluşan kapsülün revaskülarizasyon potansiyeline bağlamışlardır (7). Bunun dışında radyoterapi etkisine bağlı fibrozis oluşan zeminlere yerleştirilen kemik greftlerinin yaşayabilirliğindeki azalma yapılan değerlendirmeler sonrasında mikrovasküler dolaşımda ortaya çıkan hasarlanma ve kötü vaskülarizasyonla ilişkilendirilirken, hiperbarik oksijen terapisi, FGF, VEGF gibi anjiogenezi tetikleyici yaklaşımların greft iyileşmesini arttıracığı savunulmuştur (6, 8, 9). Eppley ve arkadaşları radyoterapi zeminine yerleştirilen kemik greft materyalleri üzerine yaptıkları bir başka çalışmada, düzenli FGF-2 infüzyonu yaparak %50 oranında sağ kalım ve artmış revaskülarizasyon oranları elde ederken, kontrol grubunda tüm greftlerde rezorbsiyon oluştuğunu gözlemlemişlerdir (196). VEGF üzerine Helmrach ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise VEGF'nün osteojenik greft materyalleri üzerinde anjiyogenezi 3 katına kadar arttırabildiği ortaya konulmuştur (197). Tüm bu çalışmalarda anjiyogenez ile greft inkorporasyonunun yakın ilişkisi ortaya

koyulurken alıcı sahanın inkorporasyon üzerine vaskülarite dışındaki bir diğer etkisinin enfeksiyon yönünden olduğu gözden kaçırılmamalıdır.

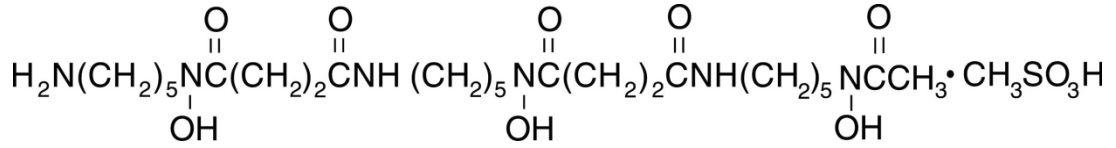
Greft oryantasyonu: Yapılan farklı çalışmalarca greftin yerleştirilmesi esnasında periostal yüzeyin yumuşak dokularla, kansellöz kısmın ise alıcı kemikle doğrudan temas ettiği durumlarda greft inkorporasyonunun arttığı ortaya koyulmuştur (194, 198). Bu çalışmaların çoğunda artmış yaşayabilirlik alıcı sahanın etkisine benzer şekilde erken revaskülarizasyonla ilişkilendirilmiştir.

Embriyolojik köken: Kemik greftlerinin embriyolojik kökenlerinin yaşayabilirlik üstüne etkisi üzerinde görüş birliğine varılmamış etkenlerden bir diğeridir. 1951 yılında Peer yaptığı çalışma sonucunda ilk kez embriyonik kökenin kemik greft iyileşmesinde önemli olduğunu vurgulamış ve encondral kökenli kemik greftlerinde fibröz doku gelişimini saptarken membranöz kökenli greftlerde fibröz doku oluşmadığına dikkat çekmiştir (192). Thompson ve Cassonda da benzer şekilde membranöz kökenli kemik greftlerinin yaşayabilirliğinin daha fazla olduğunu öne sürmüşlerdir (194). Araştırmacılar her ne kadar bu etkiyi membranöz kemiklerin erken revaskülarizasyonu ile ilişkilendirmiş olsa da farklı çalışmalarca membranöz kökenin, vaskülarizasyon üzerine etki oluşturmadığı ortaya koyulmuştur (199, 200). Bu yönde Ozaki ve Buchman'ın yapmış olduğu çalışmalarda membranöz ve encondral kökenli kortikal kemik greftlerinin yaşayabilirliği arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır (201).

2.9. Desferroksamin

Desferroksamin (DFO); Streptomyces pilosus tarafından üretilen bir çeşit siderafordur. Uzun süredir özellikle talasemi majör gibi sık transfüzyon uygulanan olgularda ortaya çıkan kronik demir birikiminin önüne geçmek amacıyla veya akut demir zehirlenmelerinde, demir bağlayıcı şelatör olarak kullanılan bu madde, ticari olarak Desferal® 0.5gr flakon (Novartis, isviçre) adı altında bulunmaktadır.

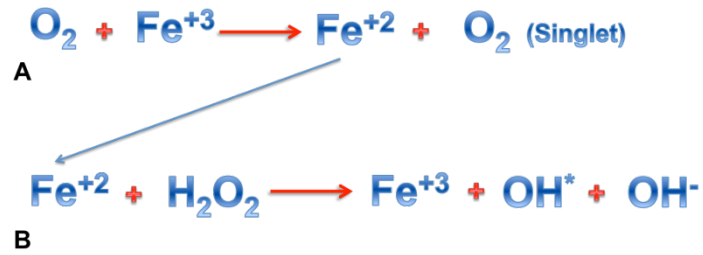
Piyasada satılan şekli metansülfanat ile bileşik formda olup kimyasal formülü; N-[5-[3-[(5- aminopentil) hidroksikarbamol] propionamido] pentil]-3-[[5 (N hidroksiasetamid) pentil] karbamol] propionohidroksamik asit monometanosülfonat'dır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Desferroksamin metansülfanatın kimyasal formülü

DFO farmakolojik özellikleri doğrultusunda; ferritin ve hemosiderin yapısı içerisinde bulunan +3 değerlikli ferrik formdaki demire bağlanma gösterirken, hemoglobin, sitokrom veya transferrin yapısındaki demire tutunma göstermez. DFO ile Fe^{+3} bağlanması sonucu oluşan şelat suda çözünür bir yapıda olup esas olarak idrar yoluyla atılırken, geride kalan bir miktar şelat ise safra kesesi ve gayta yoluyla vücuttan itrah edilmektedir.

Demir molekülü organizmada serbest oksijen radikallerinin oluşumu esnasında önemli bir rol oynamaktadır. Dokuda ferritin veya hemosiderin yapısında depo edilen +3 değerlikli (ferrik) demirin O_2 ile reaksiyona girmesi sonucunda Fe^{+2} ve O_2 (singlet oksijen) oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.8) (202). Bu reaksiyon sonrası oluşan Fe^{+2} (ferröz) molekülü ise Fenton reaksiyonu üzerinden serbest hidroksil radikallerinin (OH^*) oluşumuna yol açarken diğer taraftan prolil hidroksilaz aktivitesini de tetikler (10).

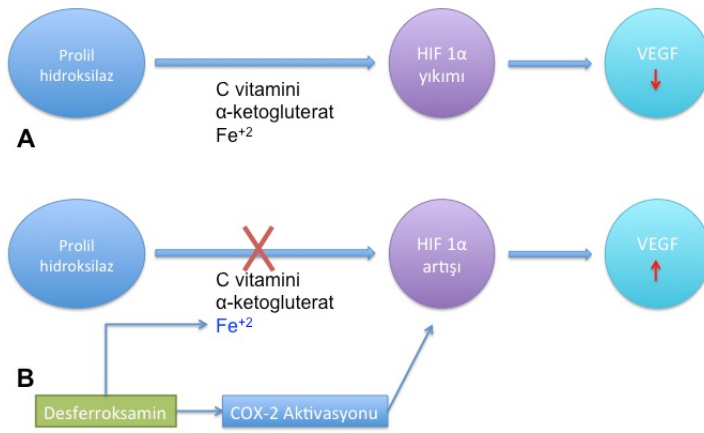


Şekil 2.8. Fenton reaksiyonu

- A) Ferrik formdaki demirin oksijenle reaksiyona girmesi sonucunda +2 değerlikli demir oluşumu.
 B) Fe^{+2} 'nin Fenton reaksiyonuna girerek serbest hidroksil radikalının oluşumu.

Prolil hidroksilaz; α -ketoglutarat bağımlı dioksijenaz enzim ailesinin bir üyesidir ve oksijen, α -ketoglutarat, Fe^{+2} ile askorbik asit varlığında HIF-1 α 'yı parçalayarak inaktive eder (Şekil 2.9) (203). Bir prolil hidroksilaz inhibitörü olarak bilinen DFO ise başta Fe^{+3} olmak üzere prolil hidroksilazın kofaktörü olan Fe^{+2} miktarında azalma oluşturarak aktivitesini sınırlamakta ve ortamda HIF-1 α artışına

imkân sağlamaktadır (10). DFO buna ek olarak mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte COX-2 enzimi üzerinde indüksiyon yaratarak diğer bir yoldan da yine HIF-1 α artışına yol açmaktadır (204). HIF-1 α artışı ise nükleus düzeyinde VEGF sentezini tetiklemekte ve başta anjiogenez olmak üzere VEGF'nün kemik doku üzerinde oluşturacağı etkilerini stimüle etmektedir. Bunun yanında DFO ortamda demir miktarının azalmasına bağlı Fenton reaksiyonu oluşumu kısıtlayarak serbest oksijen radikallerinin de açığa çıkışını azaltmaktadır (10).



Şekil 2.9. DFO-Prolil hidroksilaz- HIF-1 α ilişkisi

A) Prolil hidroksilazın HIF-1 α üzerindeki etkisi. **B)** Desferoksaminin prolil hidroksilaz inhibisyonu ve HIF-1 α artışına yol açma mekanizmasının şematik görünümü.

DFO uygulamasının nükleer β -katenin birikimi ve transkripsiyonel aktivite üzerine oluşturduğu stimülasyon kemik oluşumu esnasındaki bir diğer önemli etkisini oluşturmaktadır (205). Aktive β -katenin osteoprogenitör farklılaşma için önemli bir görev üstlenirken, mezenkimal prekürsörlerde β -kateninin ortadan kaldırıldığı durumlarda osteoblastik farklılaşmada defektlerin olduğu izlenmiştir (206-207).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

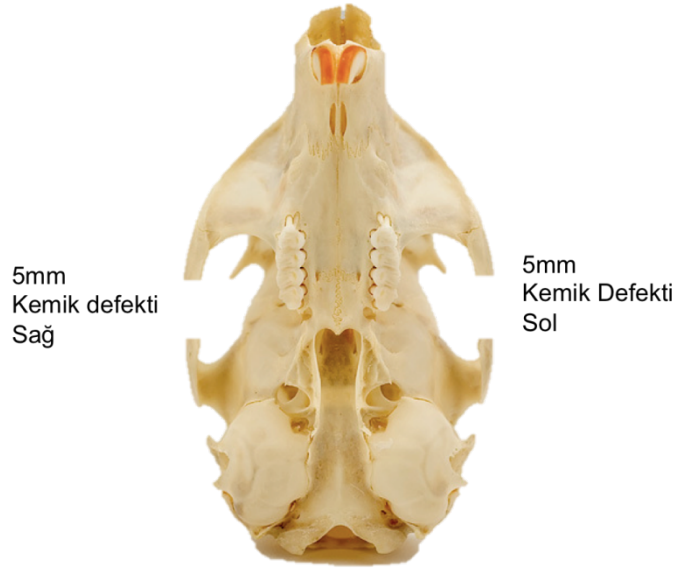
Bu çalışma Gülhane Askeri Tıp Akademisi Etik Kurulu ve Bilimsel Kurulu onayının alınmasını takiben 2013/07 no'lu proje altında yürütüldü. Çalışma Nisan 2013-Temmuz 2013 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi ve Hacettepe Üniversitesi Araştırma Geliştirme Merkezinin olanakları ile yapıldı. Deney hayvanları ile çalışan personelin hepsi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına sahip idi.

Bu çalışmada deney hayvanı olarak GATA Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edilen 350-400 gram ağırlığında 32 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar ikişerli veya üçerli olacak şekilde uygun kafeslerde 23 ± 1 °C sıcaklıkta, 12 saat karanlık/12 saat aydınlık ortam şartlarında barındırıldı. Çalışma esnasında deney hayvanı sarfını azaltmak amacıyla sıçanların sağ zigomatik kemikleri deney grubunu, sol zigomatik kemikleri kontrol grubunu oluşturacak şekilde planlandı.

3.1. Deney Modeli

Çalışma içerisinde yer alan bütün sıçanlarda deney modeli olarak; sıçanda kritik büyüklükte, yani 5 mm. uzunluğunda zigomatik ark kemik defekt modeli kullanıldı (Şekil 3.1) (4). Bunun için zigomatik ark tamamen ortaya koyulduktan sonra zigomatikotemporal sutura orta noktayı oluşturacak şekilde bilateral 5 mm. uzunluğunda kemik segmenti çıkarıldı. Çıkarılan kemik segmenti deneklerin yarısında ($n_{\text{sıçan}}=16$) karşı tarafın onarımı amacıyla kemik grefti olarak kullanılırken, diğer yarısında ($n_{\text{sıçan}}=16$) defekt alanı onarım uygulanmadan boş bırakıldı.

Cerrahi aşamaya ek olarak Grup 1 ve 2 içerisinde yer alan 16 deneğin sağ zigomatik ark bölgesindeki yumuşak doku içerisine operasyon öncesi 7. günden başlayıp operasyon sonrası 45. güne kadar DFO enjeksiyonu uygulanırken, sol tarafa ise aynı sürelerde %0.9 NaCl enjeksiyonu yapıldı. Grup 3 ve 4 deneklerde ise operasyon öncesi enjeksiyon yapılmazken, operasyon sonrası 45 gün boyunca gün aşırı enjeksiyon uygulandı.



Şekil 3.1. Sıçanların her iki zigomatik arkında 5 mm. uzunluğunda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektinin şematik görünümü

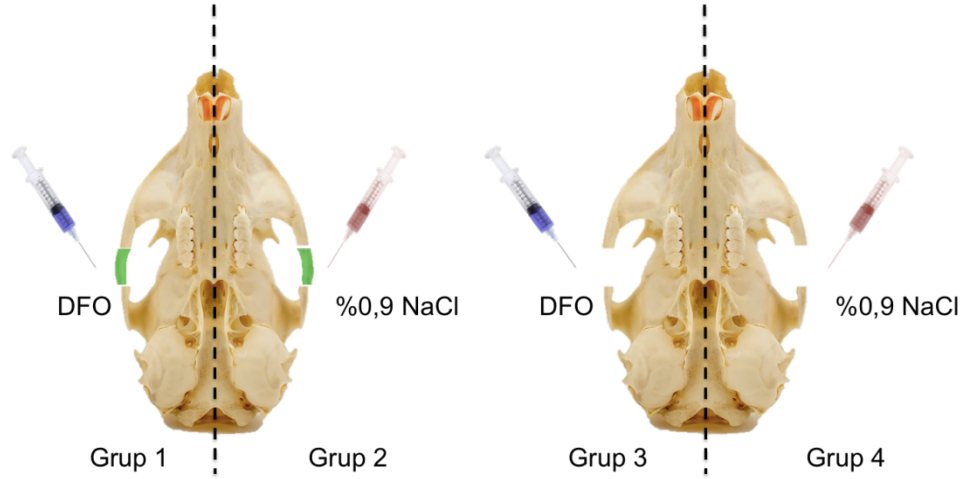
Deney ve kontrol gruplarının sınıflandırılması ise cerrahi aşamada greft uygulanıp uygulanmaması ile enjeksiyon aşamasında kullanılan içerik doğrultusunda yapıldı (Şekil 3.2). Grupların dağılımı aşağıdaki gibidir;

1.Grup: Sağ zigomatik arkta oluşturulan defektin karşı taraf zigomatik arkta elde edilen kemik grefti ile onarıldığı ve düzenli DFO enjeksiyonu uygulanan deney grubu (n=16).

2.Grup: Sol zigomatik arkta oluşturulan defektin karşı taraf zigomatik arkta elde edilen kemik grefti ile onarıldığı ve düzenli %0.9 NaCl enjeksiyonu uygulanan, 1. Grubun kontrol grubu (n=16).

3.Grup: Sağ zigomatik arkta oluşturulan defekt alanının boş bırakılıp herhangi bir onarım uygulanmadığı ve düzenli DFO enjeksiyonu uygulanan deney grubu (n=16).

4.Grup: Sol zigomatik arkta oluşturulan defekt alanının boş bırakılıp herhangi bir onarım uygulanmadığı ve düzenli %0.9 NaCl enjeksiyonu uygulanan, 3. Grubun kontrol grubu (n=16).

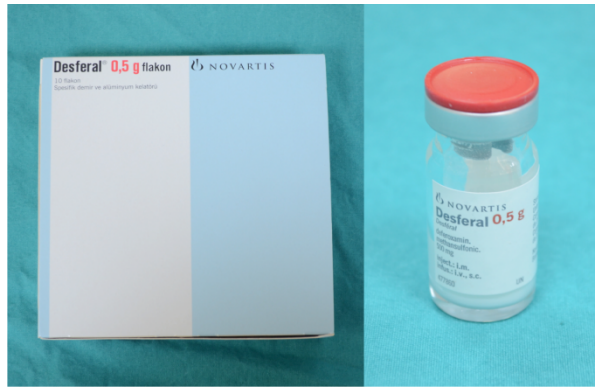


Şekil 3.2. Deney ve kontrol gruplarının şematik görünümü

Grup 1 ve 2’de kemik grefti ile onarım uygulanırken, Grup 3 ve 4’te defekt alanları boş bırakıldı

3.2. Operasyon Tekniği

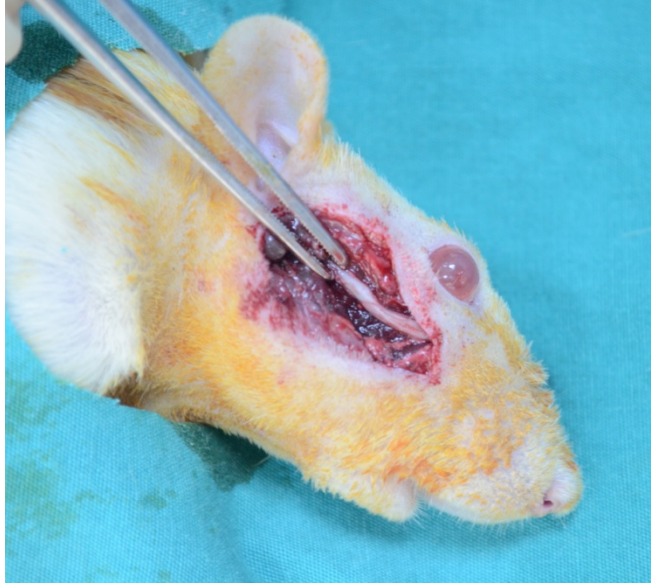
Grup 1 ve 2 sıçanların deney grubunu oluşturan sağ zigomatik ark bölgesine operasyondan 7 gün önce başlayarak, gün aşırı 200 microM/300 microL desferroksamin metansülfonat (Desferal 0.5g flakon, Novartis, İsviçre) (Resim 3.1) enjeksiyonu, karşı tarafa ise aynı hacimde %0.9 NaCl enjeksiyonu yapıldı ve 7. günde cerrahi aşamaya geçildi.



Resim 3.1. Desferroksamin metansülfonatın ticari formu olan Desferal 0.5 g flakon (Novartis, İsviçre)

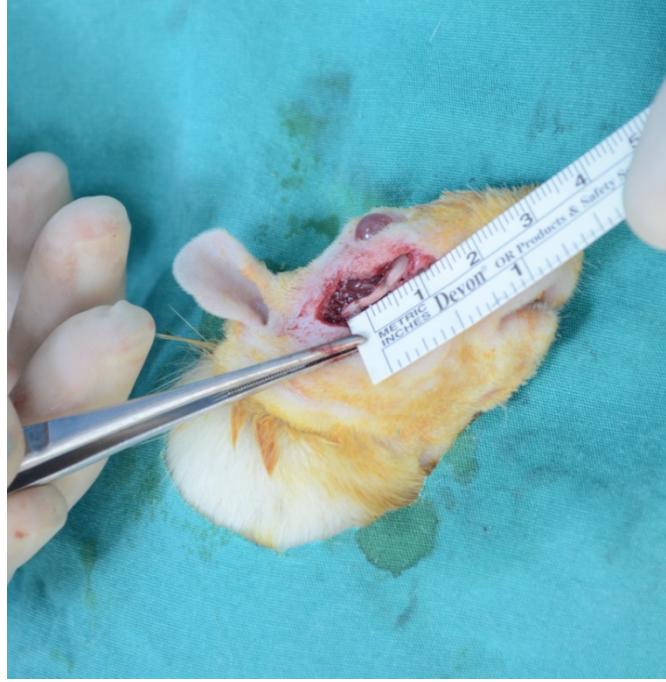
Cerrahi işlemler genel anestezi ve steril şartlar altında gerçekleştirildi. Sıçanların genel anestezisi 40 mg/kg dozunda Ketamin (Ketalar, Parke-Davis, Morris Planis, NJ) ve 5-12 mg/kg dozunda Ksilazin (Rompun, 2%solution, Bayer, Germany)

kombinasyonu ile sağlandı. Anesteziyi takiben deneklerin yüz bölgesi traş edilerek, batikon (%10 povidonyodin poliiyot) ile cerrahi saha dezenfekte edildi ve malar bölge üzerinde 2 cm. uzunluğuunda horizontal insizyon yapıldı. Kas ve yumuşak dokuların diseksiyonu sonrasında zigomatik arka ulaşıldı ve kemik doku ortaya konuldu (Resim 3.2).



