

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

BORNİTRÜR VE HİDROKSİAPATİT
EMDİRİLMİŞ SCAFFOLD VEYA
OTOGREFT KRANİYOPLASTİSİ İLE
KRANİYOTOMİ DEFEKTİNİN RAT BEYİN
PARANKİMİNE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Dr.Özkan ARABACI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Mürteza ÇAKIR

ERZURUM - 2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
KISALTMALAR	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	9
ŞEKİLLER DİZİNİ	11
1. GİRİŞ	12
2. GENEL BİLGİLER.....	14
2.1. Kraniyal kemik defektleri	14
2.2. Kritik Büyüklükte Kemik Defekti.....	14
2.3. İyileşmeyi Etkileyen Faktörler	14
2.4. Kraniyoplasti	16
2.5. Kraniyoplastide Kullanılan Materyaller.....	18
2.6. Kraniyoplastide Amaç ve Endikasyonlar	18
2.7. Kraniyoplasti Amacıyla Kullanılan Malzemeler	19
2.8. Kalsiyum Fosfat İskeleleri	21
2.8.1. Beta-Trikalsiyum Fosfat.....	21
2.8.2. Çift fazlı Kalsiyum Fosfat	21
2.8.3. Oktakalsiyum Fosfat	21
2.8.4. Kalsiyum Sülfat İskeleler	22
2.9.Titanyum	22
2.10. Metil-Metakrilat	22
2.11. Medpor (Porous Polyethylene)	22
2.12. Hidroksiapatit.....	23
2.13. Bor Nitrür (BN) veya Boron Nitrit.....	24
2.14. PLGA	25
2.15. Pediyatrik Kullanım için Malzemeler	26
2.16. Antioksidan Enzimler.....	26
2.17. Deneysel Kafa Travma Modelleri	28

2.18. Canlı Organizma Hayvan Modellerinde Kafatası Defektleri.....	28
2.19. Küçük Hayvan Modelleri.....	29
2.20. Daha Büyük Hayvan Modelleri	30
2.21. Ratlarda Beyin Anatomisi	30
3. GEREÇ-YÖNTEM	32
3.1. Hayvan Seçimi ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması	32
3.2. Kranioplasti İçin Kullanılacak Scaffold Materyal Hazırlanması	33
3.2.1. PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid)] İskelesinin (Taşıyıcı) Yapımı	33
3.2.2. Sol-Jel Yöntemiyle HA Elde Edilmesi	33
3.2.3. Trikalsiyum fosfat (TCP)–Hekzagonal Bor Nitrür Kompozitlerinin Elde Edilmesi	34
3.2.4. Bor Nitrür ve Hidroksiapatit Emdirilmiş Scaffold Malzeme Karakterizasyonu.....	34
3.3. Kraniyotomi ve Kraniyoplasti Aşamaları	34
3.4. Histomorfolojik ve Biyokimyasal Analizler İçin Materyal Elde Edilmesi	39
3.5. Histopatolojik analizler	39
3.5.1. Doku Takip İşlemleri	39
3.5.2. Gömme işlemi:	40
3.5.3. Kesit Alma İşlemi	40
3.5.4. Deparafinizasyon İşlemi	40
3.5.5. Boyama-Kapama İşlemleri.....	40
3.5.6. Kesitlerin Değerlendirilmesi ve Fotoğraf Çekimi.....	41
3.6. Biyokimyasal Çalışmalar	42
3.6.1 Süpernatant Hazırlanması	42
3.6.2. SüperoksitDismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini.....	42
3.6.3. Total Glutasyon (GSSG/GSH) Enzim Aktivite Tayini	43
3.6.4. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktar Tayini.....	45
3.7. İstatistiksel Analiz.....	46
4. BULGULAR	47
4.1.2. Defekt Grubu.....	48
4.1.3. Defekt+Otogreft Grubu.....	49
4.1.4. Defekt + %10 HA Grubu	50

4.1.5. Defekt + %10 BN Grubu	51
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	54
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR	67
KAYNAKLAR	69