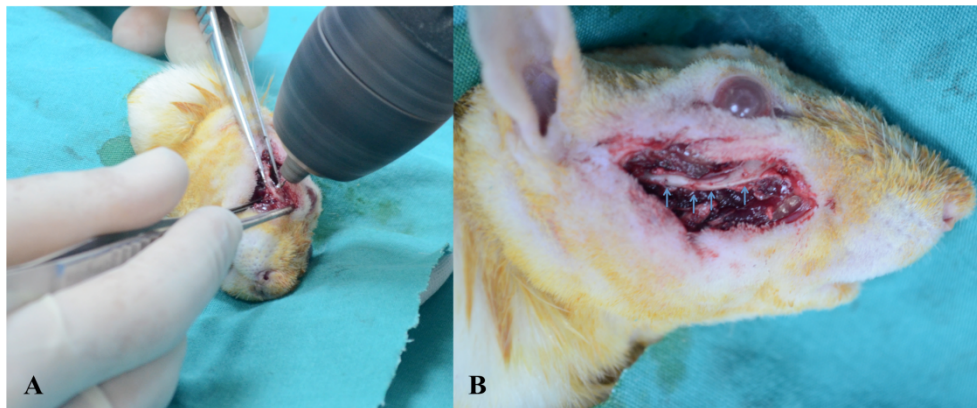
Resim 3.2. Horizontal insizyon sonrasında yumuşak dokuların uzaklaştırılarak zigomatik arkın ortaya koyulması

Zigomatik ark üzerinde bulunan zigomatikotemporal suture orta noktayı oluşturacak şekilde 5 mm. uzunluğuunda kritik büyüklükte defekt oluşturulacak alan kurşun kalem ile işaretlendi (Resim 3.3).



Resim 3.3. 5 mm. uzunluğunda kritik boyutlu kemik defekti oluşturulacak alanın sınırlarının işaretlenmesi

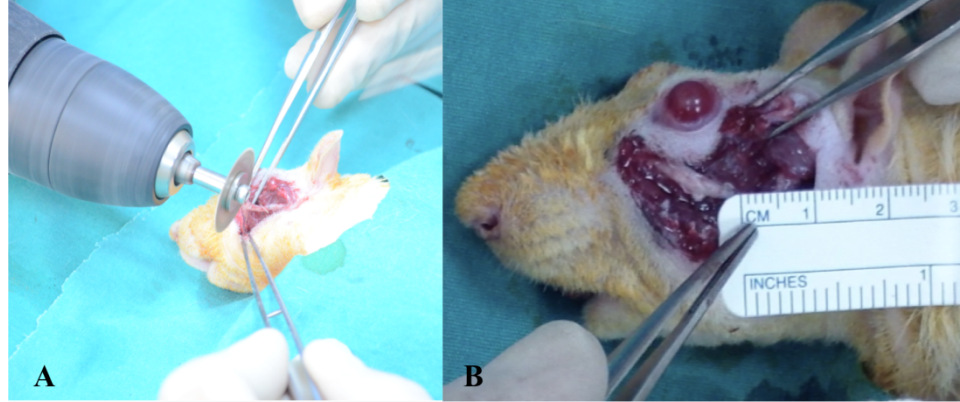
Kemik grefti ile onarım uygulanacak 1 ve 2. Grup sıçanlarda, tespit aşamasında kullanmak amacıyla 0,4 mm. çapında delici uç yardımıyla iki tanesi işaretli alan içerisinde, iki tanesi ise işaretli alanının anterior ve posterior kısmında yer alan kemik segmentlerinde olacak şekilde toplam 4 adet delik açıldı (Resim 3.4). Grup 3 ve 4'te ise defekt alanları boş bırakılacağı için bu aşama uygulanmadı.



Resim 3.4. Tespit deliklerinin açılması

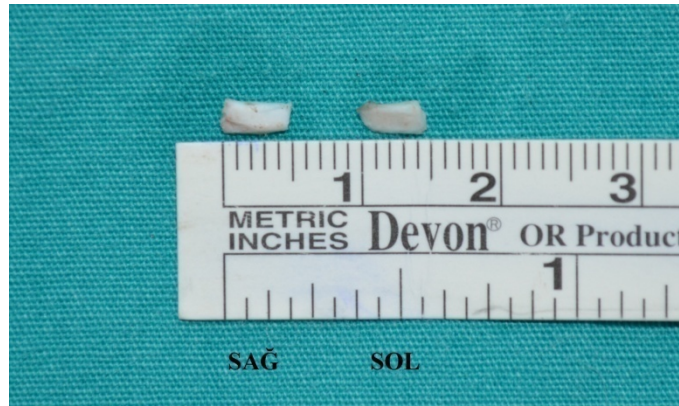
A) 0,4 mm. uç yardımıyla tespit deliklerinin açılması **B)** Delikler açıldıktan sonraki lateral görünüm, oklar delikleri göstermektedir.

Bir sonraki basamakta; tüm gruplarda 5 mm. uzunluğunda işaretlenmiş olan kemik segmentinin anterior ve posterior sınırlarından 0,1 mm. kalınlığında döner testere yardımıyla osteotomi yapılarak bilateral kritik boyutlu kemik defekti oluşturuldu ve periostla beraber kemik greftleri elde edildi (Resim 3.5, 3.6).



Resim 3.5. Osteotomilerin yapılması

A) 0,1 mm. kalınlığında testere yardımıyla osteotomilerin yapılması. B) Kritik büyüklükteki kemik defektinin oluşturulması.



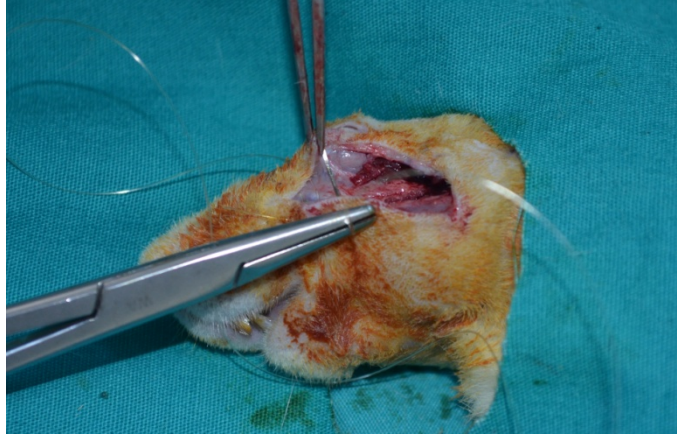
Resim 3.6. Sağ ve sol zigomatik arkta elde edilen 5 mm. uzunluğunda kemik greftleri

Grup 1 sıçanlarda sol taraftan elde edilen kemik greftleri, üzerinde oluşturulan deliklerden geçirilen 7/0 Prolen (Doğsan, Trabzon, Türkiye) dikiş materyalinin sağ taraftaki deliklerden geçirilip bağlanması yoluyla tespit edildi. Grup 2 sıçanlarda ise 1. Grubun tam tersi olacak şekilde sağ taraftan elde edilen kemik greftleri, sol tarafta oluşturulan defekt alanlarına yerleştirilerek sabitlendi (Resim 3.7).



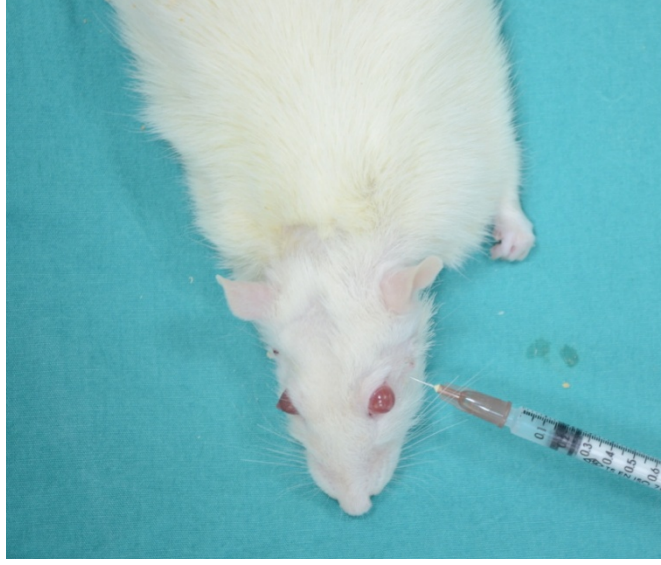
Resim 3.7. Kemik greftlerinin 7/0 prolene suture yardımıyla fiksasyonu

Tüm gruplardaki sıçanların diseke edilen kas dokuları defekt alanının çevresini örtecek şekilde uygun pozisyona yerleştirildikten sonra 6/0 Vikril (Doğsan, Trabzon, Türkiye) ile suture edilirken, cilt insizyonları ise 5/0 Monokril (Doğsan, Trabzon, Türkiye) ile suture edilerek cerrahi prosedür tamamlandı (Resim 3.8).



Resim 3.8. İnsizyon hatlarının suture edilmesi

Cerrahi prosedürün tamamlanmasını takiben 45 gün süresince sıçanlara gınaşırı sevofloran (Sevoran, Abbott, USA) yardımıyla inhalasyon anestezisi uygulandı ve sedasyon altında sağ taraflarına 200 microM/300 microL DFO sol taraflarına ise aynı miktarda %0.9 NaCl enjeksiyonuna devam edildi (Resim 3.9).



Resim 3.9. Sıçanlara 45 gün süresince gün aşırı DFO ve %0.9 NaCl enjeksiyonu uygulandı

3.3. Deney Protokolü

Cerrahi işlem sonrası 1. haftada Grup 1 ve 2 sıçanların 4'ünden, Grup 3 ve 4'te yer alan sıçanların da yine 4 tanesinden histolojik değerlendirme amacıyla örnekler toplandı. Zigomatik arkta elde edilen örnekler, horizontal insizyon yardımıyla operasyon alanları açılarak, tüm operasyon alanını ve her iki sağlam fragman ucunun bütünlüğü korunacak biçimde 2 cm. uzunluğunda alındı (Resim 3.10).

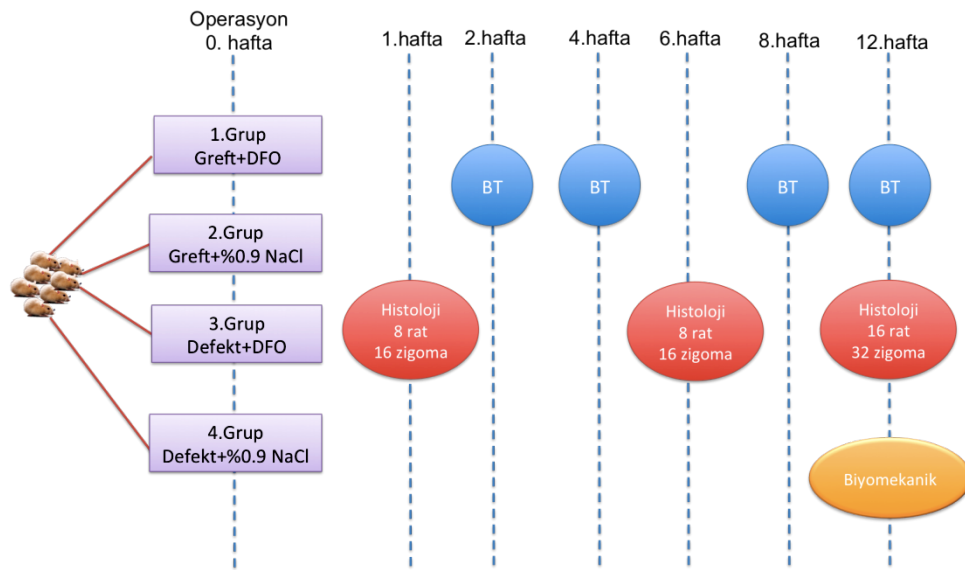


Resim 3.10. Zigomatik arkların eksizyonu

A) Lateral insizyon sonrasında zigomatik arka ulaşıldı. **B)** Her iki zigomatik ark histolojik değerlendirme amacıyla blok olarak eksize edildi.

Birinci haftanın sonunda geride kalan 24 sıçana takip eden 2 ve 4. haftalarda genel anestezi altında bilgisayarlı tomografi ile görüntüleme yapıldı. Altıncı haftada histolojik değerlendirme amacıyla tüm gruplardan 4'er sıçan daha kurban edilerek kemik örnekleri alındı.

6. haftanın sonunda kalan 16 sıçan ise 8 ve 12. haftalarda iki kez daha bilgisayarlı tomografi yardımıyla kemik iyileşmesi açısından değerlendirilirken, 12. haftanın sonunda denekler kurban edilip, elde edilen örnekler biyomekanik ve histolojik olarak incelendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Gruplar ve çalışma programının şematik görünümü

(DFO: Desferroksamin, BT: Bilgisayarlı Tomografi).

3.4. Değerlendirme Yöntemleri

3.4.1. Klinik Değerlendirme

Histolojik örneklerin elde edilmesi aşamasında makroskopik olarak Grup 1 ve 2'de kemik greftinin stabilitesi, çevre dokudaki vaskülerite artışı, Grup 3 ve 4'te defekt alanındaki kapanma miktarı ve vaskülerite farklılıkları değerlendirildi.

3.4.2. Radyolojik Değerlendirme

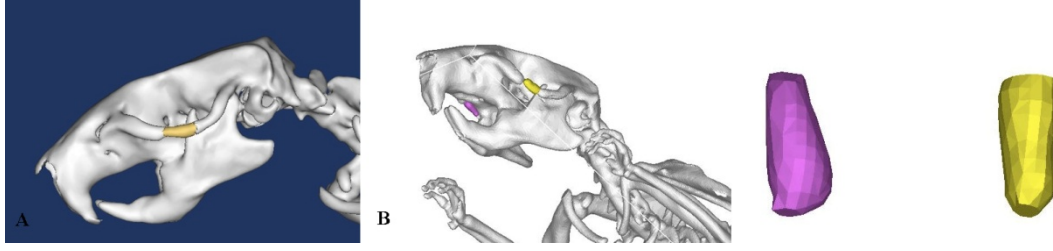
Operasyonu takiben 2 ve 4. haftada 24 sıçana, 8 ve 12. haftalarda ise 16 sıçana 0,5 mm. kesitsel kalınlıkta koronal, aksiyal planda bilgisayarlı tomografi (Toshiba Aquilion 320, Japan) çekimleri yapıldı ve 3 boyutlu yapılandırma uygulandı (Resim 3.11). Üç boyutlu BT çalışması, gruplar arasında kemik greft hacminde ve “gap”te oluşacak farkların tespit edilebilmesi amacıyla tercih edildi.



Resim 3.11. Sıçanların radyolojik değerlendirilmesi

Sıçanlara ketamin ve ksilazinle genel anestezi uygulandıktan sonra prone pozisyonda koronal ve aksiyal planda BT çekilerek 3 boyutlu yapılandırma uygulandı.

Deneklerden düzenli aralıklarla elde edilen tomografi görüntüleri “Mimics® 16.0 for X64 (Materialise, Belgium)” programına aktararak elde edilen 3 boyutlu görüntüler, “3-Matic® versiyon 8.0 (Materialise, Belgium)” ile değerlendirilirken, Grup 3 ve 4’te defekt alanında ortaya çıkan azalma ise “Hipax® patient cd viewer (Steinhart, Germany)” programı ile ölçüldü ve ortaya çıkan değişiklikler kaydedildi (Resim 3.12).



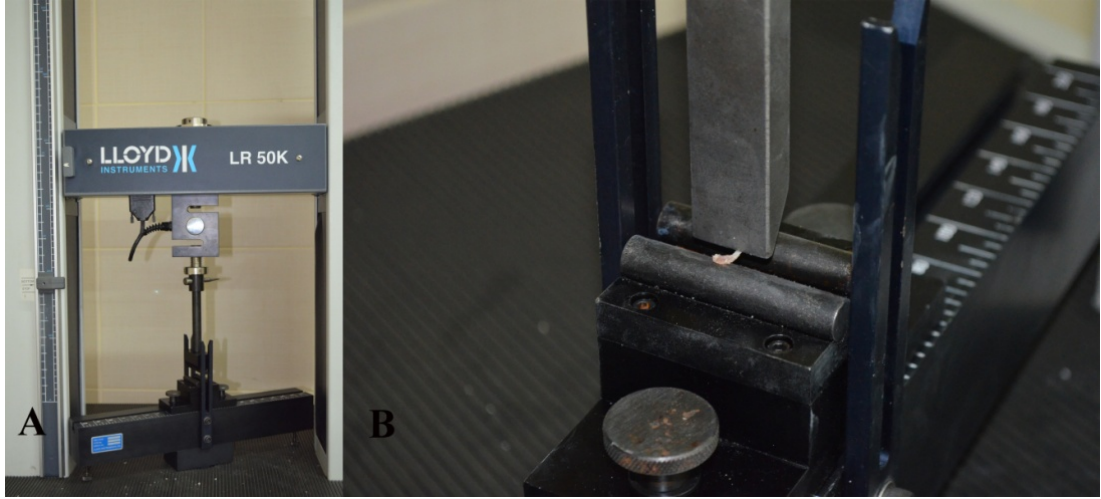
Resim 3.12. Kemik greft hacimlerinin değerlendirilmesi

A) “Mimics®” programı yardımıyla kemik greft alanları işaretlenmesi. **B)** “3-Matic®” programı ile greftlerin hacimlerinin hesaplanması.

3.4.3. Biyomekanik Değerlendirme

Kemik grefti ile onarım uygulanmış 8 sıçanın 12. haftanın sonunda sakrifiye edilmesiyle elde edilen örneklerle, histolojik inceleme öncesinde Hacettepe Üniversitesi Araştırma Geliştirme Laboratuvarında bulunan “Llyod LR 50K” (Llyod Instruments, UK) isimli cihaz yardımıyla 3 nokta eğme testi uygulandı (Resim 3.13A).

Grup 1 ve 2 deneklerden elde edilen 2 cm. uzunluğundaki örnekler; ıslak gazlı beze sarılarak bekletilmeden laboratuvar ortamına taşındı. Test aşamasında zigomatik arkın hasarlanmamış olan anterior ve posterior fragmanları hazırlanan düzencek üzerinde sabitlenirken, ortada bulunan greft alanına 1mm/dk hızında düzenli şekilde artan kuvvet uygulandı ve kemiğin kırılma anındaki yük değerleri Newton cinsinden kaydedilerek, yük-deformasyon eğrileri çıkarıldı (Resim 3.13B). Bu eğriler üzerinden kemiklerin maksimum kırılma yükü ve defleksiyon oranı saptanırken, elastik limite denk gelen değerler baz alınarak örneklerin katılık modülü değerleri saptandı.



Resim 3.13. Biyomekanik değerlendirme

A) Değerlendirme esnasında kullanılan biyomekanik test cihazı (Llyod LR 50K, Llyod Instruments, UK). B) Kemik greftinin değerlendirme esnasındaki görüntüsü.