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren saygıdeğer hocalarım, Prof. Dr. Hakan Hadi KADIOĞLU, Prof. Dr. Mehmet Dumlu AYDIN, Doç. Dr. Gökşin ŞENGÜL, Yrd. Doç. Dr. Çağatay ÇALIKOĞLU'na teşekkürü bir borç bilir, şükranlarımı sunarım. Tezimin hazırlanmasında, her aşamasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen başta tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mürteza Çakır olmak üzere, Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Zekai HALICI'ya ve Arş. Gör. Muhammed YAYLA'ya, Histoloji Anabilim Dalında görevli Arş. Gör. Erdem TOKDEMİR' e, bu çalışmayı 112M495 proje numarası ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a , Erzurum Adli Tıp Kurumu'nda görev yapan arkadaşım Dr. Ahmet ŞAHBAZ'a, her konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamamda da benden sevgisini, saygısını, anlayışını ve yardımını esirgemeyerek bana destek olan hayat arkadaşım eşim Betül Özer'e, asistan arkadaşlarım klinik hemşireleri ve personellerine ,tüm yaşantım boyunca gerek manevi gerekse maddi desteklerini sonuna kadar benim için kullanan ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan sevgili annem, rahmetli babam ve değerli kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özkan ARABACI

ÖZET

Bu çalışmada, bornitrür-hidroksiapatit emdirilmiş scaffold veya otogreft kraniyoplastisi ile kraniyotomi defektinin rat beyin parankimine etkileri biyokimyasal ve histolojik karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Çalışmamızda deney hayvanı olarak toplam 60 adet Albino Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 10 adet olmak üzere 6 gruba ayrıldı.

Genel anestezi uygulamasından sonra gruplardaki deneklerin parietal kemiklerinin merkezinden 8 mm çapında defektler oluşturuldu. Defektlere otogreft , BN (Bor Nitrür), HA (Hidroksiapatit) ve PLGA (poli-laktit ko-glycolideasid) emdirilmiş scaffoldlar yerleştirildi ve 1ay boyunca iyileşmeye bırakıldı.4 hafta sonunda tüm gruplardaki hayvanların kalvarial kemikleri implant ile beraber dikkatlice çıkarıldı. Biyokimyasal ve histolojik inceleme için defektli bölgedenbeyin parankim örnekleri alındı. Antioksidan enzim düzeylerinin ölçümelerini içeren biyokimyasal analizlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi.

Bütün grupların parankim hasarı açısından histopatolojik bulguları değerlendirildiğinde, en az hasarın otogreft grubunda olduğu, daha sonraki sıralamanın HA ve BN, PLGA Scaffold ve defekt grubu olduğu belirlendi. Postoperatif dönem süresince elde ettiğimiz bulgular ışığında sonuç olarak BN ‘ün kraniyoplasti uygulamalarında alternatif bir sentetik greft materyali olarak kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiapatit, bor nitrür, rat, kraniyoplasti ,defekt,kemik grefti

ABSTRACT

This experiment was conducted to evaluate the effects of boron nitride-hydroxyapatite impregnated scaffold or the craniotomy defects caused by the autograft cranioplasty rat brain parenchyma biochemical and histological parameters. Albino Wistar male rats were divided into 6 groups, each consisting of 10 rats. After administration of general anesthesia a bone defects (8 mm diameter) was created the parietal bone. Defects was applied with autograft, boron nitride, hydroxyapatite and PLGA containing scaffolds and them were allowed to recover for 1 month. Calvarial bones of animals in all groups were removed with implants after 4 weeks. Brain parenchyma tissue from defective region were taken for biochemical and histological examination. Antioxidant enzyme levels were different across the study groups. Postoperative period, histological data revealed at least damage and autograft provided for parenchyma damage. Compared with other grafts, BN may be an alternative bone synthetic graft in neurosurgery applications.

Key Words: Hydroxyapatite, boron nitride, rat, cranioplasty, defect, bone graft

KISALTMALAR

GSH	: Redükte glutatyon
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
HA	: Hidroksiapatit
BN	: Bor nitrür
PLGA	: poli-laktit ko-glycolideasid
HBN	: Hegzogonal bor nitrür
BMP	: bone morphogenetic protein
RANKL	: Reseptor aktivatör of nüklear faktör
OPN	: Osteopontin
SPP1	: Secreted phosphoprotein 1
CBFA1	: Hücrenin çekirdeğine bağlanan faktör alfa
OSF2	: osteoblast sipesifik faktör
RunX2	: Runt-ilişkili transkrip faktör
OC	: osteokalsin ()
ALP	: alkalen fosfataz ()
BTCP	: Beta – trikalsiyum fosfat ()
OCP	: Oktakalsiyum Fosfat
TCP	: tri kalsiyum fosfat