3.4.4. Histolojik Değerlendirme

Histolojik inceleme, GATA Patoloji AD.'da gerçekleştirildi. Operasyon sonrası 1. haftada 8 sıçanın (16 zigoma), 6. haftada 8 sıçanın (16 zigoma) ve 12. haftada 16 sıçanın (32 zigoma) operasyon alanları lateral insizyon ile açıldı ve zigomatik ark yapıları ortada defekt alanı yer alacak şekilde 2 cm. uzunluğunda çıkarıldı. Zigomatik arklarlarda kemik greftinde kayıp gözlenen sıçanlarda, aradaki fibröz yumuşak dokuların bütünlüğünün bozulmamasına özen göstererek örnekler blok olarak alındı. Toplanan doku örnekleri öncelikle 2 gün süresince %10'luk fiksatif formalin içine koyulurken takiben formik asit içinde dekalsifiye edildi ve parafin içine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında horizontal kesitler alındı. Grup 1 ve 2'de greft alanını, Grup 3 ve 4'te ise yeni oluşan kemik dokusunu kapsayan kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu (Nikon Eclipse i80, Japan) yardımıyla 40X büyütme altında incelendi. İncelenen alanlar içerisinde rastgele 5 bölge seçilip içerdikleri osteoblast, osteoklast ve damar yapıları sayılarak ortalamaları alındı.

3.4.5. İstatistiksel Değerlendirme

Test metodunun belirlenmesi aşamasında öncelikle verilerin normal dağılıma uygunluğu "Kolmogorov Smirnov testi" ile incelendi. Normal dağılıma uygun

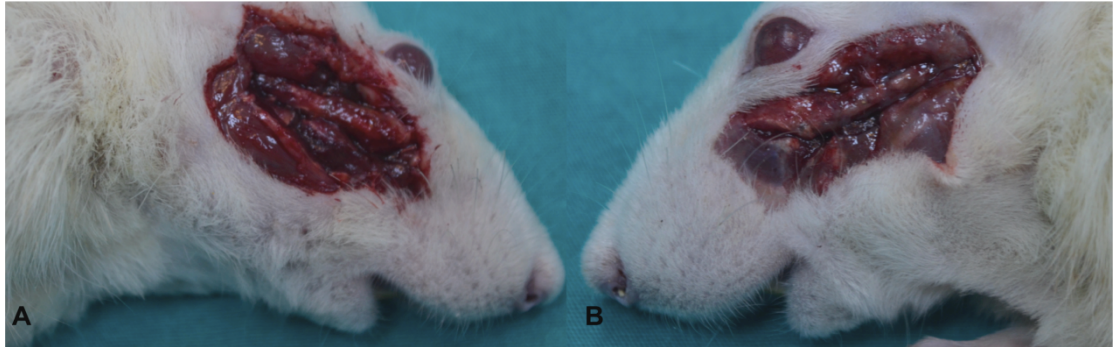
olmadığı gözlemlenen; greft hacim değişiklikleri, defekt alanında azalma miktarı, biyomekanik testlerde elde edilen kırılma noktası ve katılık modülüs değerlerinin incelemesinde “Wilcoxon Signed Rank testi” uygulanırken, ortanca değerler ile tamamlayıcı istatistik olarak minimum/maksimum değerlerinin kullanılmasına karar verildi. Normal dağılıma uygun olduğu gözlemlenen osteoblast sayısı, osteoklast sayısı ve anjiyogenez yoğunluğunun değerlendirmesinde ise “Eşleştirilmiş T testi” uygulandı ve ortalama değerler ile tamamlayıcı istatistik olarak standart sapma değerleri kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizleri “SPSS 15.0 for Windows” programı yardımıyla yapılırken, $p < 0.05$ değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Makroskobik değerlendirmeler örneklerin toplanması aşamasında aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi.

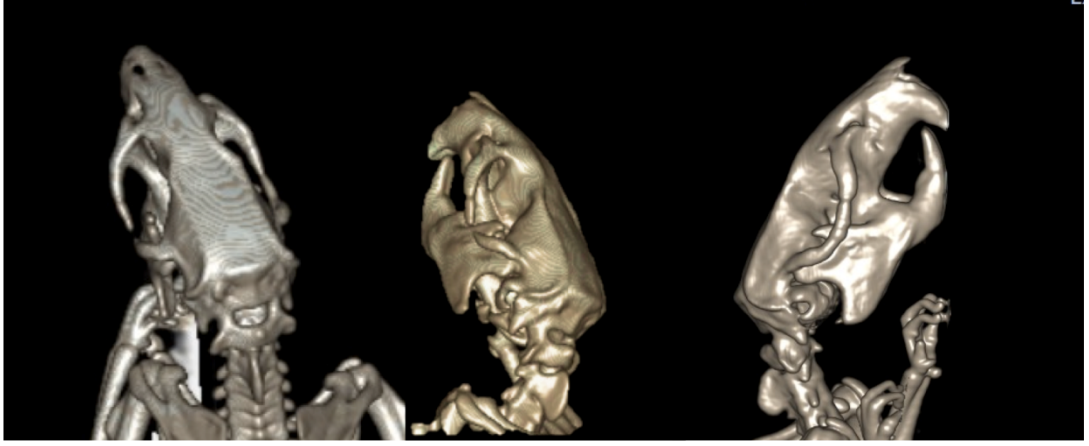
1. haftanın sonunda Grup 1 ve Grup 3 içerisinde yer alan sıçanların zigomatik arkı çevreleyen yumuşak dokusunda, Grup 2 ve 4'e kıyasla kanama odaklarında belirgin şekilde artış olduğu gözlemlendi (Resim 4.1). Bunun dışında Grup 3 ve 4 deneklerdeki kemik "gap"inin değerlendirmesi ile Grup 1 ve 2 deneklerdeki kemik greftlerinin stabilitesi açısından önemli bir farklılık gözlenmedi. Ancak hem Grup 1 hem de Grup 2 deneklerde greft hacminin bir hafta öncesine oranla kısmi rezorbsiyona uğradığı tespit edildi.



Resim 4.1. Her iki zigomatik arkı çevreleyen yumuşak dokuda vaskülaritenin makroskobik değerlendirmesi

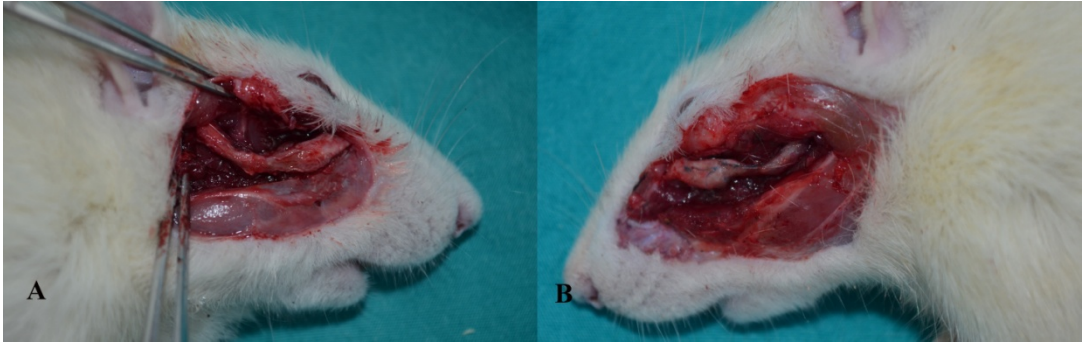
A) Grup 1'de (sağ zigomatik ark) çevre yumuşak dokuda yaygın kanama odaklarının görünümü. **B)** Grup 2'de (sol zigomatik ark) ise karşı tarafa kıyasla daha az miktarda kanama odağı gözlemlendi.

6. haftada alınan örneklerin ve çevre dokuların makroskobik değerlendirmesinde ise Grup 1 ve 2 arasında kanama odakları açısından belirgin farklılık izlenmezken, kemik greftlerinin bir sıçanın sol tarafı (Grup 2) dışında stabil olduğu gözlemlendi (Resim 4.2).



Resim 4.2. 6. haftada “non-union” ve rezorbsiyon izlenen Grup 2 deneğin 3 boyutlu BT görüntüleri

Bunun dışında hiçbir örnekte enfeksiyona ait bulgu izlenmezken greft hacminde Grup 1 deneklerde, Grup 2 deneklere kıyasla daha fazla artış olduğu değerlendirildi (Resim 4.3).



Resim 4.3. Altıncı haftada deneklerin klinik değerlendirmesi

A) Grup 1 deneklerde kemik greft hacminin normal seviyeye yaklaşmış olduğu izlendi. **B)** Grup 2 deneklerde ise kemik greft hacminin operasyon esnasındaki hacmine kıyasla halen az olduğu tespit edildi.

Aynı dönemde Grup 3 ve 4 içerisinde yer alan deneklerin değerlendirmesinde ise Grup 3’teki defekt boyutunda Grup 4’e kıyasla azalma olduğu saptandı.

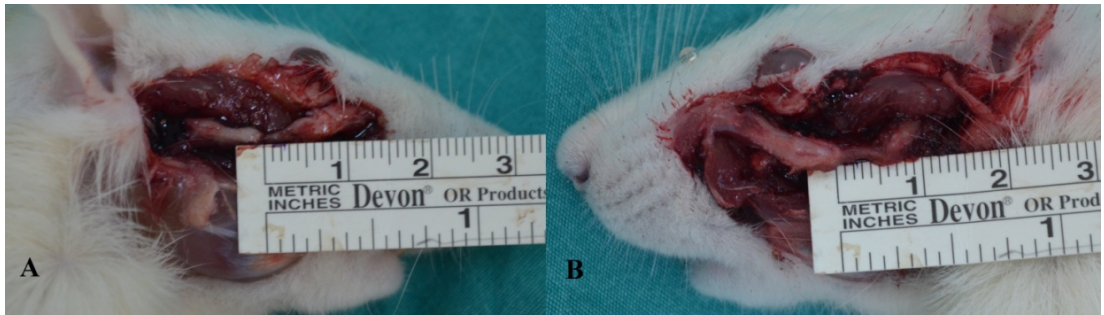
12. haftada elde edilen örneklerin incelemesinde Grup 1 ve 2’de kemik greftlerinin tamamen stabil olduğu izlenirken, Grup 1’deki kemik hacminin karşı tarafa kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi (Resim 4.4). Grup 3 ve Grup 4’ün

karşılaştırılmasında ise Grup 3 deneklerde, kemik defekt alanında azalmanın daha belirgin hale geldiği saptandı (Resim 4.5).



Resim 4.4. Grup 1 ve 2'de yer alan deneklerin 12. haftadaki klinik değerlendirmesi

A) Grup 1 deneklerde greft iyileşmesi; kemik hacmi karşı tarafa oranla artmış görünümde. B) Grup 2 deneklerde greft iyileşmesi; greft hacminin Grup 1'e kıyasla daha az olduğu görülmektedir.



Resim 4.5. 12. hafta sonunda defekt alanların klinik değerlendirmesi

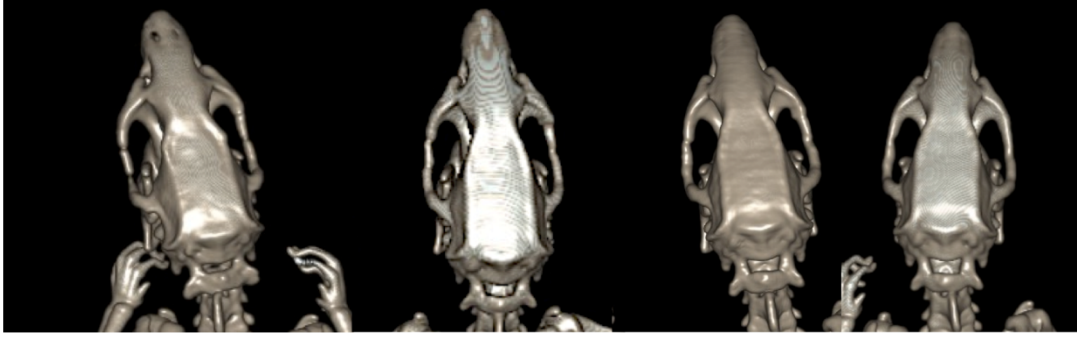
A) Grup 1 deneklerdeki defekt alanında azalma izlenirken B) Grup 4 deneklerin defekt alanlarındaki azalma daha az miktardaydı.

4.2. Radyolojik Bulgular

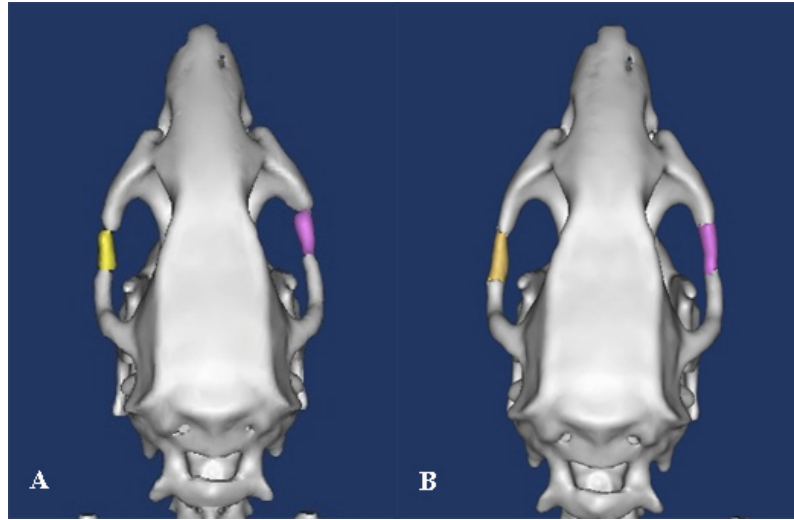
Tüm gruplardaki sıçanlardan 2, 4, 8 ve 12. haftalarda çekilen BT görüntülerinden kemik defekti ve greft hacimleri hesaplandı (Tablo 4.1, 4.2, 4.4, 4.5). Elde edilen verilerden ortanca değerler saptanırken sonraki analizlerde bu değerler kullanıldı (Tablo 4.3 ve 4.6). Gruplar arası karşılaştırma Wilcoxon testi ile yapıldı.

Grup 1 ve 2 deneklerin kemik greft hacimlerinin 2, 4, 8 ve 12. haftadaki değerlendirmelerinde; Grup 1 deneklerde kemik greft hacmindeki erken dönemde

gözlemlenen rakamsal azalmanın daha az miktarda olduğu, takip eden dönemde ortaya çıkan artışın ise daha fazla oranda olduğu izlendi (Resim 4.6, 4.7). Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinde ise gruplar arası anlamlı farklılık ($p<0.05$) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1, 4.2).



Resim 4.6. Grup 1 ve 2’de yer alan bir denekteki kemik greft hacminin 2, 4, 8 ve 12. haftalardaki BT görüntüleri



Resim 4.7. Grup 1 ve 2’de yer alan bir denekteki kemik greft hacminin “Mimics®” programı ile değerlendirilmesi

A) 2. haftadaki greft hacimlerinin görünümü. **B)** 12. hafta sonundaki greft hacimlerinin görüntüsü.

Tablo 4.1. Grup 1'deki deneklerin greft hacimlerinin haftalara göre değişimi

Grup 1	2. hafta (mm³)	4. hafta (mm³)	8. hafta (mm³)	12. hafta (mm³)
Denek 1	15,65	14,25	16,18	18,23
Denek 2	16,43	15,35	17,75	19,44
Denek 3	14,27	13,31	15,73	16,64
Denek 4	14,38	13,87	16,24	17,54
Denek 5	13,64	12,54	13,98	16,89
Denek 6	15,83	14,30	16,97	18,17
Denek 7	14,45	14,53	16,58	18,76
Denek 8	16,12	15,65	17,32	19,98
Denek 9*	16,73	15,52		
Denek 10*	15,86	15,61		
Denek 11*	14,12	13,39		
Denek 12*	16,74	15,40		

* Altıncı haftada sakrifiye edilmiş olan denekler.

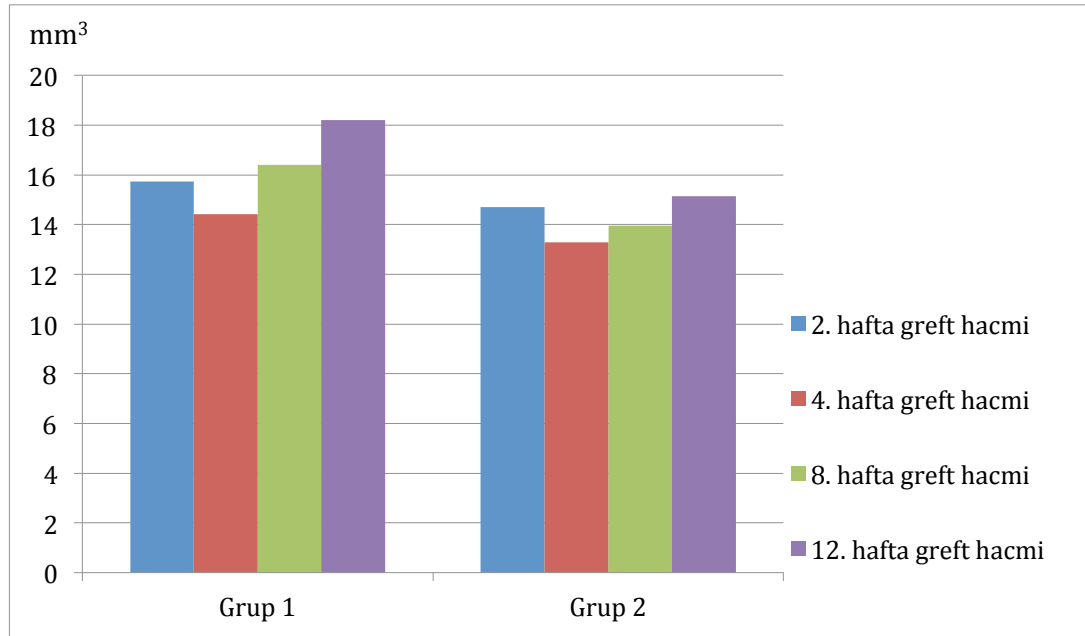
Tablo 4.2. Grup 2'deki deneklerin greft hacimlerinin haftalara göre değişimi

Grup 2	2. hafta (mm³)	4. hafta (mm³)	8. hafta (mm³)	12. hafta (mm³)
Denek 1	14,25	11,32	12,13	13,33
Denek 2	16,10	13,47	14,32	15,24
Denek 3	13,14	12,36	13,73	15,97
Denek 4	13,55	12,14	12,65	13,89
Denek 5	12,74	11,98	12,76	13,84
Denek 6	14,67	14,23	14,18	15,60
Denek 7	15,39	13,61	14,45	15,12
Denek 8	15,25	14,67	14,72	15,16
Denek 9*	16,21	13,47		
Denek 10*	15,64	13,12		
Denek 11*	14,74	12,49		
Denek 12*	14,34	14,40		

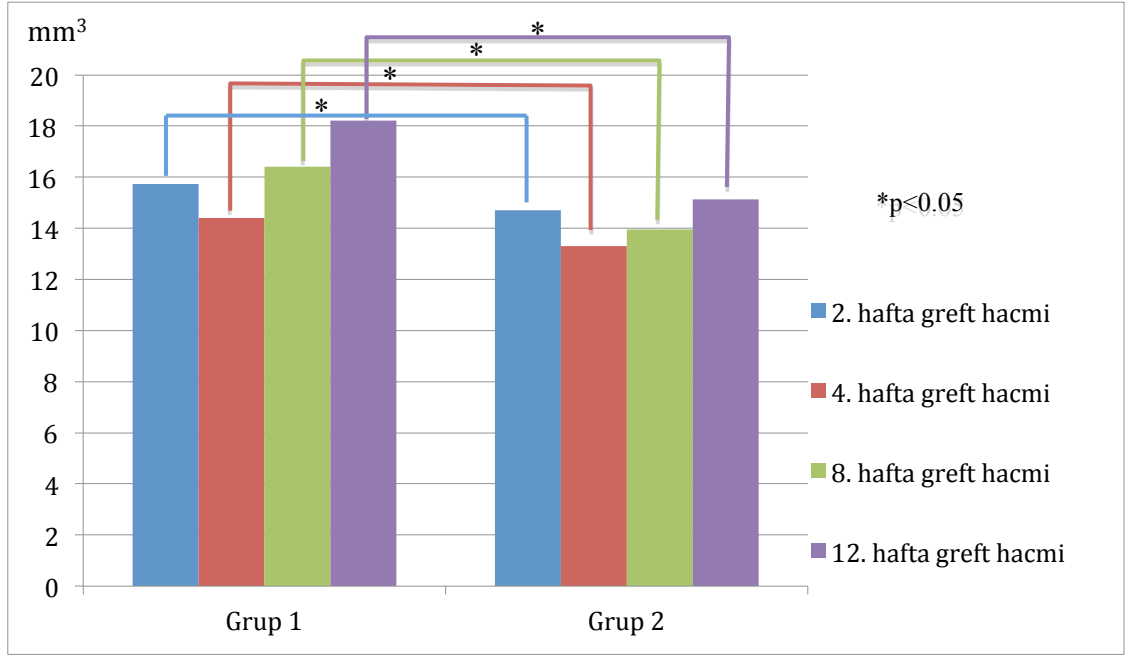
* Altıncı haftada sakrifiye edilmiş olan denekler.

Tablo 4.3. Grup 1 ve 2’de yer alan deneklerin greft hacimlerinin 2, 4, 8 ve 12. haftalardaki ortalama ve minimum, maksimum değerleri

Grup		2. hafta (mm ³)	4. hafta (mm ³)	8. hafta (mm ³)	12. hafta (mm ³)
1	Ortanca	15,74	14,415	16,41	18,20
	Maks-Min	16,74-13,64	15,65-12,54	17,75-13,98	19,98-16,64
2	Ortanca	14,705	13,295	13,955	15,14
	Maks-Min	16,21-12,74	14,67-11,32	14,72-12,13	15,97-13,33



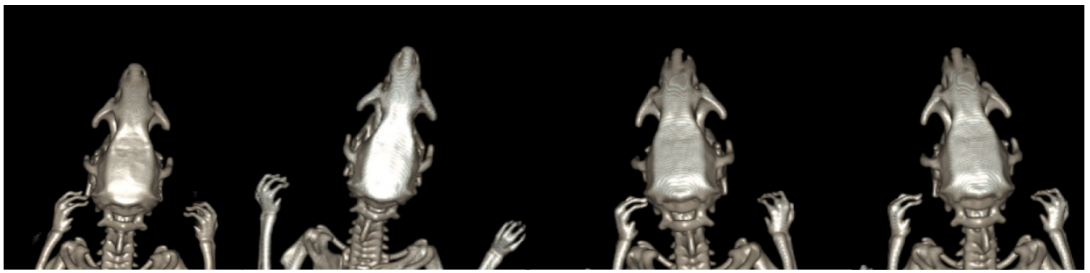
Şekil 4.1. Tablo 4.3’te yer alan değerlerin grafiksel görünümü



Şekil 4.2. Grup 1 ve 2 deneklerde greft hacimlerinin gruplar arası karşılaştırılması

Kemik greft hacimlerinin değerlendirmesinde Grup 1 ve 2 arasında tüm haftalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0.05$, Wilcoxon testi) bulundu.

Grup 3 ve 4'te yer alan deneklerin kemik defekt boyutunun 2. haftadaki ölçümlerinde gruplar arasında anlamlı farklılık ($p>0.05$) izlenmezken, takip eden 4, 8 ve 12. haftalarda ise farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) gözlemlendi (Şekil 4.3, 4.4) (Resim 4.8).



Resim 4.8. Grup 3 ve 4'te yer alan bir denekteki defekt alanının 2, 4, 8 ve 12. haftalardaki BT görüntüleri

Tablo 4.4. Grup 3’teki deneklerin defekt alanlarının haftalara göre değişimi

Grup 3	2. hafta (mm)	4. hafta (mm)	8. hafta (mm)	12. hafta (mm)
Denek 1	4,65	4,43	4,12	3,89
Denek 2	4,72	4,32	4,21	4,02
Denek 3	4,86	4,39	4,14	3,83
Denek 4	4,68	4,32	4,14	3,91
Denek 5	4,87	4,48	4,19	3,93
Denek 6	4,92	4,64	4,37	3,76
Denek 7	4,73	4,50	4,18	3,82
Denek 8	4,92	4,52	4,15	3,93
Denek 9*	4,68	4,34		
Denek 10*	4,79	4,32		
Denek 11*	4,69	4,45		
Denek 12*	4,75	4,36		

* Altıncı haftada sakrifiye edilmiş olan denekler.

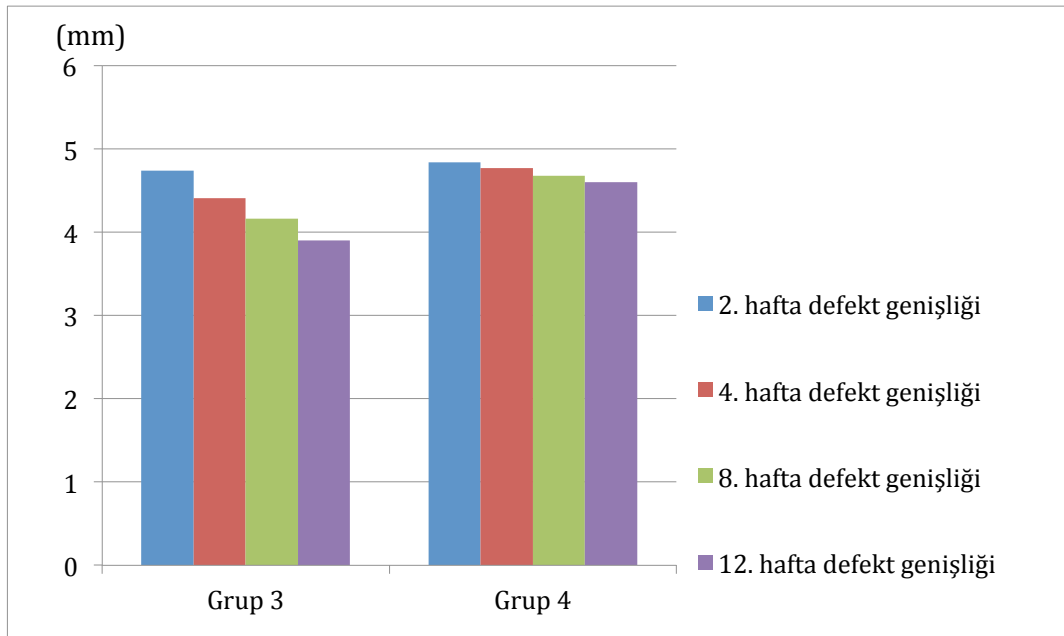
Tablo 4.5. Grup 4’teki deneklerin kritik büyüklükteki defekt alanlarının haftalara göre değişimi

Grup 4	2. hafta (mm)	4. hafta (mm)	8. hafta (mm)	12. hafta (mm)
Denek 1	4,85	4,77	4,70	4,59
Denek 2	4,82	4,69	4,66	4,61
Denek 3	4,74	4,71	4,64	4,58
Denek 4	4,89	4,67	4,63	4,49
Denek 5	4,92	4,80	4,79	4,72
Denek 6	4,91	4,83	4,79	4,76
Denek 7	4,78	4,66	4,54	4,47
Denek 8	4,81	4,74	4,71	4,65
Denek 9*	4,98	4,92		
Denek 10*	4,79	4,77		
Denek 11*	4,83	4,82		
Denek 12*	4,95	4,89		

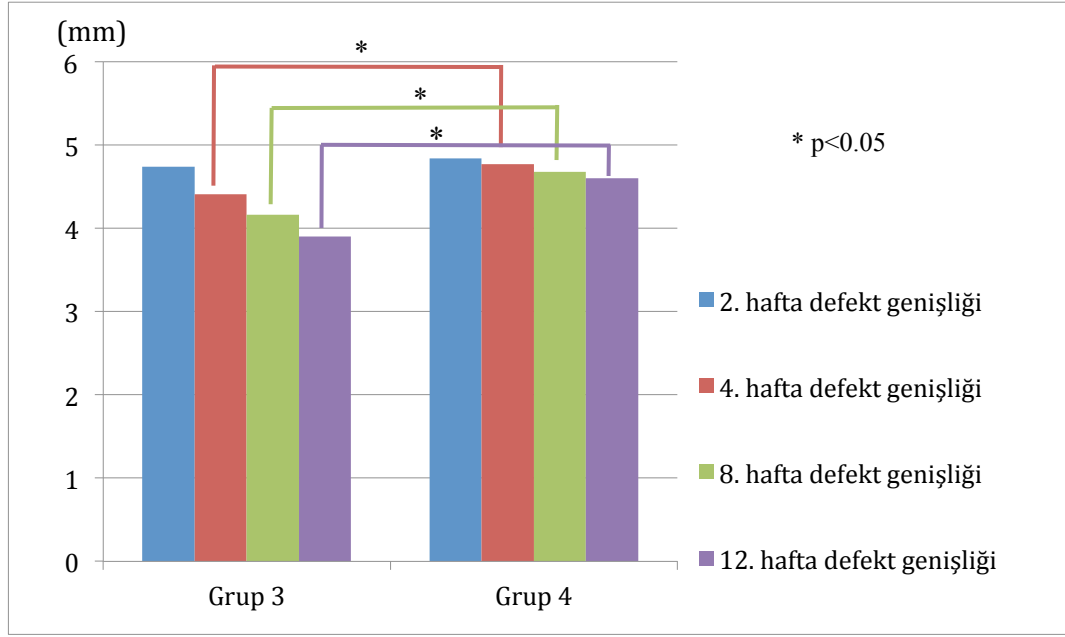
* Altıncı haftada sakrifiye edilmiş olan denekler.

Tablo 4.6. Grup 3 ve 4'te yer alan deneklerin defekt alanlarının 2, 4, 8 ve 12. haftalardaki ortalama ve minimum, maksimum değerleri

Grup		2. hafta (mm)	4. hafta (mm)	8. hafta (mm)	12. hafta (mm)
3	Ortanca	4,74	4,41	4,165	3,9
	Maks-Min	4,65-4,92	4,64-4,32	4,37-4,12	4,02-3,76
4	Ortanca	4,84	4,77	4,68	4,6
	Maks-Min	4,98-4,74	4,92-4,66	4,8-4,5	4,76-4,47



Şekil 4.3. Tablo 4.6'da yer alan değerlerin grafiksel görünümü



Şekil 4.4. Grup 3 ve 4 deneklerde defekt boyut ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması

Grup 3 ve 4 arasında yapılan karşılaştırmada, 2. haftada gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmezken ($p>0.05$, Wilcoxon testi) 4, 8 ve 12. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi.

4.3. Biyomekanik Bulgular

12. haftanın sonunda 1 ve 2. Grupta yer alan 8 denek ($n=16$) sakrifiye edilirken, 6 denekten elde edilen örneklerin ($n=12$) biyomekanik değerlendirme için uygun yapı sergilediği gözlemlendi. Biyomekanik değerlendirmenin dışında bırakılan 2 sıçanda ise kemik dokunun çıkarılması esnasında hasarlanma olduğu gözlemlendi.

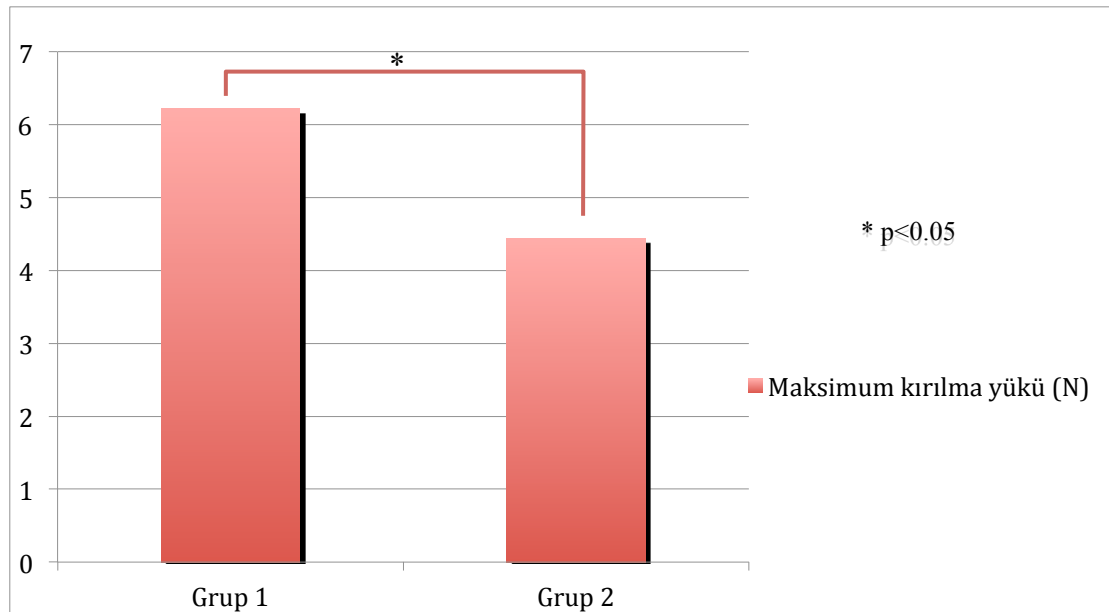
3 nokta eğme testi uygulanan 6 denekten elde edilen örneklerin öncelikle maksimum kırılma yükleri saptanarak, gruplar içerisindeki ortanca değerleri hesaplandı (Tablo 4.7, 4.8). Elde edilen değerlerin istatistiksel analizi aşamasında Wilcoxon testi kullanıldı ve Grup 1 ile 2 arasında maksimum kırılma yükleri açısından anlamlı farklılık ($p<0.05$) bulunduğu saptandı (Şekil 4.5).

Tablo 4.7. Grup 1 ve 2’de yer alan deneklerin maksimum kırılma yük değerleri

	Grup 1 (Newton)	Grup 2 (Newton)
Denek 1	2,13	1,23
Denek 2	7,45	5,52
Denek 3	6,49	3,85
Denek 4	5,47	4,24
Denek 5	7,4	4,89
Denek 6	5,97	4,65

Tablo 4.8. Grup 1 ve 2’de yer alan deneklerin 12. haftanın sonunda maksimum kırılma yük ölçümlerinin ortalama ve minimum, maksimum değerleri

Grup		12. hafta (N)
1	Ortanca	6,23
	Maks-Min	2,13-7,45
2	Ortanca	4,445
	Maks-Min	1,23-5,52



Şekil 4.5. Grup 1 ve 2’de yer alan deneklerin maksimum kırılma yük verilerinin istatistiksel grafiği

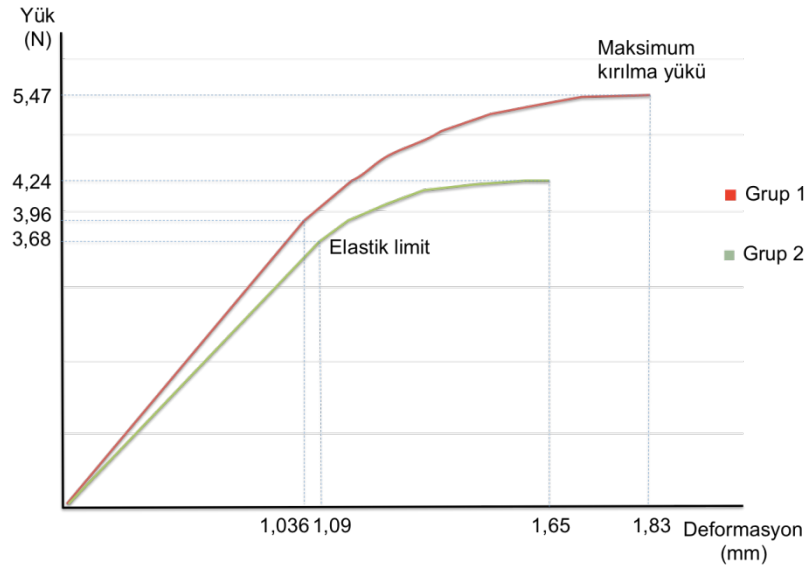
3 nokta eğme testi sonucu elde edilen yük–deformasyon eğrisindeki elastik bölgenin eğimi (tanjantı) hesaplanarak kemik katılık modülü sonuçlarına ulaşıldı (Tablo 4.9, Şekil 4.6). Gruplar içerisindeki katılık modülü sonuçlarının ortanca değerleri saptanarak Wilcoxon testi yardımıyla istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı ve gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadığı ($p>0.05$) gözlemlendi (Tablo 4.10).

Tablo 4.9. Grup 1 ve 2’de yer alan deneklerin katılık modülü değerleri

	Grup 1 (N/mm)	Grup 2 (N/mm)
Denek 1	2,97	2,72
Denek 2	4,07	3,84
Denek 3	3,32	3,01
Denek 4	3,82	3,37
Denek 5	3,74	3,74
Denek 6	3,43	3,77

Tablo 4.10. Grup 1 ve 2’de yer alan deneklerin 12. haftanın sonunda katılık modülü verilerinin ortanca ve minimum, maksimum değerleri

Grup		12. hafta (N/mm)
1	Ortanca	3,58
	Maks-Min	4,07-2,97
2	Ortanca	3,55
	Maks-Min	3,84-2,72



Şekil 4.6. 12 haftada sakrifiye edilen bir deneğin biyomekanik test sonuçlarının yük–deformasyon eğrisinde görünümü. (N: Newton)

4.4. Histolojik Değerlendirme

4.4.1. Birinci Hafta

1. haftada H&E boyalı örneklerin incelemesinde kemik greftleri üzerinde vaskülaritenin yoğun şekilde olduğu, greft alanına komşu bölgelerde ise granülasyon dokusu ile uyumlu yoğun fibroblast aktivitesinin bulunduğu gözlemlendi. Grup 1 deneklerde vaskülaritenin grefte yapışma gösteren komşu yumuşak dokuda da belirgin biçimde artmış olduğu izlendi.

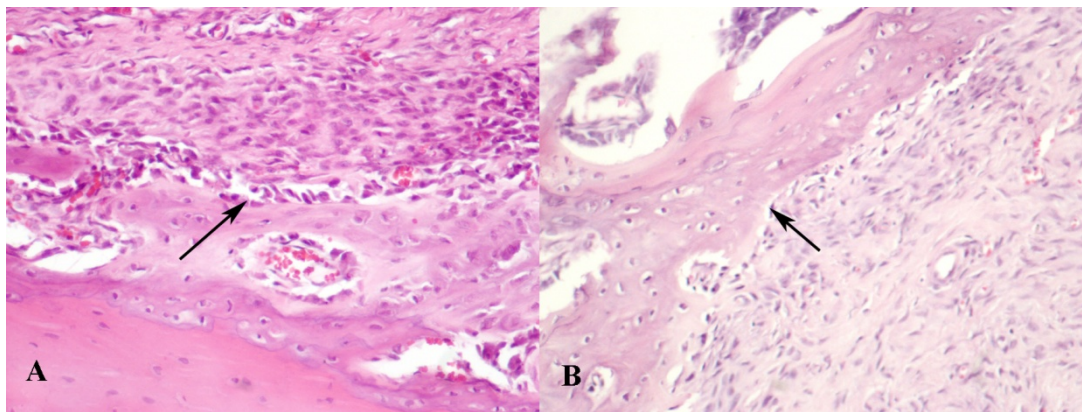
Grup 1 ve 3'ten elde edilen örneklerin incelemesinde, kontrol gruplarına kıyasla artmış osteoblastik hücre sayısı ve vaskülarite odakları gözlemlenirken, osteoklast miktarında belirgin farklılık değerlendirilmedi (Tablo 4.11, 4.12) (Resim 4.9, 4.10). Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde ise çalışma ve kontrol grupları arasında gerek osteoblast sayısı gerekse vaskülarite miktarı açısından anlamlı farklılık ($p<0.05$) bulunduğu saptandı (Tablo 4.13, Şekil 4.7).