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Günümüzde Kullanılan Hayvan Modellerinin Özellikleri.....	29
Tablo 2. Çalışma grupları	32
Tablo 3. Beyin histomorfolojik bulgular skor tablosu	53
Tablo 4. Enzim aktivite düzeyleri	54
Tablo 5. SOD Enzim Aktivite Düzeyleri Gruplar Arası İstatiksel Analiz.....	55
Tablo 6. GSH Enzim Aktivite Düzeyleri Gruplar Arası İstatiksel Analiz.....	55
Tablo 7. MDA Enzim Aktivite Düzeyleri Gruplar Arası İstatiksel Analiz	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Saçlı derinin %10 luk polivinil iodine ile sterilizasyonu.....	35
Resim 2: Frontooksipital cilt insizyonu ile cilt flebinin diseksiyonu	35
Resim 3: Kraniyuma 8 mm çapında trepanfrez yardımı ile kraniyotomi yapılması ...	36
Resim 4-5: 8 mm çapında bikotikal kraniyal kemiğin dura üzerinden kaldırılması .	36
Resim 6: Kraniyotomi defektine BN emdirilmiş scaffold yerleştirilmesi.....	37
Resim 7: Kraniyotomi defektine HA emdirilmiş scaffold yerleştirilmesi.....	37
Resim 8: Kraniyotomi defektine PLGA emdirilmiş scaffold yerleştirilmesi.....	37
Resim 9: Kraniyotomi defektine otogreft yerleştirilmesi.....	38
Resim 10 A: Olağan görünümde araknoid mater ve beyin korteksi,.....	47
Resim 10 B: Kortekste hafif ödeme bağlı parlak görünüm,	47
Resim 10 C- D: Kortekste dejeneratif görünüm ve kirli beyaz renk değişikliği,	47
Resim 10 E: Kortekste ödem ve krem-sarı renkli dejeneratif görünüm,.....	47
Resim 11.A) Olağan histomorfolojik bulgular gösteren korteks-moleküler tabaka H&E (x100).	48
Resim 11.B) Olağan histomorfolojik bulgular gösteren korteks-moleküler tabaka H&E (x400).....	48
Resim 12.C) Beyin dokusundan yer yer ayrılan piamater ve subaraknoidal mesafede şiddetli dilatasyon H&E (x100).	49
Resim 12.D) Beyin dokusundan yer yer ayrılan piamater, subaraknoidal mesafede şiddetli dilatasyon ve kortekste izlenen çok sayıda apoptotik nöron H&E (x400).....	49
Resim 13E) Piamater altında yer alan vasküler yapılarda hafif dilatasyon ve seyrek apoptotik nöron H&E (x100).....	50
Resim 13F) Piamater altında yer alan vasküler yapılarda hafif dilatasyon ve seyrek apoptotik nöron H&E (x400).....	50
Resim 14.A-B) Piamater altında yer alan vasküler yapılarda hafif dilatasyon, subaraknoidal mesafede orta şiddette dilatasyon ve apoptotik nöronlar H&E (x100-400).....	51

Resim 15. C-D) Piamater altında yer alan vasküler yapılarda hafif dilatasyon, subaraknoidal mesafede orta şiddette dilatasyon ve apoptotik nöronlar H&E (x100-400).....	52
Resim 16.E) Beyin dokusundan yer yer ayrılan piamater ve subaraknoidal mesafede şiddetli dilatasyon H&E (x100).	53
Resim16.F) Beyin dokusundan yer yer ayrılan piamater, subaraknoidal mesafede şiddetli dilatasyon ve kortekste izlenen çok sayıda apoptotik nöron H&E (x400).....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kemik Doku ve Hidroksiapatit yapısı	23
Şekil 2. %10 BN içeren HAp-PLGA Örnekleri Elektron Mikroskop Görüntüsü	24
Şekil 3. Katkısız PLGA Örneğine ait İkincil Elektron Mikroskop Görüntüsü.....	25
Şekil 4 A. İnsan beyin yapısı; gyrus ve sulcuslar belirgin.....	31
Şekil 4 B. Rat beyin yapısı; tipik olan lisencephaloz görülmekte ve beynin ön bölümünde belirgin halde görülen bulbus olfactoriuslar.....	31

1. GİRİŞ

Günümüzde trafik kazaları, ateşli silah yaralanmaları ve iş kazalarının görülme sıklığı arttıkça bireysel iş gücü ve yaşam kalitesi de olumsuz etkilenmiştir. Mortalite ve morbidite oranları artmış, bu artışta kafatası yaralanmalarının önemli ölçüde sorumlu olduğu görülmüştür¹.