Tablo 4.11. 1. haftada Grup 1 ve Grup 2 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler

	Osteoblast sayısı		Osteoklast sayısı		Vaskülarite miktarı	
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2
Denek 1	53	43	5	8	23	17
Denek 2	58	38	7	6	25	14
Denek 3	45	41	6	5	23	18
Denek 4	60	47	8	5	27	19

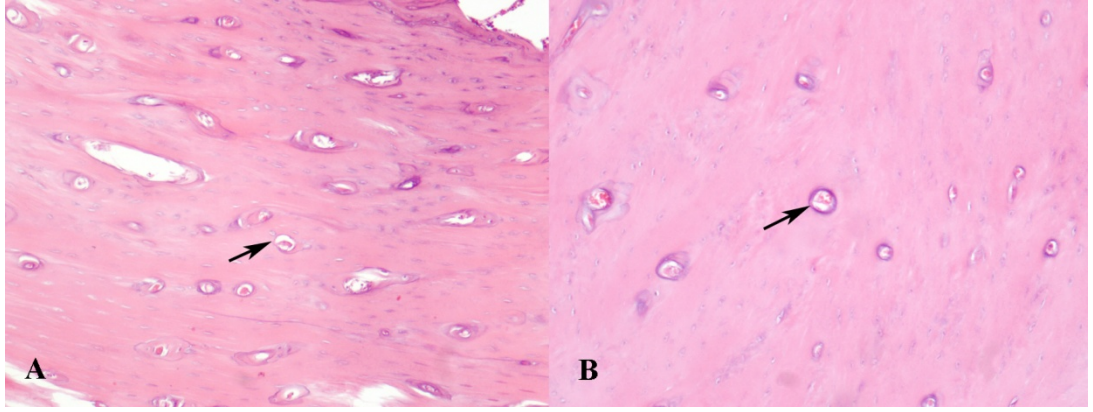
Tablo 4.12. 1. haftada Grup 3 ve Grup 4 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler

	Osteoblast sayısı		Osteoklast sayısı		Vaskülarite miktarı	
	Grup 3	Grup 4	Grup 3	Grup 4	Grup 3	Grup 4
Denek 5	24	20	2	2	13	10
Denek 6	25	17	3	6	16	11
Denek 7	29	23	5	5	19	9
Denek 8	20	15	8	7	18	13



Resim 4.9. 1. haftada Grup 1 ve 2 deneklerin histolojik incelemesinde osteoblast yoğunluğunun değerlendirilmesi

A) Grup 1 deneklerde artmış osteoblast yoğunluğu (siyah ok) saptandı. **B)** Grup 2 deneklerde ise Grup 1 deneklere kıyasla osteoblast artışının daha az olduğu izlendi.

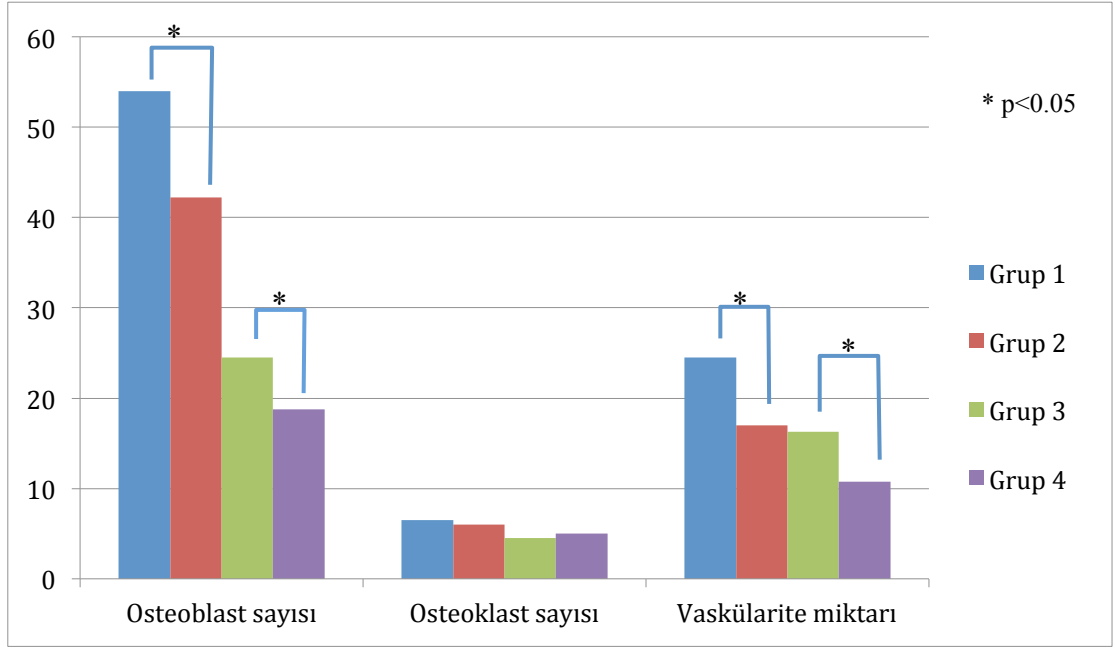


Resim 4.10. 1. haftada Grup 1 ve 2 deneklerin histolojik incelemesinde vaskülarite miktarının değerlendirilmesi

A) Grup 1 deneklerde artmış vaskülarite (siyah ok) izlenirken B) Grup 2 deneklerde vaskülarite artışının Grup 1 deneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüklük gösterdiği saptandı.

Tablo 4.13. 1. haftada deneklerden elde edilen örneklerin ortalama ve standart sapma değerleri

Grup		Osteoblast	Osteoklast	Vaskülarite
1	Ortalama	54	6,5	24,5
	St. sapma	6,68331	1,29099	1,91485
2	Ortalama	42,25	6	17
	St. sapma	3,77492	1,41421	2,16025
3	Ortalama	24,5	4,5	16,25
	St. sapma	4,5	2,64575	2,5
4	Ortalama	18,75	5	10,75
	St. sapma	3,5	2,16025	1,70783



Şekil 4.7. 1. haftada elde edilen örneklerin istatistiksel değerlendirilmesi

Osteoblast sayıları ile vaskülerite miktarları açısından çalışma ve kontrol grupları arasında istatistiksel farklılık ($p < 0.05$, Eşleştirilmiş T testi) saptanırken, osteoklastik aktivite arasında farklılık gözlenmedi.

4.4.2. Altıncı Hafta

6. haftada elde edilen örneklerin incelemesinde 1. haftaya benzer şekilde Grup 1 ve 3 deneklerde vaskülerite ve osteoblastik aktivitenin kontrol gruplarına kıyasla fazla olduğu gözlemlenirken (Tablo 4.14, 4.15, Resim 4.11), verilerin istatistiksel incelemesinde anlamlı farklılığının ($p < 0.05$) devam ettiği saptandı (Tablo 4.16, Şekil 4.8). 6. hafta ile 1 haftanın karşılaştırmasında ise osteoblast miktarı ve vaskülerite yoğunluğuna açısından anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$).

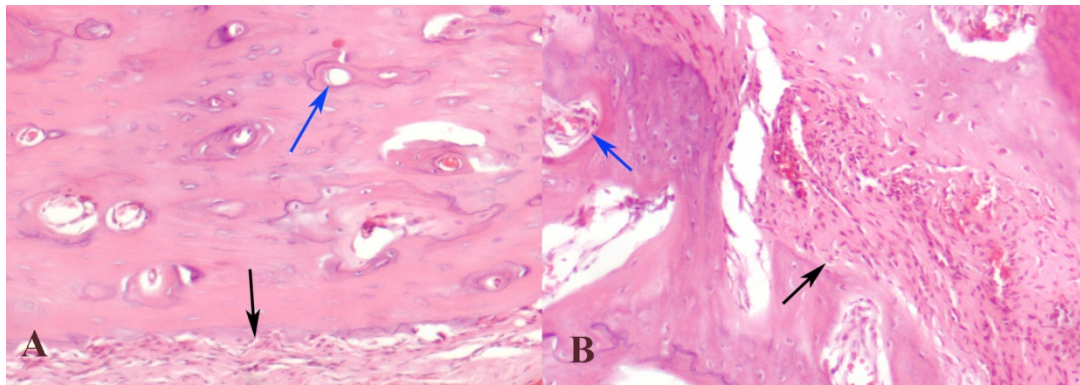
Osteoblast ve vasküleriteden farklı olarak bu dönemdeki osteoklast sayısında 1. haftaya kıyasla rakamsal azalma izlendi ve bu azalmanın istatistiksel olarak Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 deneklerde anlamlılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptandı (Şekil 4.9).

Tablo 4.14. 6. haftada Grup 1 ve Grup 2 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler

	Osteoblast sayısı		Osteoklast sayısı		Vaskülarite miktarı	
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2
Denek 9	57	43	3	2	21	15
Denek 10	53	44	2	3	24	17
Denek 11	59	49	4	1	24	19
Denek 12	49	41	3	5	28	18

Tablo 4.15. 6. haftada Grup 3 ve Grup 4 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler

	Osteoblast sayısı		Osteoklast sayısı		Vaskülarite miktarı	
	Grup 3	Grup 4	Grup 3	Grup 4	Grup 3	Grup 4
Denek 13	21	18	2	2	15	12
Denek 14	20	21	1	2	17	11
Denek 15	24	19	4	1	12	10
Denek 16	17	16	1	2	11	10

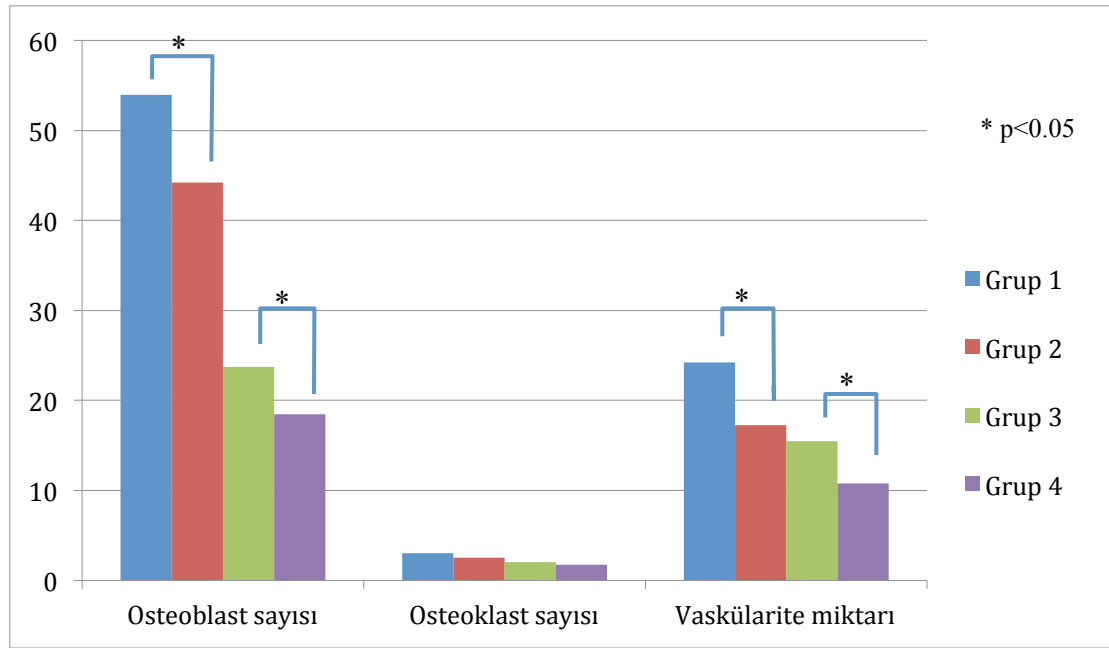


Resim 4.11. Grup 1 ve 2 deneklerden elde edilen örneklerin 6. haftadaki histolojik değerlendirmesi

A) Grup 1 deneklerde artmış vaskülaritenin (mavi ok) ve osteoblastik yoğunluğun (siyah ok) devam ettiği gözlemlendi. **B)** Bu dönemde Grup 2 deneklerde osteoblast sayısı (siyah ok) ile vaskülarite miktarının (mavi ok) Grup 1 deneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.05$, Eşleştirilmiş T testi) az olduğu saptandı.

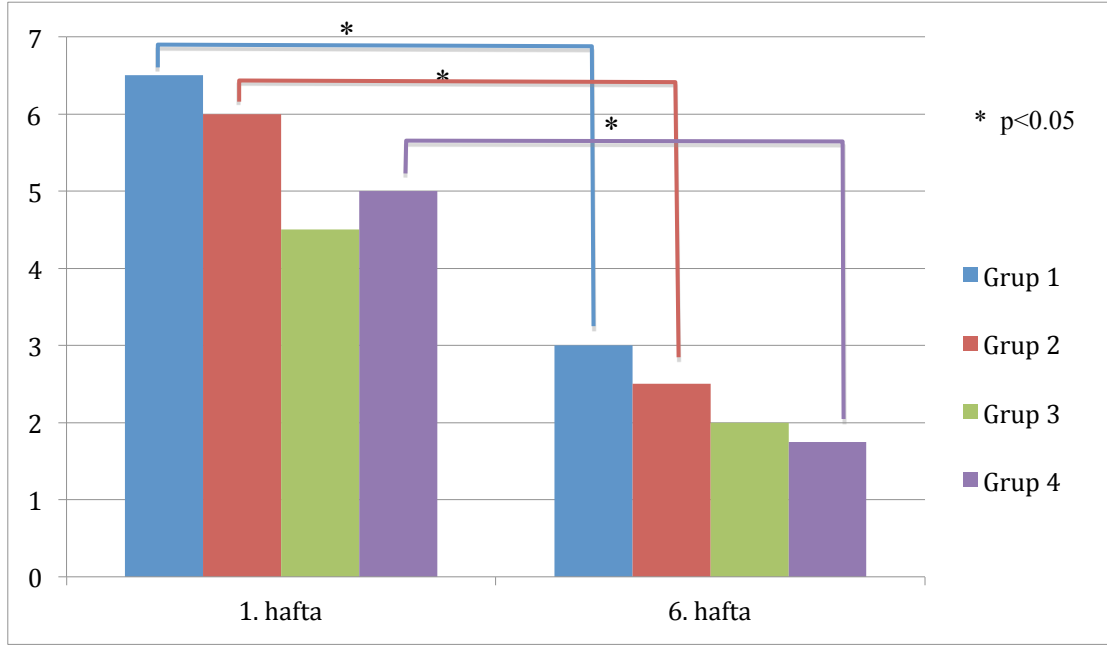
Tablo 4.16. 6. haftada deneklerden elde edilen örneklerin ortalama ve standart sapma değerleri

Grup		Osteoblast	Osteoklast	Vaskülarite
1	Ortalama	54	3	24,25
	St. sapma	3,82971	0,8165	2,87228
2	Ortalama	44,25	2,5	17,25
	St. sapma	3,40343	1,29099	1,70783
3	Ortalama	23,75	2	15,5
	St. sapma	4,11299	1,41421	2,64575
4	Ortalama	18,5	1,75	10,75
	St. sapma	2,08167	0,5	0,95743



Şekil 4.8. 6. haftada elde edilen örneklerin istatistiksel incelemesi

Osteoblast sayıları ile vaskülarite miktarları açısından çalışma ve kontrol grupları arasında istatistiksel farklılığın ($p < 0.05$, Eşleştirilmiş T testi) devam ettiği izlendi.



Şekil 4.9. 1. ve 6. haftalardaki osteoklastik aktivite farkı

Grup 1, 2 ve 4'te istatistiksel olarak anlamlı düşüklük ($p<0.05$, Eşleştirilmiş T testi) izlenirken, Grup 3'te rakamsal düşüklük bulunmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı farklılık değerlendirilmedi.

4.4.3. Onikinci Hafta

12. haftada çalışma ve kontrol grupları arasında osteoblast miktarı ve vaskülarite yoğunluğu açısından rakamsal farkın devam ettiği (Tablo 4.17, 4.18) ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlılık ($p<0.05$) gösterdiği değerlendirildi (Tablo 4.19, Şekil 4.10, Resim 4.12).

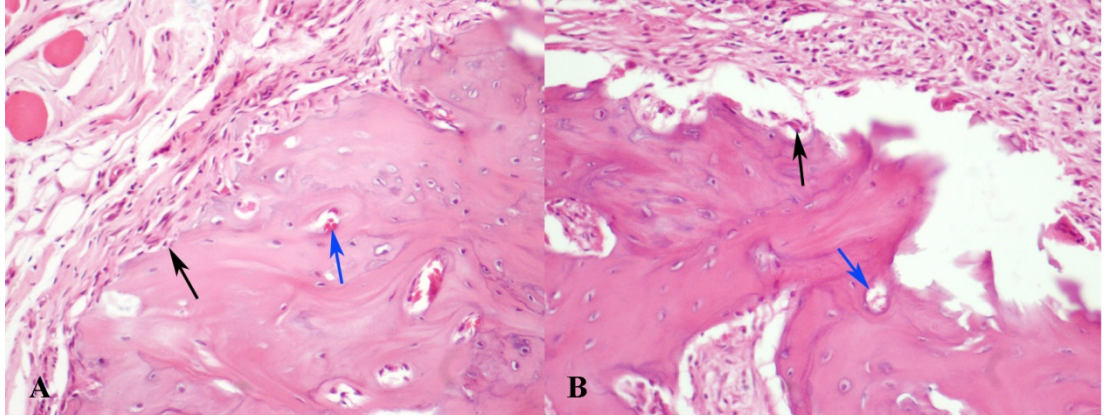
Elde edilen verilerin 6. haftayla karşılaştırmasında ise; 12. haftadaki osteoblast sayısının 6. haftaya kıyasla belirgin bir düşüş gösterdiği izlenirken, istatistiksel değerlendirmede de 6. haftaya kıyasla anlamlı farklılık ($p<0.05$) bulunduğu saptandı (Şekil 4.11). Osteoklastik aktivite ve vaskülarite açısından ise 6. haftaya oranla istatistiksel farklılık gözlenmedi.

Tablo 4.17. 12. haftada Grup 1 ve Grup 2 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler

	Osteoblast sayısı		Osteoklast sayısı		Vaskülarite miktarı	
	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2	Grup 1	Grup 2
Denek 17	8	7	2	1	20	16
Denek 18	12	9	3	4	22	18
Denek 19	15	10	1	2	19	19
Denek 20	9	7	1	1	23	20
Denek 21	12	9	2	2	25	17
Denek 22	10	10	1	2	24	15
Denek 23	14	6	3	1	22	17
Denek 24	7	5	1	3	26	16

Tablo 4.18. 12. haftada Grup 3 ve Grup 4 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi sonucunda elde edilen değerler

	Osteoblast sayısı		Osteoklast sayısı		Vaskülarite miktarı	
	Grup 3	Grup 4	Grup 3	Grup 4	Grup 3	Grup 4
Denek 25	5	3	1	1	16	13
Denek 26	4	5	2	4	18	11
Denek 27	7	4	3	3	15	15
Denek 28	4	4	2	2	14	10
Denek 29	9	6	1	2	19	12
Denek 30	4	3	2	1	15	14
Denek 31	9	8	3	3	18	17
Denek 32	5	4	3	1	16	10

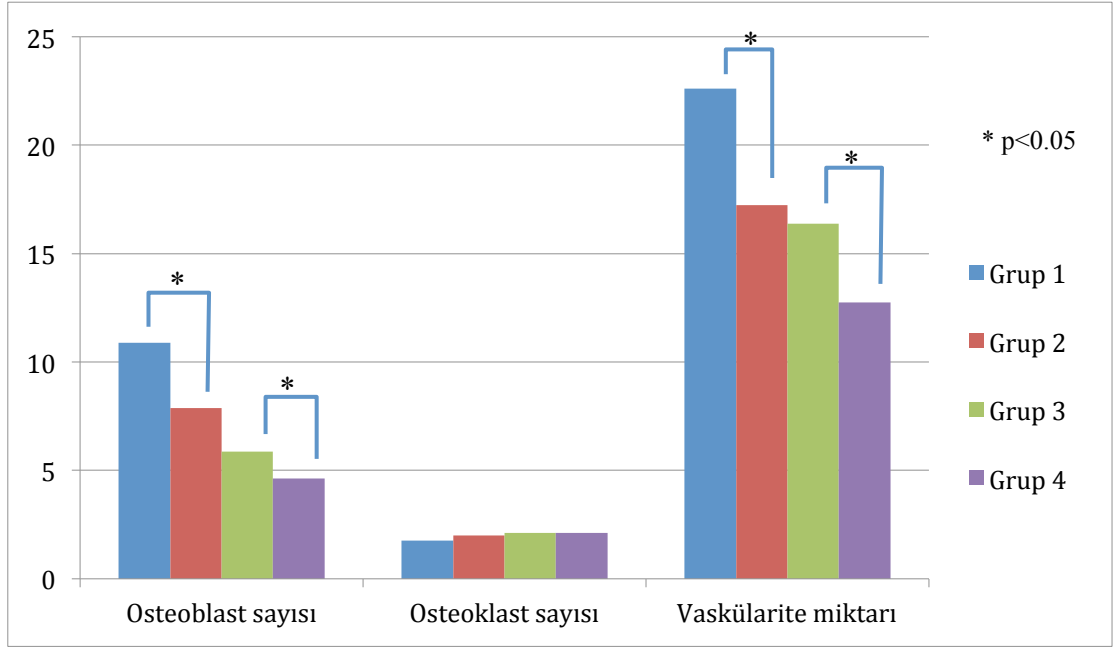


Resim 4.12. 12. haftada Grup 1 ve 2 deneklerden elde edilen örneklerin histolojik incelemesi

A) Grup 1 deneklerde osteoblast (siyah ok) ve vasküler oluşumların (mavi ok) görünümü. **B)** Grup 2 deneklerde Grup 1 deneklere kıyasla osteoblast sayısının ve vaskülaritenin istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.05$, Eşleştirilmiş T testi) düşük olduğu izlendi

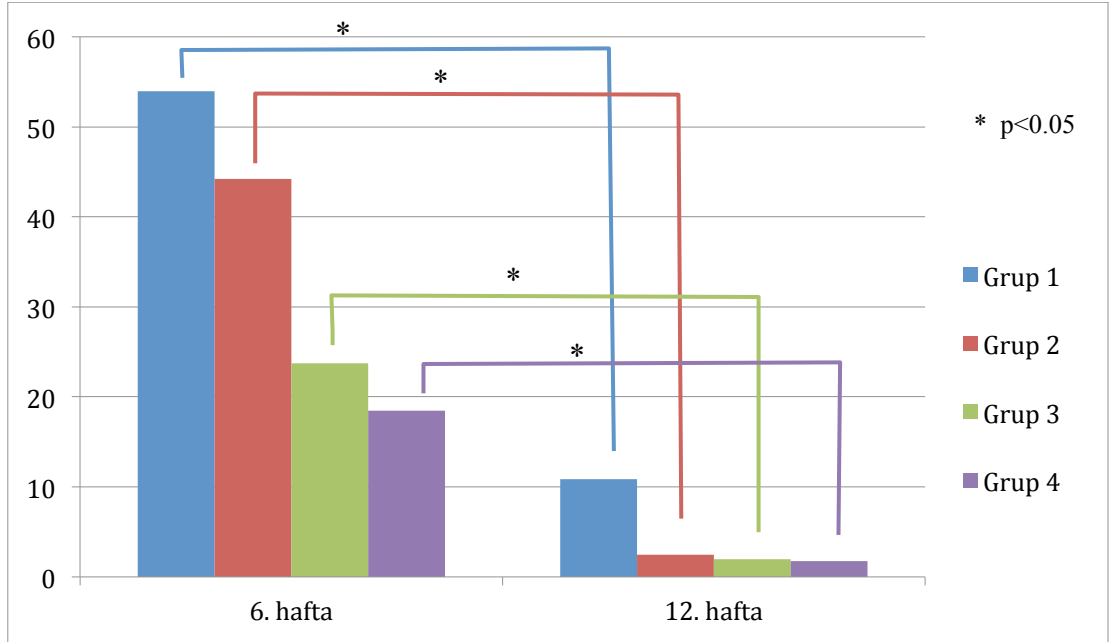
Tablo 4.19. 12. haftada deneklerden elde edilen örneklerin ortalama ve standart sapma değerleri

Grup		Osteoblast	Osteoklast	Vaskülarite
1	Ortalama	10,875	1,75	22,625
	St. sapma	2,85044	0,88641	2,38672
2	Ortalama	7,875	2	17,25
	St. sapma	1,88509	1,06904	1,66905
3	Ortalama	5,875	2,125	16,375
	St. sapma	2,16712	0,83452	1,76777
4	Ortalama	4,625	2,125	12,75
	St. sapma	1,68502	1,12599	2,49285



Şekil 4.10. 12. haftada elde edilen örneklerin istatistiksel değerlendirilmesi

Osteoblast sayıları ile vaskülerite miktarları açısından çalışma ve kontrol grupları arasında istatistiksel farklılığın ($p < 0.05$, Eşleştirilmiş T testi) devam ettiği izlenmekte.



Şekil 4.11. 6 ve 12. haftalar arasında osteoblast sayılarının karşılaştırılması

Tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.05$, Eşleştirilmiş T testi) azalma tespit edildi.

5. TARTIŞMA

Otojen kemik greftleri, kemik defektlerinin onarımında uzun süredir kullanılmakla beraber, radyoterapi almış bölgeler gibi yeterli vaskülarize olmayan alanların onarımında tercih edilmemekte ve tedavide vaskülarize kemik greftlerinin kullanımı ön plana çıkmaktadır (6). Vaskülarize kemik greft uygulamaları her ne kadar dolaşımın yetersiz olduğu defektlerin onarımı aşamasında uygun bir tedavi seçeneği oluştursa da, yöntemin zorluğu, oluşabilecek komplikasyonlar, uzamış hasta yatış süreleri ve artmış tedavi masrafları gibi bazı dezavantajlara sahiptirler. Bu noktalar göz önüne alındığında vaskülarize olmayan otojen kemik greftlerinin iyileşmesi süreci üzerine olumlu etkiler oluşturacak uygulamaların tedavideki önemi artmaktadır.

Anjiyogenez, mevcut vasküler yapılardan yeni vasküler oluşumların gelişmesi olarak tanımlanırken, kemik gelişimi ve kemik iyileşmesi sırasında oldukça önem taşır (208). Kemik iyileşmesi dışında kemik greftlerinin iyileşmesi esnasında da hızlı ve yoğun revaskülarizasyonun önemli bir basamak olduğu düşünülmekte ve greft iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır (209, 210). Anjiyogenez kemik iyileşmesi esnasında mezenkimal kök hücrelerin osteoblast yönünde farklılaşması, primer kallusun sekonder forma dönüşümü ve metabolik yükün uzaklaştırılması gibi farklı basamaklarda aktif rol oynamaktadır. Anjiyogenezin inhibe edildiği deneysel modellerde kırık iyileşmesinde duraklamanın ortaya çıktığı izlenirken, stimüle edildiği durumlarda ise iyileşmenin hızlandığı gösterilmiştir (211-214). Benzer şekilde anjiyogenezin kemik greft iyileşmesi aşamasında da etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (210). Radyoterapi almış zeminlere yerleştirilen greftlerin inkorporasyonunda azalmaya karşı doku genişletici uygulanan bölgelere yerleştirilen kemik greftleri ve FGF ile stimüle edilmiş kemik greftlerinde saptanan inkorporasyon artışı, anjiyogenezle kemik greft iyileşmesi arasındaki yakın ilişkiyi gösteren başlıca çalışmalardır (6-9, 196). Anjiyogenezin greft inkorporasyonu üzerinde oluşturduğu bu olumlu etkilerinden yola çıkarak kemik greft uygulamalarında vasküler loop oluşturma, flep ile kombine etme, anjiyogenezi

stimüle edici ajanlar kullanma gibi birçok farklı teknikte tanımlanmıştır (196, 215). Bizim çalışmamızda da kemik grefti iyileşmesinin hızlandırılması için anjiyogenez artışına yol açtığı iyi bilinen DFO kullanılmıştır.

Hipoksi anjiyogenezin en potent stimülatörü olup VEGF salınımında artışa yol açar ve bu süreçte HIF-1 α seviyelerinin stimülasyonu önemli bir yer tutmaktadır (92-94). Doku oksijen düzeyinin %5'in altına düştüğünde ortaya çıkan HIF-1 α ; nükleus düzeyinde HIF-1 β ile birleşerek VEGF ekspresyonunu arttırmakta ve bu sayede anjiyogenezi stimüle etmektedir (95). Doku oksijen miktarının %5'in üzerine çıktığı durumlarda ise ortamda bulunan prolil hidroksilazlar HIF-1 α 'yı parçalayarak anjiyogenezin stimülasyonu yönündeki etkinin ortadan kalkmasına yol açmaktadırlar (216). Bir demir şelatörü olan DFO dokularda bulunan ferritin ve hemosiderin yapısındaki demire bağlanarak prolil hidroksilazın demiri kofaktör olarak kullanmasının önüne geçmektedir. Bu yolla prolil hidroksilazın inhibisyonu gerçekleşirken ortamda HIF-1 α birikimine yol açarak VEGF ekspresyonunu arttırmaktadır (10). DFO, HIF-1 α artışı dışında serbest hidroksil radikallerinin birikimini azaltarak ve β -katenin seviyelerinde yükselme sağlayarak kemik iyileşme sürecine bir başka yönden olumlu etki göstermektedir (206).

Kemik iyileşmesi esnasında anjiyogenezin incelemesine yönelik çalışmalarda sıklıkla VEGF ve FGF kullanılmıştır. Bu büyüme faktörleri başta endotelial hücre grupları üzerinden anjiyogenezi stimüle ederken, direkt olarak osteblastik ve osteoklastik hücre grupları üzerine de etki göstermektedir (11, 12, 91). Emad ve arkadaşlarının tavşanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada demineralize kemik matriksinin VEGF ile kombine edildiği durumlarda yüksek anjiyogenez saptamışlardır (217). Aynı çalışmalarında kemik dokunun kalitatif ve kantitatif olarak daha iyi iyileştiği sonucuna ulaşmışlardır. Benzer şekilde Street ve arkadaşlarının insan osteoblast kültürü üzerinde yapmış olduğu bir başka çalışmada, ekzojen VEGF uygulamasının kemik dokuda nodül oluşumuna yol açtığı ve VEGF'ün bloklandığı durumlarda nodül formasyonunun kaybolduğu gözlemlenmiştir (218). Street, ortaya çıkan bu etkiyi anjiyogeneze ek olarak VEGF'ün osteoblastlar üzerine oluşturduğu stimülasyon ile ilişkilendirmiştir. Chow ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise VEGF ekspresyonu ile

kemik greftlerinin iyileşmesi arasında yakın ilişki bulunmuş ve bu etki artmış vaskülarizasyona bağlı osteogenezin artışı şeklinde yorumlanmıştır (219).

Kemik greftlerinin inkorporasyonu aşamasında osteoblastik aktivasyonun artırılması başlıca hedefi oluştursa da kortikal kemik greftlerinin iyileşmesinin birinci basamağında osteoklast aktivasyonu da yer almaktadır (6). Bu sebeple kortikal kemik grefti uygulanması sonrasında ortaya çıkacak hacimsel azalma beklenen bir sonuç iken, optimal düzeyde osteoklast aktivasyonu anjiyogenezin kemik doku içerisine ilerlemesi için gerekli olup greft iyileşmesinde önemli bir role sahiptir.

VEGF'ün anjiyogenezi artırarak osteoblast farklılaşmasını arttırıcı ve direk osteoblastik aktivasyona yol açarak osteogenezi tetikleyici etkilerinin yanında bir diğer etkisi ise osteoklast üzerinden olmaktadır. Helmrach ve arkadaşları VEGF'ün bu etkilerini araştırmak amacıyla sıçan VEGF ekspresyonu sağlayan, genetik olarak modifiye edilmiş insan kemik iliği kökenli kök hücrelerini osteokondüktif bir taşıyıcıyla kombine etmiş ve in-vivo sıçan modelinde incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda oluşan kemik dokusunda anjiyogenezin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu gözlemlenirken, kemik hacminde ise tam tersi şekilde azalma olduğu saptanmıştır. Yapılan histolojik değerlendirmede ise osteoklastların ortamda yoğun olarak bulunduğu fark edilmiş ve VEGF'ün öncelikle osteoklastları stimüle ederek kemik greft hacminde azalma yaratabileceği sonucu çıkarılmıştır (197).

Her ne kadar Helmrach ve arkadaşları greft iyileşmesi sürecinde VEGF'ün osteoklastik aktivasyonu daha ön plana çıkarabileceğini savunsa da yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz radyolojik sonuçlar tam tersi bulgular göstermekte idi. Bu dönemdeki görüntülerde kemik greft hacminde daha az kayıp izlenmesi başta daha az osteoklastik aktivasyon oluştuğunu düşündürmektedir. Osteoklast aktivasyonundaki bu azalmanın ise beraberinde vaskülaritede azalma yaratması olası bir negatif etki olarak öngörülürken, histolojik kesitlerde beklenenin aksine gruplar arasında osteoklast miktarı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu nedenle Grup 1 deneklerde erken dönemdeki kemik greft hacim azalmasının kontrol grubuna oranla az olması, osteoklastlardan bağımsız olarak histolojik kesitlerde de artmış olarak izlenen osteoblastik aktivite artışı (VEGF'ün doğrudan etkisiyle gerçekleşen)

ile anjiyogenezin osteoblastik farklılaşma ve hücre nekrozunda azalmaya yol açmasıyla ilişkilendirilebilir.

Otojen kemik greftlerinin aktarımı sonrasında greft içerisinde yer alan hücrelerin sağ kalımına yönelik farklı görüşler bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda bu hücrelerin hızlı bir seyirle tamamen ölüp “creeping substitution” ile ortadan kaldırıldığı savunulurken, bazı çalışmalarda ise kortikal kemik yüzeyinden 300 mikrometre derinliğe kadar hücrelerin canlılığını sürdürdüğü savunulmaktadır (161, 220, 221). Yamaguchi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada greft transplantasyonu sonrasında hücrelerin 60. günde dahi canlılığını sürdürebildiği ortaya koyulmuştur (222). Bu sebeple greftlerin hızlı revaskülarizasyonu hücre gruplarının yaşayabilirliği için önemli bir basamak olarak karşımıza çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda da Grup 1 deneklerde erken dönemde ortaya çıkan daha az hacimsel kaybın artmış osteoblastik aktivite dışında azalmış hücre nekrozuna bağlı olabileceği düşünülebilir. Bu etkinin daha doğru değerlendirilebilmesi için ilk 1 hafta içerisinde yapılacak ek histolojik incelemelere ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Virolainen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada farklı tiplerdeki kemik greftlerinin iyileşmesini incelemiş ve değerlendirmelerini radyolojik olarak 4. ve 8. haftalarda yapmışlardır (223). Bizde çalışmamızda literatüre paralel olarak radyolojik değerlendirme için 4 ve 8. haftalar ile erken dönemdeki rezorbsiyonu ve geç dönemdeki farklılıkları değerlendirme amacıyla da 2 ve 12. haftaları seçtik. Elde edilen sonuçlar literatüre benzerlik gösterirken, Yamaguchi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde erken dönemde artmış rezorbsiyon, 4. haftadan itibaren Virolainen’in çalışmasına benzer şekilde kemik oluşumunda artış gözlemlendi. Graft dokusunda 4. haftadan sonra ortaya çıkan bu artışın değerlendirilmesi amacıyla 6. haftada deneklerden alınan örneklerin histolojik incelemesinde, 1. haftaya kıyasla osteoblastik ve vasküler yoğunluk arasında istatistiksel farklılık izlenmedi ancak osteoklast miktarında düşüş gözlemlendi. Elde edilen veriler doğrultusunda bu dönemde ortaya çıkan hacimsel artışın osteoblastik aktivite ve anjiyogenezin yoğunluğunun devam etmesi yanında osteoklast miktarında azalmayla ilişkili olduğu düşünüldü.

12. haftadaki örnekler incelendiğinde hacimsel artış, vaskülarite ve osteoblast sayıları arasında anlamlı farklılık devam etse de, osteoblast sayılarının 6 haftaya

kıyasla istatistiksel olarak anlamlı boyutta azaldığı gözlemlendi. Osteoblast sayılarındaki bu düşüklük greft matürasyonunun büyük oranda tamamlanmasıyla ilişkilendirilirken, 1 ve 2. Gruplar arasında sayısal yaklaşmanın nedenlerinden birisinin de 45. günde DFO enjeksiyonunun kesilmesi ve buna bağlı doğrudan osteoblastik aktivite uyarımının sonlanması olabileceği düşünüldü.

DFO yardımıyla VEGF stimülasyonunun greft hacminde oluşturduğu artış ile kemik dokuda oluşturabileceği yapısal değişimin değerlendirmesinde düzenli aralıklarla yapılan radyolojik ve histolojik incelemelerin yanında biyomekanik testler de kullanıldı. Kemik dokusunun biyomekanik değerlendirmesinde başlıca 2 farklı parametre bulunmakta olup, bunlardan birisi kemiğin yapısal mekanik davranışı diğeri ise materyal mekanik davranışdır (224). Yapısal mekanik davranış, kemiğin intrinsik özellikleri dışında boyut gibi ekstrinsik özellikleriyle de yakın ilişkiliyken, materyal mekanik davranış ekstrinsik nedenlerden bağımsızdır (225). Bu parametrelerin değerlendirmesinde yük-deformasyon eğrileri yapısal mekanik davranış hakkında bilgi edinilmesine imkân tanırken, stres-birim şekil değiştirme eğrileri ise dokuya yönelik özelliklerin tanımlanmasında kullanılır. Kortikal kemik greftlerinde biyomekanik değişimler doku düzeyinde mineralizasyonla yakın ilişkili olup, mineralizasyon artışı kemiğin katılık oranında artışa yol açmaktadır (224, 226). Kemiğin katılık oranı ise yük-deformasyon eğrisinin elastik evredeki eğim değerleri veya stres-birim şekil değiştirme eğrisindeki elastik modül değerlerinin hesaplanması yoluyla saptanabilir.

12. haftanın sonunda Grup 1 deneklerden elde edilen örneklerin incelemesinde artmış maksimum kırılma yükü, yani artmış kemik gücü değerleri saptanırken, kemik katılık modülüsleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi. Grup 1 ve 2 arasında katılık modülüsleri arasında fark izlenmemesi, Grup 1 deneklerde artmış olan maksimum kırılma yük değerlerinin kemiğin intrinsik değişiminden ziyade kalınlık artışına bağlıdır. Bu yönüyle DFO uygulamasının kortikal kemik greftlerinde rezorbsiyona bağlı erken dönemde başlayıp devam eden mekanik destek azalmasının kısmende olsa önüne geçebileceğini göstermektedir.

DFO'nin kemik iyileşmesi sürecindeki etkilerine yönelik yapılan farklı çalışmalarda, distraksiyon osteogenezde kallus yapısı içerisine düzenli enjeksiyon yapılarak ve uzun kemiklerde kemik defekt iyileşmesinin incelenmesi amacıyla

seramik skafold ile kombine edilerek kullanılmıştır (13, 14). Yapılan bu çalışmalarda vaskülarite artışının yanı sıra kemik hacminde de anlamlı derecede artış elde edilmiştir. Yine Alexis ve arkadaşlarının radyoterapi almış kemik doku üzerine yapmış olduğu bir başka çalışmada DFO uygulamasının kemik iyileşmesi sürecinde kallus hacminde, kemik hacminde, biyomekanik özelliklerde ve “union” oranlarında artışa yol açtığı gösterilmiştir (227). Aaron ve arkadaşları ise radyoterapi almış mandibula üzerinde distraksiyon osteogenez modelinde DFO uygulamasının, radyoterapiye bağlı anti-anjiyojenik etkilerin ortadan kalkmasına yol açtığı sonucuna ulaşırken, Alexis tarafından yapılan bir başka çalışmada DFO’nin distraksiyon osteogenez esnasında konsolidasyon periyodunda kısımla sağladığı saptanmıştır (228, 229).

Distraksiyon osteogenez sürecinin aktif bir karakter sergilemesi ve kallus yapısının konsolidasyonu için yoğun anjiyogenez stimülasyonu ihtiyacı bulunması bu çalışmaların çoğunun temelinde yatan başlıca düşüncüyü oluşturmaktadır. Özellikle kallus oluşumu ile karakterize sekonder tipte kemik iyileşmesinde kallusun revaskülarizasyonu ve osteojenik farklılaşımı önemli bir basmağı oluşturmaktadır. Üçüncü ve 4. Grup deneklerdeki araştırmanın amacı da bu çalışmalara paralel olarak daha çok sekonder tipte iyileşme eğiliminde olan segmenter kemik defeklerinde DFO uygulamasının ne yönde etki oluşturacağının incelenmesi idi. Elde ettiğimiz radyolojik verilerin istatistiksel analizlerinde DFO uygulamasının kemik defekt hacminde oluşturduğu anlamlı düşüş ve histolojik olarak artmış osteoblastik aktivite ile anjiyogenez DFO uygulamasının sekonder tipte kemik iyileşme sürecinde de etkin bir role sahip olduğunun göstergesi olarak kabul edildi. Bizim çalışmamızda kemik defektlerinde kullanılan DFO, daha ileride planlanacak distraksiyon osteogenezin konsolidasyon aşamasının kısaltılması, “non-union” olgularında kallusun osteojenik yönde stimülasyonu ve vaskülarize kemik grefti onarımı planlanan hastalarda defekt alanının prefabrikasyonu gibi alanlarda kullanılabilir.