Kafatası yaralanmalarına yol açan nedenlerin başında travmalar gelmektedir. Stula ve arkadaşlarının kranium defektlerinin nedenlerini incelediği çalışmasında defekte yol açan nedenlerin başında %67 oranında travmanın rol aldığı, tümörlerin ise %17 civarında olduğu bildirmiştir. Diğer nedenler arasında %12,5 oranla dekompressif kraniyotomi ve %5 oranla osteomyelit sayılmaktadır².

Kraniomaksillofasiyal kemik defektleri sakatlanmalar sonucu ortaya çıkabileceği gibi doğuştan meydana gelen kusurlar olarak da ortaya çıkabilir. 2001 yılında 37,732 çocuğun doğuştan gelen kemik defektlerinin giderilmesi için ameliyat olduğu, 24,298 hastanın yüz ve çenedeki sakatlanmalar sebebiyle ameliyat olduğu bildirilmiştir. Kemik defektleri işlevsellik yönünden zayıflatıcı, sosyal yönden pasifleştirici, biyomedikal ve ekonomik olarak oldukça masraflıdır. Terörle mücadelede çatışma kaynaklı kraniomaksillofasiyal yaralanmalar çene cerrahlarına, plastik cerrahlara ve beyin cerrahlarına sayısız zorluklar getirmiştir. Vietnam savaşından itibaren Irak ve Afganistan'daki savaşlar, bunun yanı sıra artan patlayıcı madde kullanımı, kraniomaksillofasiyal savaş yaralanmalarının artmasına yol açmıştır. Kafa travmaları nedeni ile estetik olarak tedavi edilemeyeceği düşünülen hastalarda günümüzde rekonstrüktif cerrahi işlemlere daha iyi cevaplar alınabilmektedir. Bu hastalar için beynin korunması ve kafatasının yeniden oluşturulması yanı sıra kalvaryum ve yüz kemiklerinin estetik ve işlevsel olarak yenilenmesi gerekebilir. Bunun için çok sayıda prosedür gerekebilir ve sıklıkla da düşük estetik ve işlevsel sonuçlar elde edilmektedir. Kalvaryum kendiliğinden sertleşmesi sadece iki yaşın altındaki çocuklarda meydana gelmektedir³.

Kemik defektlerinin iyileşmesinde öncelikli amaç, kendiliğinden ve hızlı bir şekilde iyileşmeyi sağlamaktır. Ancak oluşan defektin büyüklüğüne göre iyileşme azalmakta veya hiç iyileşmemekte ve cerrahi müdahaleye gerek duyulmaktadır⁴⁻⁵. Uygulanan tedavi yaklaşımları arasında "gold standart" yaklaşım otogreft kullanımıdır⁶.

Kafatası defektlerini gidermek için otojenöz kemik nakli ve allojenik destekli kemik, seramik iskeleler ile sentetik materyaller ve kemik yerine geçebilecek kalsiyum seramikler gibi çok çeşitli materyaller ve yöntemler önerilmektedir. Günümüzde hücre temelli alternatifler ve bone morphogenetic protein (BMP) kullanılmaktadır. Ayrıca hücre temelli terapiler, hücreli ve hücreli iskeleler, rekombinant gen terapisi, lokal küçük molekül terapileri dahil olmak üzere çok fazla stratejiye başvurulmuştur. Her bir yöntem kraniofasiyal yenilemeyi başarabilecek olmasına rağmen, donör sahada hastalık (ölüm) oranı, kontür düzensizlikleri, yetersiz otojen kaynaklar, hastalık bulaşımı, graft versus host hastalığı, immünoşüpresyon, yapısal başarısızlık ve yabancı cisim enfeksiyonu gibi kısıtlamalara sahiptir. Bu sebeple, yeni ve gelişmiş tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır³. Kalsiyum fosfat esaslı bir biyoseramik malzeme olan hidroksiapatit (HA) bu amaçla kullanılmaktadır ve büyük kemik defektlerinde yapısal desteğe ihtiyaç duyulduğunda önem kazanmaktadır⁷.

Bor madeninden birçok malzeme üretilmiş olup konumuzla ilgili en önemli ve en destekleyici malzeme nanoteknoloji ile üretilmiş Bor nitrürdür (BN). Bor nitrür, kendine has fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması nedeni ile mühendislik uygulamalarında tercih edilen bir malzemedir. Yapısal olarak grafit benzer hekzagonal yapıda, düşük yoğunluğu, yüksek ısı iletkenliği, kimyasal kararlılığı ve toksik olmaması gibi özellikleri nedeni ile tıp, ilaç ve kozmetik sektöründe de tercih edilen bir malzemedir⁸.