Kemik iyileşmesi esnasında revaskülarizasyonun başta çevrede yumuşak dokulardan kaynaklı olması sebebiyle bu bölgelerin vaskülarite yoğunluğu da önem taşır. Örnek toplama esnasında tüm sıçanlarda DFO uygulanan tarafta yumuşak dokuda ve greftleri çevreleyen kısımlarda anjiyogenezi düşündürecek yaygın kanama odaklarının izlenmesine karşı kontrol gruplarında bu bulgunun izlenmemesi DFO’nin

anjyogenezi tetiklediğini düşündüren en önemli klinik bulgumuz olmuştur. Bunun yanında histolojik değerlendirme aşamasında kemik dokuya yapışıklık gösteren yumuşak dokuda artmış olan vaskülarite klinik gözlemlerimizin objektif göstergesini oluşturdu. Buradan yola çıkarak özellikle radyoterapi almış zeminler, vasküler yetmezlikler veya diyabetik hastalar gibi yoğun vaskülopatinin eşlik ettiği klinik tablolarda kemik greft uygulaması öncesinde prefabrikasyon amacıyla uygulanacak DFO tedavisinin greft inkorporasyonunu arttırabileceğini düşünmekteyiz. Yine bu hasta grubunda deri grefti benzeri uygulamalar öncesinde de DFO tedavisinin veya DFO'li pansuman malzemelerinin kullanımı, onarım için uygun bir zemin hazırlanması amacıyla tedavide yardımcı bir yöntem olarak kullanılabilir.

Çalışmanın deney modeli seçimi sırasında literatürde sıçanlara ait farklı boyutlarda zigomatik ark kritik boyutlu kemik defekt modellerinin tanımlandığı tespit edildi. Bu tanımlamalardan bazılarında defekt boyutu 3 mm. olarak verilirken Kim ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya paralel olarak defekt modeli 5 mm. olarak planlandı (4, 230). Bunun dışında her iki zigoma arasında mümkün olduğunca simetrik bir planlama yapılabilmesi için her sıçanda zigomatikotemporal sutura orta nokta kabul edildi ve greftler bu noktaya göre planlandı.

Greft iyileşmesinde greftin sabitlenmesi ve mekanik strese maruz kalması önem arz etmektedir. Özellikle yük taşıyan bölgelerde bir miktar yükün kemiğe aktarılması istenmektedir (6). Yük taşımayan hareketsiz bölgelerde ise rijit fiksasyon uygulanmasının kemik greft inkorporasyonu açısından farklılığı gösterilememiştir (190). Bunun dışında kritik boyutlu zigomatik ark kemik defekti modelinin kemik greftleri ile onarımı aşamasında yapılan çalışmalarda fiksasyon esnasında muhtemel teknik zorluklar sebebiyle Surgicel (Johnson & Johnson Medical Ltd., Gargrave, North Yorkshire, UK) gibi yardımcı materyallerin kullanımı da bildirilmektedir (4). Çalışma içerisinde bu tipte yardımcı materyallerin DFO ile ne yönde etkileşim gösterebileceğinin bilinmemesi sebebiyle kullanımı tercih edilmemiş ve fiksasyon için 7/0 prolon kullanılmıştır. Histolojik değerlendirme aşamasında; greft çevresinde kartilaj dokusunun izlenmemesi ve radyolojik tetkiklerde kemik temasının devam etmesi sebebiyle bu yöntem ile yeterli fiksasyonun sağlanabildiği gözlemlenmiştir.

Uzun yıllardır β -talasemi major gibi sık transfüzyon uygulanan olgularda kronik demir yüklenmesinin tedavisi için kullanılan DFO'nin oral yolla kullanımında biyo-yararlanımı çok düşük olup sıklıkla intramuskuler veya intravenöz şekilde kullanılmaktadır. Bu uygulamalara yönelik tanımlanan yan etkilerinin başında ise işitme bozuklukları gelmekte iken, bunun dışında görme bozuklukları, ateş, nefes darlığı ve baş dönmesi de olası komplikasyonlardan bazılarıdır. İntravenöz uygulamalarında tanımlanan bu komplikasyonlara karşın DFO'nin lokal uygulamalarına yönelik komplikasyonları bilinmemektedir. DFO'nin anjiyogenezi stimüle etme amaçlı lokal kullanımı şuan için deneysel modellerde sınırlı kalmakta iken, ilerleyen dönemlerde deneysel modeller baz alınarak klinik kullanımda kendisine yer bulması olasıdır. DFO'nin lokal olarak uygulanmasının en önemli dezavantajı ise enjeksiyonların hastalar üzerinde oluşturabileceği travmadır. Bu yönüyle DFO'nin düzenli salınım yapan taşıyıcılarla kombine edilmesi klinik kullanıma daha yatkın bir yöntem olabilecektir.

Kemik greft uygulamasının önemli bir endikasyonu da tümör rezeksiyonu sonrasında oluşan kemik defektleridir. Anjiyogenezi ile kanser arasındaki yakın ilişki göz önüne alındığında, bu olgularda DFO ve buna bağlı VEGF stimülasyonunun ne derece uygun bir yaklaşım olacağı bilinmemektedir. Kanserli hastalar üzerinde yapılan farklı çalışmalarda vasküler yoğunluğun fazla olduğu hasta gruplarında nodal metastazın artışı ve erken relaps oranları ortaya koyulurken, deneysel modellerde anjiyogenezin inhibe edildiği durumlarda tümör progresyonunda azalma gözlemlenmiştir (231-233). Bu ve benzeri çalışmalardan yola çıkarak Anti-VEGF ajanlar tek başına veya kemoterapötiklerle kombine edilerek onkolojik tedavi sürecinde kullanılmaktadırlar.

Onkogenezi açısından bir diğer önemli nokta ise demirin DNA sentezi aşamasında önemli bir kofaktör olması ve neoplastik hücrelerin hızlı proliferasyon için yoğun demir ihtiyacı göstermesidir (234). Her ne kadar bu süreçte DFO'nin demiri bağlayıp antiproliferatif etki gösterebileceği düşünülse de yapılan çalışmalarda bu yönde etkinlik gözlenmemiştir (235, 236). Bu nedenlerle onkolojik cerrahi uygulanan hasta gruplarında kemik defektlerinin prefabrikasyonu amacıyla lokal DFO uygulamasının üzerinde araştırılması gereken bir konu olduğunu ve şayet

nüks riskinde artış oluşturmadiğı saptanırse, klinik kullanıma aktarılabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada DFO uygulamasının kemik greft iyileşmesi üzerine olumlu etkiler sağladığı bulunmuştur. DFO uygulanan kemik greftlerinde kontrol gruplarına kıyasla daha fazla osteoblast yoğunluğu, daha fazla vasküler oluşum, daha fazla hacim kazanımı saptanırken, erken dönemde ise daha az hacimsel kayıp gözlenmiştir. Bu yönüyle DFO uygulamasının kemik greft inkorporasyonunu arttırdığı ve kortikal kemik greftlerinde erken dönemde izlenen mekanik destek gücündeki azalmayı sınırlandırabileceği düşünülmektedir. Klinik kullanım aşamasında ise lokal uygulamaya yönelik komplikasyonların belirlenmesi amacıyla ek çalışmalara ve uygulama tekniği olarak enjeksiyon yerine kontrollü salınım yapan malzemelerle kombinasyonuna ihtiyaç var olduğu öngörülmektedir.

Kritik boyutlu kemik defektlerinde DFO uygulamasının ise her ne kadar kontrol gruplarına kıyasla defekt boyutunda anlamlı derecede azalma yaratsa da tamamen ossifikasyonunu sağlamadığı gözlemlenmiştir. Bu açıdan kritik boyutlu kemik defekti bulunan ve serbest flep ile onarıma uygun olmayan hasta gruplarında lokal DFO uygulaması ile defekt alanının prefabrikasyonunun greftle onarım için uygun bir zemin oluşturabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Skowronski PP., An YH. Bone graft materials in orthopedics. *Musc Orthopead J.* 6, 58-66, 2003.
2. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 38(3), 176-180, 1980.
3. Pryor ME., Susin C., Wikesjo UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol.* 33(6), 455-460, 2006.
4. Kim MG., Shin DM., Lee SW. The healing of critical-sized bone defect of rat zygomatic arch with particulate bone graft and bone morphogenetic protein-2. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 63(3), 459-66, 2010.
5. Laurencin C., Khan Y., El Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med devices.* 3, 49-57, 2006.
6. Mehrara BJ., McCarty JG. Repair and Grafting of Bone. In: Mathes SJ, ed. *Plastic Surgery* 2th ed, Vol. 1. Saunders Elsevier, Philedelphia, 639-718, 2006.
7. LaTrenta GS., McCarthy JG., Epstein M., ve ark. Bone graft survival in expanded skin. *Plast Reconstr Surg.* 81, 406-413, 1988.
8. Marx R. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg.* 41, 283-291, 1983.
9. Morales M., Marx R., Gottlieb C. Effects of pre and postoperative irradiation on the healing of bone grafts in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg.* 5, 34-41, 1987.
10. Taylor JE., Laity PR., Hicks J., Wong SS., Norris K., Khunkamchoo P., ve ark. Extent of iron pick-up in deforoxamine-coupled polyurethane materials for therapy of chronic wounds. *Biomaterials.* 26(30), 6024-33, 2005.
11. Mayr-Wohlfart U., Waltenberger J., Hausser H., ve ark. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone.* 30(3), 472-477, 2002.

12. Fiedler J., Leucht F., Waltenberger J., ve ark. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(2), 561-568, 2005.
13. Zhang W., Li G., Deng R., Deng L., Qiu S. New bone formation in a true bone ceramic scaffold loaded with desferrioxamine in the treatment of segmental bone defect: a preliminary study. *J Orthop Sci.* 17(3), 289-298, 2012.
14. Donneys A., Farberg AS., Tchanque-Fossuo CN., Deshpande SS., Buchman SR. Deferoxamine enhances the vascular response of bone regeneration in mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 129(4), 850-856, 2012.
15. Sanan A., Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery.* 40(3), 588-603, 1997.
16. Haeseker B. Mr. Job van Meekeren (1611-1666) and surgery of the hand. *Plast Reconstr Surg.* 82(3), 539-546, 1988.
17. Rugiu PS., Sykes PJ. A history of plastic surgery. Springer-Verlag, New York, 141-151, 2007.
18. Phemister DB. The fate of transplanted bone and regeneration of its various constituents. *Surg Gynecol Obstet.* 19, 303-333, 1914.
19. Gallie WE., Robertson DE. The transplantation of bone. *JAMA.* 70, 1134, 1918.
20. Mowlem R. Bone grafting. *Br J Plast Surg.* 16, 293-304, 1963.
21. Mowlem R. Cancellous chip bone grafts: report on 75 cases. *Lancet.* 2, 746-754, 1944.
22. Jee WSS. Integrated bone tissue physiology, Anatomy and physiology. In Cowin SC (Ed) *Bone mechanics handbook.* 2. ed., CRC press, Florida, 1-68, 2000.
23. Ozan H. Ozan anatomi. Nobel Basımevi, Ankara, 1-56, 2004.
24. Jee WSS. The skeletal tissues in cell and tissue biology. In Weiss L (Ed) *A textbook of histology.* Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 213-253, 1988.

25. Erdoğan D., Hatiboğlu M., Görgün M., Ilgaz C. Genel histoloji, Hatiboğlu yayınevi, 2. Baskı, Ankara, 107-117, 1999.
26. Janqueria LC., Carneiro J., Kelly RO. Basic histology. Tercüme: Aytekin Y., Temel histoloji, Barış kitabevi, 8.baskı, İstanbul, 132-146, 1998.
27. Şirin SY. Deneysel olarak meydana getirilen kemik defektlerine yerleştirilen farklı tipteki yapay kaynaklı greft materyallerinin kemikleşmesinde hiperbarik oksijen uygulamasının etkilerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2005.
28. Duthie RB. Bone and joint tissues. Scientific foundations of surgery 4.ed., Heinemann medical books, Londra, 150-166, 1989.
29. Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. Primer on the metabolic bone disease and disorder of mineral metabolism. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Chap. 1, 1999.
30. Kabaca G. Diabetik sıçanlarda selenyumun kemik iyileşmesi üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2007.
31. Köse İ. Kemik defektlerinin iyileşmesinde sentetik kemik greftleri ile kalsiyum kanal blokerleri ve β -2 reseptör antagonistlerinin etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Diyarbakır, 2012.
32. Oral O. L-dopa'nın allojenik kemik grefti uygulanan ve uygulanmayan kemik defektlerinde iyileşme üzerindeki etkilerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2000.
33. Bowers G., Granet M., Stevens M. Histologic evaluation of new attachment in humans. A preliminary report. J Periodontol. 56, 381-396, 1985.
34. Kalfas HI. Principles of Bone Healing. Neurosurg Focus. 10(4), 1-4, 2001.
35. Leslie PG., James LH. Color Textbook of Histology. 2th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 129-55, 2001.
36. Atalay B. Deneysel olarak demir eksikliği anemisi yapılan sıçanlarda kemik defektlerine yerleştirilen greft materyallerinin kemik iyileşmesine etkisinin

- histopatolojik olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2007.
37. Tuskan C., Yaltırık M. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan Biyomateryaller. Bölüm I, II. İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Yayınları, İstanbul, 2002.
 38. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 13, 3037-3051, 1999.
 39. Aubin J., Liu F. The osteoblast lineage *Principles of bone biology*. Academic Press, San Diego, 51-67, 1996.
 40. Gürkan T. Jinekolojik Yönden Osteoporoza Yaklaşım. Kutsal Y (Ed.) *Osteoporoz*, Güneş Kitabevi, Ankara, 213-230, 2005.
 41. Gergen J., Wieschaus E. Dosage requirements for runt in the segmentation of *Drosophila* embryos. *Cell.* 45, 289-299, 1986.
 42. Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., ve ark. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 89, 747-754, 1997.
 43. Komori T., Yagi H., Nomura S., ve ark. Targeted disruption of *Cbfa 1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 89, 755-76, 1997.
 44. Otto F., Thornell A., Crompton T., ve ark. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 3128-3135, 1997.
 45. St-Jacques B., Hammerschmidt M., McMahon A. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072-2086, 1999.
 46. Nijweide P., Burger E., Nulend J., ve ark. The osteocyte. In Bilezikian J, Raisz L., Rodan G., eds. *Principles of Bone Biology*, Academic Press, San Diego, 115-126, 1996.
 47. Van der Plas A., Aarden E., Feijen J., ve ark. Characteristics and properties of osteocytes in culture. *J Bone Miner Res.* 9, 1697-1704, 1994.

48. Frost HM. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. *The Angle Orthodontist*.64 (3), 175-188, 1989.
49. Duncan RL., Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcified Tissue International*.57 (5), 344-358, 1995.
50. Skerry T., Bitensky L., Chayen J., ve ark. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res*. 4, 783-788, 1989.
51. McAllister T., Frangos J. Steady and transient fluid shear stress stimulates NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways. *J Bone Miner Res*. 14, 930-935, 1999.
52. Gerstenfeld L. Osteopontin in skeletal tissue homeostasis: an emerging picture of autocrine/paracrine functions of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res*. 14, 850-855, 1999.
53. Aarden E., Burger E., Nijweide P. Functions of osteocytes in bone. *J Cell Biochem*. 55, 287-299, 1994.
54. MacPherson H., Noble B., Ralston S. Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblastlike cells. *Bone*. 24, 179-185, 1999.
55. Vaananen H., Zhao H., Mulari M., ve ark. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*. 13, 377-381, 2000.
56. Quinn J., McGee J., Athanasou N. Cellular and hormonal factors influencing monocyte differentiation to osteoclastic bone resorbing cells. *Endocrinology*. 134, 2416-2413, 1994.
57. Teitelbaum S., Tondravi M., Ross F. Osteoclast biology. In Marcus R, Feldman D, Kelsey I, eds. *Osteoporosis*. Academic Press, San Diego, 61-94, 1996.
58. Teitelbaum S. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 18, 344-349, 2000.
59. Teitelbaum S. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289, 1504-1508, 2000.

60. Alvarez J., Ross F., Athanasou N., ve ark. Osteoclast precursors circulate in avian blood. *Calcif Tissue Int.* 51, 48-53, 1992.
61. Alvarez J., Teitelbaum S., Blair H., ve ark. Generation of avian cells resembling osteoclasts from mononuclear phagocytes. *Endocrinology.* 128, 2324-2335, 1991.
62. Fujikawa Y., Quinn J., Sabokbar A., ve ark. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology.* 137, 4058-4060, 1996.
63. Yoshida H., Hayashi S., Kunisada T., ve ark. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 345, 442-444, 1990.
64. Marks S., Lane P. Congenially osteopetrotic (op/op) mice are not cured by transplants of spleen or bone marrow cells from normal litter mates. *Metab Bone Dis Relat Res.* 5, 183-186, 1984.
65. Marks S., Lane P. Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J Hered.* 67, 11-18, 1976.
66. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., ve ark. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 139, 1329-1337, 1998.
67. Blair H., Teitelbaum S., Ghiselli R., ve ark. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* 245, 855-857, 1989.
68. Vaananen H., Karhukorpi E., Sundquist K., ve ark. Evidence for the presence of proton pump of vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled border of osteoclasts. *J Cell Biol.* 11, 1305-1311, 1990.
69. Aubin J. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 76, 899-910, 1998.
70. Frost HM. The biology of fracture healing and over view for clinicians part I. *Clin. Orthop Rel Res.* 248, 283-293, 1979.

71. Cowles EA., DeRome ME., Pastizzo G., ve ark. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int.* 62, 74-82, 1998.
72. Kasugai S., Todescan RJ., Nagata T., ve ark. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol.* 147, 111-120, 1991.
73. İskender S. Kritik büyüklükteki kranial kemik defektinde yağ dokusu ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin ve bu hücrelerden farklılaştırılmış osteoblastların kemik iyileşmesi üzerine etkileri. Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Plastik Cerrahi AD. Tıpta uzmanlık tezi, Ankara, 2010.
74. Hui M., Hu M., Tenenbaum H. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue nonspecific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res.* 274, 429-437, 1993.
75. Hiltunen A., Hannu TA., Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing. *Clin Orthop.* 297, 23-27, 1993.
76. Liaw L., Birk DE., Ballas CB., ve ark. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (sppl). *J Clin Invest.* 101, 1468-1478, 1998.
77. Sandberg MM., Aro H., Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop.* 289, 292-312, 1993.
78. Bianco P., Riminucci M., Silvestrini G., ve ark. Localization of bone sialoprotein (BSP) to Golgi and post-Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix. *J Histochem Cytochem.* 41, 193-203, 1993.
79. Ducy P., Desbois C., Boyce B., ve ark. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 382, 448-452, 1996.
80. Price PA., Williamson MK., Lothringer JW. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone *J Biol Chem.* 256, 12760-12776, 1981.

81. Boskey A., Gadalcta S., Gundberg C., ve ark. Fourier transform infrared microspectrum analysis of bones of osteocalcine-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*. 23, 187-196, 1998.
82. Allgöwer M., Spiegel PG. Internal fixation of fractures: Evolution concepts. *Clin Orthop*. 138, 26-37, 1979.
83. Perren SM. Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin. Orthop*. 138, 175-196, 1979.
84. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*. 60, 150-162, 1978.
85. Kılıçoğlu SS. Mikroskopik düzeyde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2, 143-150, 2002.
86. Schenk RK. Histophysiology of bone remodeling and bone repair. In: Lin OCC, Chao EVS (editor): *Perspective on Biomaterials*. Elsevier science publisher, Amsterdam, 75-94, 1986.
87. Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg Am*. 34, 701-728, 1952;
88. Marotti G., Zallone A. Changes in the vascular network during the formation of Haversian systems. *Acta Anat*. 106, 84-100, 1980.
89. Gale N., Yancopoulos G. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*. 13, 1055-1066, 1999.
90. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem*. 271(2), 603-606, 1996.
91. Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 18, 4-25, 1997.
92. Steinbrech D., Mehrara B., Saadeh P., ve ark. VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278, 853-860, 2000.

93. Steinbrech D., Mehrara B., Saadeh P., ve ark. Characterization of growth, maturation, and expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts in response to hypoxia. *Surg Forum.* 49, 522-524, 1998.
94. Forsythe JA., Jiang BH., Iyer NV., ve ark. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 16(9), 4604-4617, 1996.
95. Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol.* 1; 59(1), 47-53, 2000.
96. Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol.* 208(2), 148-65, 2013.
97. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., ve ark. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9-22, 1999.
98. Street J., Bao M., deGuzman L., ve ark. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(15), 9656–9661, 2002.
99. Carlevar M., Cermelli S., Cancedda R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci.* 113, 59-69, 2000.
100. Saadeh PB., Mehrara BJ., Steinbrech DS., ve ark. Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol.* 277, 628-637, 1999.
101. Saadeh PB., Mehrara BJ., Steinbrech DS., ve ark. Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology.* 141, 2075-2083, 2000.
102. Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., ve ark. Biologic roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.* 18, 26-45, 1997.

103. Ribatti D., Urbinati C., Nico B., ve ark. Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Dev Biol.* 170, 39-49, 1995.
104. Wezeman F., Bollnow M. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2 in normal and brachymorphic mouse tibial growth plate and articular cartilage. *Histochem J.* 29, 505-514, 1997.
105. Debais F., Hott M., Graulet A., ve ark. The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvarial osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res.* 13, 645-654, 1998.
106. Mehrara BJ., Mackool RJ., McCarthy JG., ve ark. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 and receptor-2 in rat cranial sutures. *Plast Reconstr Surg.* 102, 1805-1817, 1998.
107. Seghezzi G., Patel S., Ren C., ve ark. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol.* 141, 1659-1653, 1998.
108. Mandriota S., Pepper M. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci.* 110, 2293-2302, 1997.
109. Dedeoğlu RK. DBM Beta-Trikalsiyum fosfatın deneysel kemik defektlerinde ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında iyileşme üzerine olan etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi İstanbul, 2004.
110. Wozney J., Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop.* 346, 26-37, 1998.
111. Hogan B. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10, 1580-1594, 1996.
112. Groeneveld E., Burger E. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocr.* 142, 9-21, 2000.

113. Katagiri T., Yamaguchi A., Ikeda T., ve ark. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 172, 295-29, 1990.
114. Kim KJ., Itoh T., Kotake S. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 35, 279-285, 1997.
115. Knutsen R., Wergedal JE., Sampath TK., ve ark. Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 194, 1352-1358, 1993.
116. Yamaguchi A., Katagiri T., Ikeda T., ve ark. Recombinant bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol.* 113, 681-687, 1991.
117. Spector JA., Luchs JS., Mehrara B., ve ark. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg.* 107, 124-134, 2001.
118. Johnson EE., Urist MR. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop.* 371, 61-74, 2000.
119. Johnson EE., Urist MR. One-stage lengthening of femoral nonunion augmented with human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop.* 347, 105-116, 1998.
120. Geesink RG., Hoefnagels NH., Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br.* 81, 710-718, 1999.
121. Bai MH., Liu XY., Ge BF., ve ark. An implant of a composite of bovine bone morphogenetic protein and plaster of paris for treatment of femoral shaft nonunions. *Int Surg.* 81, 390-392, 1996.
122. Boden SD., Zdeblick TA., Sandhu HS., ve ark. The use of rhBMP- 2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine.* 225, 376-381, 2000.

123. Cook SD., Baffes GC., Wolfe MW., ve ark. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. Clin Orthop. 301, 302-31, 1994.
124. Hedner E., Linde A. Efficacy of bone morphogenetic protein (BMP) with osteopromotive membranes—an experimental study in rat mandibular defects. Eur J Oral Sci. 103, 236-241, 1995
125. Khouri RK., Brown DM., Kouksi B., ve ark. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissue. Plast Reconstr Surg. 98, 103-109, 1996.
126. Centrella M., Horowitz M., Wozney J., ve ark. Transforming growth factor gene family members and bone. Endocr Rev. 15, 27-39, 1994.
127. Hauschka P., Mavrakos A., Iafrafi M., ve ark. Growth factors in bone matrix: isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. J Biol Chem. 45, 438-452, 1986.
128. Baird A., Walicke P. Fibroblast growth factors. Br Med Bull. 45, 438-452, 1989.
129. Vlodavsky I., Fuks Z., Ishai-Michaeli R., ve ark. Extracellular matrix resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis. J Cell Biochem. 45, 167-176, 1991.
130. Montero A., Okada Y., Tomita M., ve ark. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. J Clin Invest. 105, 1085-1093, 2000.
131. Globus RK., Patterson-Buckendahl P., Gospodarowicz D. Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor. Endocrinology. 123, 98-105, 1988.
132. Canalis E., Centrella M., Mc Carthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. J Clin Invest. 81, 1572-1577, 1988.

133. McCarthy TL., Centrella M., Canalis E. Effects of fibroblast growth factors on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in rat parietal bone cells. *Endocrinology*. 125, 2118-2126, 1989.
134. Rodan SB., Wesolowski G., Thomas KA., ve ark. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. *Connect Tissue Res*. 20, 283-288, 1989.
135. Rydziel S., Shaikh S., Canalis E. Platelet-derived growth factor-AA and -BB (PDGF-AA and -BB) enhance the synthesis of PDGF-AA in bonecell cultures. *Endocrinology*. 134, 2541- 2546, 1994.
136. Jiang D., Dziak R., Lynch S., ve ark. Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factors. *J Periodontol*. 70, 834-839, 1999.
137. Nakanishi H., Yamanouchi K., Gotoh Y., ve ark. The association of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor tyrosine phosphorylation to mitogenic response of human osteoblastic cells in vitro. *Oral Dis*. 3, 236-242, 1997.
138. Yu X., Hsieh S., Bao W., ve ark. Temporal expression of PDGF receptors and PDGF regulatory effects on osteoblastic cells in mineralizing cultures. *Am J Physiol*. 272, 1709-1716, 1997.
139. Rydziel S., Durant D., Canalis E. Platelet-derived growth factor induces collagenase 3 transcription in osteoblasts through the activator protein 1 complex. *J Cell Physiol*. 184, 326-333, 2000.
140. Canalis E., Mc Carthy T., Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol*. 140, 530-537, 1989.
141. Macy LD., Kana SM., Jingushi S. Defects of early fracture healing in experimental diabetes. *JBJS*. 71A, 722, 1989.
142. Urist MR., Silverman BF., Büring K., Dubuc FL., Rosenberg JM. Bone induction principle. *Clin Orthop*. 53, 243, 1967.
143. Reddi AH., Wientroub S., Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthopaedic Clinics of North America*. 18, 207, 1987.

144. Yenigün M., Altuntas Y. Diabetes mellitusun tanımı, tanısı ve sınıflaması, her yönüyle diabetes mellitus. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 51-63, 2001.
145. Yılmaz C., Erdemli E., Selek H., Kınık H., Arıkan M. The contribution of vitamin c to healing of experimental fractures. Arch Trauma Surg. 121, 426-8, 2001.
146. Schmitz JP., Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res. 205, 299-308, 1986.
147. Khan SN., Tomin E., Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. Orthop Clin North Am. 31(3): 389-98, 2000.
148. Samartzis D., Shen FH., Goldberg EJ., An HS. Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid anterior plate fixation? Spine. 30(15), 1756-1761, 2005.
149. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am. 84A(3), 454-64, 2002.
150. Putzier M., Strube P., Funk JF., ve ark. Allogenic versus autologous cancellous bone in lumbar segmental spondylodesis: a randomized prospective study. Eur Spine J. 18(5), 687-95, 2009.
151. Gazdag AR., Lane JM., Glaser D., Forster RA. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. J Am Acad Orthop Surg. 3(1), 1-8, 1995.
152. Khan SN., Cammisa FP. Jr, Sandhu HS., ve ark. The biology of bone grafting. J Am Acad Orthop Surg. 13(1), 77-86, 2005.
153. Sen MK., Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? Injury. 38 Suppl 1, 75-80, 2007.
154. Torroni A. Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: state of the art. J Oral Maxillofac Surg. 67(5), 1121-1128, 2009.
155. Dell PC., Burchardt H., Glowczewskie FP. A roentgenographic, biomechanical and histological evaluation of vascularized and non-vascularized segmental fibular canine autografts. J Bone Joint Surg Am. 67(1), 105-12, 1985.

156. Doi K., Tominaga S., Shibata T. Bone grafts with microvascular anastomoses of vascular pedicles: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 59(6), 809-824, 1977.
157. Kökden A., Türker M. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. *Cumhuriyet Üni. Diş Hek. Fak. Dergisi.* 2,134-140, 1999.
158. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop.* 174, 28-42, 1983.
159. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am.* 18, 187-196, 1987.
160. Weiland A., Phillips T., Randolph M. Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 74, 368-379, 1984.
161. Deleu J. Trueta J. Vascularization of bone grafts in the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg.* 47, 319, 1965.
162. Enneking WF., Burchardt H., Puhl JJ., ve ark. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am.* 57, 237-252, 1975.
163. Amsel S., Dell ES. Bone marrow repopulation of subcutaneously grafted mouse femurs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 138(2), 550-552, 1971.
164. Nandi SK., Roy S., Mukherjee P., Kundu B., De DK., Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res.* 132, 15-30, 2010.
165. Yablon IG., Cooperband S., Covall D. Matrix Antigens in Allografts: II. The Cell-mediated Response *Clin Orthop.* 172, 277-280, 1983.
166. Ijiri S., Yamamuro T., Nakamura T., ve ark. Effect of sterilization on bone morphogenetic protein. *J Orthop Res.* 12, 628-636, 1994.
167. Boyce T., Edwards J., Scarborough N. Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am.* 4, 571-581, 1999.

168. Munting E., Wilmart J., Wijne A., ve ark. Effect of sterilization on osteoinduction. *Acta Orthop Scand.* 59, 34-38, 1988.
169. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 4, 543-552, 1999.
170. Özyiğit HA. Deneyisel olarak oluşturulan defektlerde titanium partikülleri ve değişik greft materyallerinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ağız, Diş, Çene hastalıkları ve Çene Cerrahisi AD. Doktora tezi, Ankara, 2007.
171. Urist M., Dowell T., Hay P., ve ark. Inductive substrates for bone formation. *Clin Orthop.* 59, 59-96, 1968.
172. Buck B., Malinin T., Brown M. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop.* 240, 129-136, 1989.
173. Van der Kraan PM., Buma P., van Kuppevelt T., van Den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage.* 10, 631-7, 2002.
174. Hunziker EB. Growth factor-induced healing of partial thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 9, 22-32, 2001.
175. Fujimoto E., Ochi M., Kato Y., ve ark. Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. *Arch Orthop Trauma Surg.* 119, 139-45, 1999.
176. Robey PG. Stem cells near the century mark. 68. *J Clin Invest.* 105, 1489-91, 2000.
177. Watt FM., Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 287, 1427-1430, 2000.
178. Sempuku T., Ohgushi H., Okumura M., ve ark. Osteogenic potential of allogeneic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics: a histological study. *J Orthop Res.* 14, 907-920, 2005.

179. Bruder SP., Kurth AA., Shea M., ve ark. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*16, 155-62, 1998.
180. Arinzeh TL., Peter SJ., Archambault MP. ve ark. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am.* 85(A), 1927-1935, 2003.
181. Erbe EM., Marx JG., Clineff TD., Bellincampi LD. Potential of an ultraporous β -tricalcium phosphate synthetic cancellous bone void filler and bone marrow aspirate composite graft. *Eur Spine J.* 10 (Suppl 2), 141-147, 2001.
182. Nandi SK., Kundu B., Ghosh SK., ve ark. Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *J Vet Sci.* 9, 183-191, 2008.
183. Santos MH., Valerio P., Goes AM., ve ark. Biocompatibility evaluation of hydroxyapatite/collagen nanocomposites doped with Zn^{+2} . *Biomed Mater.*2, 135-141, 2007.
184. Gauthier O., Bouler JM., Weiss P., ve ark. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res.* 47, 28-35, 1999.
185. Cornell C. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 30, 591-598, 1999.
186. Neo M., Nakamura T., Ohtsuki C., Kasai R., ve ark. Ultrastructural study of the A-W G C-bone interface after long-term implantation in rat and human bone. *J Biomed Mater Res.* 28, 365-372, 1994.
187. Sidiqui M., Colin P., Vitte C., ve ark. Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclasts on calcium sulfate hemihydrate. *Biomaterials.* 16, 1327-1332, 1995.
188. La Trenta GS., McCarthy JG., Breitbart AS., ve ark. The role of rigid skeletal fixation in bone-graft augmentation of the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg.* 84, 578-588, 1989.

189. Phillips J., Rahn B. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft resorption. *Plast Reconstr Surg.* 82, 872-877, 1988.
190. Lin KY., Bartlett SP., Yaremchuk MJ., ve ark. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 86, 449-456, 1990.
191. Burstein F., Ariyan S., Chicarilli Z., ve ark. The effect of periosteal preservation on osteogenesis in a canine rib autograft model: tetracycline fluorescence incident photometry. *J Craniofac Surg.* 5, 161-171, 1994.
192. Peer L. The fate of autogenous human bone grafts. *Br J Plast Surg.* 3, 233, 1951.
193. Vainio S. Observation on the regeneration of an autogenous transplant of the bone. An experimental investigation. *Acta Chir Scand.* 100, 86, 1950.
194. Thompson N., Casson J. Experimental onlay bone grafts to the jaws: a preliminary study in dogs. *Plast Reconstr Surg.* 46, 341, 1970.
195. Kusiak JF., Zins JE., Whitaker LA. The early revascularization of membranous bone. *Plast Reconstr Surg.* 76, 510-516, 1985.
196. Eppley BL., Connolly DT., Winkelmann T. Free bone graft reconstruction of irradiated facial tissue: experimental effects of basic fibroblast growth factor stimulation. *Plast Reconstr Surg.* 88, 1-11, 1991.
197. Helmrich U., Di Maggio N., Güven S., ve ark. Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF-expressing human mesenchymal progenitors. *Biomaterials.* 34(21), 5025-5035, 2013.
198. Knize DM. The influence of periosteum and calcitonin on onlay bone graft survival: A roentgenographic study. *Plast Reconstr Surg.* 53, 190-109, 1974.
199. Chen CH., Shih CH. Acetabular allograft reconstruction in total hip arthroplasty: preliminary report with clinical, roentgenographic and scintigraphic analyses. *J Formos Med Assoc.* 93, 781-787, 1994.

200. Pinholt EM., Solheim E., Talsnes O., ve ark. Revascularization of calvarial, mandibular, tibial, and iliac bone grafts in rats. *Ann Plast Surg.* 33, 193-197, 1994.
201. Buchman SR., Ozaki W. The ultrastructure and resorptive pattern of cancellous onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg.* 43, 49-56, 1999.
202. Tüzün Y., Yakut M. Demir metabolizması ve hereditör hemokromatozis. *Güncel Gastroenteroloji.* 13(2), 94-102, 2009
203. Smith TG., Talbot NP. Prolyl hydroxylases and therapeutics. *Antioxid Redox Signal.* 12(4), 431-434, 2010.
204. Woo KJ., Lee TJ., Park JW., Kwon TK. Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1 α accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(1), 8-14, 2006.
205. Genetos DC., Toupadakis CA., Raheja LF., Wong A., ve ark. Hypoxia decreases sclerostin expression and increases Wnt signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 110(2), 457-467, 2010.
206. Hill TP., Spater D., Taketo MM., Birchmeier W., Hartmann C. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.* 8(5), 27-38, 2005.
207. Day TF., Guo X., Garrett-Beal L., Yang Y. Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 8(5), 739-750, 2005.
208. Lu C., Marcucio R., Miclau T. Assessing angiogenesis during fracture healing. *Iowa Orthop J.* 26, 17-26, 2006.
209. Stevenson S., Emery S., Goldberg V. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Relat Res.* 324, 66-74, 1996.
210. Habal MB. Different forms of bone grafts. In: Habal MB, Reddi AH, eds. *Bone Grafts and Bone Substitutes.* WB Saunders, Philadelphia, 6-8, 1992.
211. Hausman MR., Schaffler MB., Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone.* 29, 560-564, 2001.

212. Eckardt H., Ding M., Lind M., ve ark. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br.* 87, 1434-1442, 2005.
213. Colnot C., Thompson Z., Miclau T., Werb Z., Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* 130, 4123-4133, 2003.
214. Tarkka T., Sipola A., Jamsa T., ve ark. Adenoviral VEGF-a gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J Gene Med.* 5, 560-566, 2003.
215. Santos MI., Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, majör hurdles and future challenges. *MacromolBiosci.* 10(1), 12-27, 2010.
216. Riddle RC., Khatri R., Schipani E., Clemens TL. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in angiogenic-osteogenic coupling. *J Mol Med (Berl).* 87(6), 583-90, 2009.
217. Emad B., Sherif EM., Basma GM., ve ark. Vascular endothelial growth factor augments the healing of demineralized bone matrix grafts. *Int J Surg.* 4, 160-166, 2006.
218. Street J., Lenehan B. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival-evidence for an autocrine feedback mechanism. *J Orthop Surg Res.* 4, 19, 2009.
219. Chow KM., Rabie AB. Vascular endothelial growth pattern of endochondral bone graft in the presence of demineralized intramembranous bone matrix--quantitative analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 37(4), 385-394, 2000.
220. Frame JW., Broune RM., Brady CL. Biologic basis for interpositional autogenous bone grafts to the mandible. *J Oral Maxillofac Surg.* 40, 407-411, 1982.
221. Burwell RG. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop Relat Res.* 200, 125-141, 1985.

222. Yamaguchi A., Murakami T., Takahashi M., Kobayashi E., Sugawara Y. Luminescence imaging of regenerating free bone graft in rats. *Plast Reconstr Surg.* 127(1), 78-87, 2011.
223. Virolainen P., Vuorio E., Aro HT. Different healing rates of bone autografts, syngeneic grafts and allografts in an experimental rat model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 116(8), 486-495, 1997.
224. Günaydın R., Karatepe AG. Kemiğin biyomekanik özellikleri ve yaş ile ilişkili kırıkların biyomekaniği. *Türk Osteoporoz Dergisi.* 13, 44-48, 2007.
225. Turner CH., Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone.* 14, 595-608, 1993.
226. Dönmez BÖ. Deneysel osteoporozun sıçan femurunda oluşturduğu biyomekanik ve histomorfometrik değişikliklere anjiotensin II tip I reseptör blokajının etkisi. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi AD., Doktora tezi, Antalya, 2010.
227. Donneys A., Ahsan S., Perosky JE., ve ark. Deferoxamine restores callus size, mineralization and mechanical strength in fracture healing after radiotherapy. *Plast Reconstr Surg.* 131(5), 711e-720e, 2013.
228. Donneys A., Deshpande SS., Tchanque-Fossuo CN., Deferoxamine expedites consolidation during mandibular distraction osteogenesis. *Bone.* 55(2), 384-390, 2013.
229. Farberg AS., Jing XL., Monson LA., ve ark. Deferoxamine reverses radiation induced hypovascularity during bone regeneration and repair in the murine mandible. *Bone.* 50(5), 1184-1191, 2012.
230. Ozcelik D., Huthut I., Kuran I., ve ark. Comparison of accuracy of three-dimensional spiral computed tomography, standard radiography and direct measurements in evaluating facial fracture healing in a rat model. *Ann Plast Surg.* 53, 473-80, 2004.

231. Weidner N., Semple, J.P., Welch. W., Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis. Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 324, 1-8, 1991.
232. Kim, K.F., Li B., Winer, J., ve ark. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 362, 841-845, 1993.
233. Terman B.I., Stoltov K.V. VEGF and tumor angiogenesis. *Einstein Quart. Biol and Med.* 18, 59-66, 2001.
234. Yu Y., Wong J., Lovejoy D.B., Kalinowski D.S., Richardson D.R. Chelators at the cancer coal face: desferrioxamine to triapine and beyond. *Clin Cancer Res.* 12(23), 6876-6883, 2006.
235. Le N.T., Richardson D.R. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta.* 1603, 31-46, 2002.
236. Selig R.A., White L., Gramacho C., ve ark. Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res.* 58, 473-481, 1998.