Çalışmamızın konusu ile ilgili olarak HA - Hekzagonal bor nitrür (HBN) kompozitlerinin kalvarial kemik defektlerinin iyileşmesi alanında kullanıldığı ve beyin parankimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir uygulama henüz yoktur. Bu çalışma ile HA-HBN kompozitlerinin kemik greft materyali yerine kullanılması sonucu, postoperatif dönemde elde edilen biyokimyasal ve histopatolojik bulgular karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kraniyal kemik defektleri

Kemik defektleri hastalıklara bağlı, cerrahi işlemler sırasında veya en önemlisi de travmalara bağlı gelişebilmektedir. Travmalara bağlı olarak ABD de her yıl 7,9 milyon kişide kemik kırıklarının meydana geldiği kaydedilmiştir⁹. Hastaların yaklaşık %5-10 'unda iyileşme sırasında istenmeyen komplikasyonlar gelişmektedir^{10,11}. Yıllık yaklaşık olarak 1,5 milyon kişiye kemik grefti operasyonu yapılmaktadır. Bu yüzden kemik defekti alanına uygun doğal kemik dokusunu şekillendirebilecek, kemik rejenerasyonunu artırmaya yönelik greftlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Kritik Büyüklükte Kemik Defekti

Kritik büyüklükteki kemik defektini ilk kez Schmitz ve Hollinger tanımlamışlardır¹². Buna göre kritik büyüklükteki kemik defekti organizmanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki kemik içi defekt olarak tanımlanmıştır. Bu tip defektler, yeni kemik oluşumu yerine fibröz bir bağ dokusu ile dolar⁴. Sıçanlarda kritik büyüklükteki kraniyal kemik defekti “8 mm çapındaki bir dairesel kemik defekti” olarak tanımlanmıştır^{12,13}. Sıçanlarda kritik büyüklükteki kraniyal kemik defektinin primer fibröz kallus dokusu ile dolduğu ancak üç aylık periyotta minimal bir kemikleşmenin olduğu tespit edilmiştir^{12,14}.

2.3. İyileşmeyi Etkileyen Faktörler

Kalsifikasyon, osteoblast benzeri hücrelerin çeşitli etkenler tarafından tetiklenmesi sonucu kemik formasyonuna dönüşmesi ile oluşur. İn vitro çalışmalarda osteoblastların hidroksiapatit mineralleri etkisi ile kemik oluşumunu meydana getirdiği bilinmektedir¹⁵. Osteoblastlar BMP, Reseptör aktivatör of nüklear faktör (RANK) ve inflamatuvar mediatörler gibi çeşitli faktörler ile kemik oluşumu teşvik etmektedir¹⁶.

Bunlar arasında yer alan Osteopontin (OPN), kalsiyum ve hidroksiapatitin bağlandığı kemik matriksinde bulunan ve hücre dışında biriken bir glikoproteindir ayrıca secreted phosphoprotein 1 (SPP1), 44 kDa kemik fosfoprotein olarak da bilinmektedir¹⁷. Osteopontin integrin bağlayıcı bir protein olarak çalışmaktadır. Fizyolojik olarak osteoblastların farklılaşması ve kemik şekillenmesi gibi önemli görevlerde rol almaktadır¹⁸. Osteopontin, osteoblast ve osteoklast hücrelerinin farklılaşmasını ve adhezyonunu da teşvik etmektedir¹⁹ bu yüzden osteopontin kemik minerilizasyonunu düzenleyen önemli proteinlerden biridir^{20, 21}. Yapılan çalışmalarda hidroksiapatitin osteopontin'e bağlanarak mineralizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir²¹.

Osteokalsin osteoblastlar tarafından salınan ve kemik şekillenmesinin belirleyicilerinden biri olan minerilizasyonu teşvik eden ve 49 aminoasidik kollejen olmayan bir proteindir²². Kemik metabolizmasının düzenlenmesi için biyokimyasal aktiviteye sahiptir²³.

Kemik metabolizmasını kontrol eden faktörler arasında BMP' de yer almaktadır. TGF- β süper ailesinin çok fonksiyonlu büyüme faktörlerinin bir üyesidir. Bu faktörler doğum sonrası iskeletin embriyonik gelişimde kemik oluşumunu da düzenlemektedirler. BMP hücre içi sinyal yollarını harekete geçirerek Runx2 molekülü ile etkileşime girerek kemik oluşumunu da teşvik etmektedirler²⁴.

Hücrenin çekirdeğine bağlanan faktör alfa (CBFA1) ve osteoblast sipesifik faktör (OSF2) olarakta bilinen Runx2, kemik gelişiminde rol alan önemli bir transkrip faktörüdür. Osteoblastik hücrelerden köken alan yapılardan sentezlenmektedir^{25, 26}.

İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda osteoblast farklılaşmasında ve dolayısı ile kemik oluşumu sırasında ve deminerilizasyonunda Runx2'nin gerekli bir transkript faktörü olduğu gösterilmiştir. Runx2, kollajen tip I, osteopontin, osteokalsin (OC) dahil olmak üzere birçok osteoblastik genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir²⁷.

Osteoprogenitör hücreler farklılaşarak osteoblastik fenotipi birkaç aşamada gerçekleştirirler. İlk aşamada hiç veya çok düşük kemik alkalin fosfataz aktivitesi göstermekle beraber minerilizasyon aktivitesi göstermezler. İkinci aşamada ise kemik ekstraselüler matriksin olgunlaşması ile kemik alkalin

fosfataz (ALP) ve kollajen tip 1 gibi genler aktif hale gelirler. Böylelikle yüksek kemik ALP aktivitesi oluşur ancak kemik minerilizasyonu düşük olur. Üçüncü aşama ise farklılaşma aşaması olmakta ve ekstraselüler matriks minerilizasyonu artmaktadır. Osteoblastlarda kemik ALP aktivitesi orta seviyededir ve minerilizasyon ve matriks proteinleri ise yüksek aktivite gösterir^{28,29}.

Kemik dokunun bir tamamlayıcısı olan kollojen kemik matriks proteinlerinin yaklaşık % 80'ini kapsamaktadır³⁰. Bu açıdan kollajen miktar değişikliği kemik mineral artışı ve kemiğin kırılabilirliğini etkileyebilir. Kollajeni oluşturan genetik yapıların mutasyonu kişilerde kemik kırılabilirliğini ve de dolayısı ile kemik yeniden oluşumunu etkileyebilmektedir³⁰.

2.4. Kraniyoplasti

Kraniyoplasti, kafatası defektlerinin kozmetik ve işlevsel yapısına uygun olarak düzeltilmesidir. Ayrıca deformasyona veya defekte uğrayan bir kafatasının cerrahi olarak tamiridir⁴⁰. Kafatası defektleri travma veya daha önce geçirilmiş bir ameliyat sonrası oluşabilir.

Kranyal defekt sebepleri;

- Kranyum defektleri en sık travma sonrası ortaya çıkmaktadır.
- Üç yaşından küçük çocuklarda büyüyen kafa kırıkları kranyal defekte neden olmaktadır.
- Tümör eksizyonu sonrası osteomalar, hemangiomalar, menengiömler, eozinofilik granülom, epidermoid tümörler, fibröz displazi, metastatik tümörler ortaya çıkabilir.
- Enfeksiyonlar (kranyum osteomyeliti, skalp kesilerinin enfekte olması)
- Ensefalosel
- Doğumsal anomaliler
- Yanıklar
- Radyonekroz
- Elektrik çarpmaları
- Beyin ödemi tedavisinde kullanılan eksternal dekompresyon tedavisi⁴⁰ gibi nedenlerle oluşabilir.

Kraniyoplasti, nöroşirurji pratiğinde sık görülen kozmetik problemler nedeniyle ortaya çıkan bir cerrahi girişimdir. Günümüzde kraniyoplasti için belirli görüşlere varılmış olmasına rağmen kullanılacak materyal ve teknik konusunda henüz belirli bir protokol sağlanamamıştır. İdeal kraniyoplasti materyaline ulaşılmamış ve bununla ilişkili olarak ideal cerrahi teknik sunulamamıştır⁴⁰.

Kraniyoplastinin tarihçesi trepenasyon kadar eskilere dayanmaktadır. Milattan önce (M.Ö.) 7000 yıllarına ait Prehistorik ve Neolitik dönem kalıntılarında kraniyoplasti uygulandığını gösteren kanıtlar bulunmuştur⁴². Fransa'nın Circa bölgesinde M.Ö.100 yıllarında kraniyoplasti uygulandığını gösteren kanıtlar görülmüştür. Bu dönemde kraniyoplasti sadece Avrupa ile sınırlı kalmamış Peru 'nun Paracas bölgesi Lima yakınlarında yapılan kazılarda M.Ö. 2000 yıllarına ait kraniyoplasti kanıtlarına rastlanmıştır. Aynı dönemlerde Güney Denizi adalarında hindistan cevizi kabuğu kullanılarak yapılan kraniyoplasti olguları ortaya çıkmıştır^{41,42}. Kraniyoplastide allograft kullanımına ilk defa Peru'da İnka uygarlığında rastlanmıştır. Bu dönemden itibaren 16 yy.'a kadar kraniyoplasti hakkında detaylı bir belgeye rastlanılmamıştır. Bu nedenle 16. yüzyılda Fallopius'un altın tabakların kullanımına ait belgeler oldukça önemlidir⁴³. Kraniyoplastide ilk defa kemik kullanımı 1668' de Meekeren tarafından uygulanmıştır. Meekeren köpek kranyumu kullanarak bir hastada kraniyoplasti uygulamıştır⁴⁴. 20. Yüzyılda otograft ve allograft kullanımı ün kazanmıştır. Macewen 1885' de ve Burrell 1888'de hastaların kendi kranyumunu kullanarak erken kraniyoplasti uygulamışlardır^{45,46}. Seydel tarafından 1889 yılında kraniyoplastide tibia parçaları kullanılmıştır⁴⁷. Dobroworski 1911 yılında ilk defa otolog kosta kullanmıştır⁴⁸. 1912'de Röpke tarafından ilk defa skapula kemik greft kaynağı olarak kullanılmıştır. Kraniyoplastide ilk allograft kullanımı 1915 yılında Morestin tarafından kartilaj dokusu kullanılarak yapılmıştır⁴⁹. Sicard Dambrin 1910-1917 yılları arasında kraniyoplasti materyali olarak kadaverik kafatası kullanmıştır⁵⁰. Metil-metakrilat ilk defa 1940 yılında Zander tarafından kullanılmıştır. Günümüzde ise osteoindüktif maddelerin kullanımıyla ilgili çalışmalar hız kazanmıştır⁵¹.

2.5. Kraniyoplastide Kullanılan Materyaller

Kraniyektomi defektini kapatmak için tarihte ve bugün birçok madde kullanılmıştır. Kullanılan maddeler şu şekilde sıralanabilir⁵².

- ✓ otogreft (hastanın kendi kemiği),
- ✓ allogreft (aynı türden bir kaynak - kadavra)
- ✓ ksenogreft (farklı bir tür)
- ✓ biyomateryaller (sentetik materyaller)

İdeal bir kraniyoplasti materyali şu özellikleri taşımalıdır;

- Kraniyektomi defektine uyabilmeli ve büyüyerek defekti tamamen kapatmalı,
- Enfeksiyona karşı dirençli olmalı,
- Skalpten ve atmosferden aldığı ısıyı beyne iletmemeli,
- Radyolüsent olmalı,
- Non-magnetik olmalı,
- Ayrıca ısı etkisi ile genleşme oluşmamalı,
- İyonize olmamalı ve koroziv özelliği olmamalı,
- Biyolojik olarak parçalanmamalı ve stabil olmalı,
- Estetik olarak uygun olmalı,
- Biomekanik kuvvetlere kafatası kadar dayanıklı olmalı ve koruyucu olmalı,
- Ayrıca şekil verilebilir ve kolay bükülebilir olmalı,
- Maliyeti yüksek olmamalı,
- Kullanıma hazır olmalı,
- Steril olabilmelidir.

Ancak bu özelliklerin tümüne sahip bir materyal halen bulunamamış ve uygulanan cerrahi tekniklerin birbirine belirgin üstünlüğü kanıtlanamamıştır⁴⁰.

2.6. Kranioplastide Amaç ve Endikasyonlar

Kranioplasti operasyonlarının, intrakraniyal yapıların korunması ve kozmetik olmak üzere başlıca iki büyük endikasyonu vardır⁵⁹. Kraniyoplasti uygulamalarındaki amaç yalnız kozmetik düzeltme olmayıp defekte bağlı rahatsızlık hissini azaltmak ve hastaların sosyal güvenlerini arttırarak performanslarını yükseltmektir^{41, 42, 43, 52, 53}. Bunun yanı sıra atmosfer basıncının etkisiyle defekten içeri herniye olan skalp, alttaki beyin dokusunda bası ve irritasyona neden olarak

nöbet sebebi olmaktadır. Bu hasta grubunda kraniyoplasti sonrası nöbetler önlenmektedir⁴¹. Baş ağrısı, baş dönmesi, titreşim ve ses intoleransı, irritabilite, yorgunluk, anksiyete, motivasyon ve konsantrasyon bozukluğu ile seyreden "Trepnasyon Sendromu"nda kraniyoplasti endikasyonu mevcuttur. Her iki ventrikülün küçük kranyal defekte doğru migrasyonu ve aynı taraf orta hat şifti ve geniş kranyal defekt altındaki santral sulkusun ters tarafa şifti ile seyreden ve "Sinking Skull Flap" sendromu olarak bilinen sendrom, acil kraniyoplasti gerektiren tek durumdur^{41,52}.

Ayrıca beyin dokusunun anatomik olarak yer değiştirmesi hemipleji, intrakranyal basınç artışı, hemisferik kollaps, beyin omurilik sıvısında hidrodinamik değişikliklere neden olabilmektedir. Kraniyoplasti için zorlayıcı dört endikasyon mevcuttur, bunlar; beyin dokusunun korunması için defektin onarımı, fiziksel görünümün düzeltilmesi, intrakranyal basınç ilişkilerinin sağlanması, genç hastalarda kranyumun normal gelişimine olanak verilmesidir^{41, 43, 45, 53}. Trepnasyon uygulanan hastalarda ortaya çıkan organik sebepli bulgular kraniyoplasti sonrası düzelmiş ve intrakranyal dengeleri normale dönmüştür. Nöbetleri olan hastaların nöbetlerinde iyileşme, kranyal defekte bağlı konuşma ve motor defisiti olan hastalarda kraniyoplasti sonrasında nörolojik iyileşme görülmüştür⁴⁰.

Kraniyoplastinin kontrendikasyonları; hidrosefali, beyin ödemi, enfeksiyon, paranasal sinüslerin birbiri ile ilişkili olmaları, ince skarlanmış devitalize skalp dokusu sayılabilir⁵⁵. Dört yaşından küçük çocuklarda dura sağlam ise kranyum dokusunun defekti kendi kendine kapatması beklenilmelidir. Çocuk hastalarda kraniyoplasti uygulanmadan önce en az 1 yıl zaman tanınmalıdır^{41, 42, 52, 56}.

Kraniyoplastide zamanlama oluşabilecek devitalize otograft ve allograft enfeksiyonunun önlenmesinde oldukça önemlidir. Kraniyoplasti için uygun görülen zamanlama yara iyileşmesinden sonra 3-6 ay beklenilmesidir. Eğer enfekte yara mevcut ise bu süre yara iyileşmesini takiben 1 yıl kadar uzatılmalıdır⁸³.

2.7. Kraniyoplasti Amacıyla Kullanılan Malzemeler

Kemik defektlerinde temel amaç; kemik rejenerasyonudur. Ancak kritik boyutlu defektlerde kendiliğinden iyileşme olmaz ve bu nedenle iyileşmeyi tetiklemek için birçok alternatif kullanılır. En ideal yöntem defektin büyüklük, şekil

ve antijenik olarak benzer özelliklere sahip başka bir kemik dokusu ile doldurulmasıdır⁵⁹.

Canlı dokunun transplantasyonu ve organların kazanılmış veya konjenital defektlerin rekonstrüksiyonunda yer tutucu özelliğinin yanı sıra kemik yapımını uyaran bütün materyaller için greft terimi kullanılır⁶⁰. Cansız dokuların transplantasyonunda ise implant terimi kullanılır. Bu anlamda implant materyali olarak, canlılığını yitirmiş allojenik greft, ksenojenik greft ve sentetik materyaller kullanılmaktadır.

Kraniyotomi uygulamalarında osseöz konjenital deformitelerin, travmaya bağlı olarak ortaya çıkmış deformitelerin ve osseöz patolojilerin cerrahi eksizyonundan sonra, açığa çıkan geniş kemik defektlerinin iyileşmesinin desteklenmesi amacıyla, çeşitli kemik greftleri veya kemik yerine geçen biyomateriyallerin kullanımı gerekmektedir⁶¹.

Kritik boyuttaki defektler ilk kez tarif edildiğinden ve endojenöz iyileşmenin kısıtlılıkları anlaşıldığından beri, fizikçiler kemik iyileşmesinin artırılması için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır. Böylece iskeleler devam eden araştırmaların ana hedefi olmuştur. Temel fikir, kafatası bozukluğunun olduğu bölgeye yerleştirilen bir biyo-uyumlu, ayrıştırılabilir matrixin kemik iyileşmesini desteklemesi, yönlendirmesi ve artırmasıdır. Boş iskelelerin başarısız kullanımlarından sonra, insanlar iskeleleri hücreler ve/veya gelişme faktörlerinin bir taşıyıcısı ya da bir dağıtım sistemi gibi kullanarak iskelelerin etkinliğini artırmaya çalışmaktadırlar. Hücrelerin, ilaçların ve dış hücrel matrix materyalin yerel bir kemiksel bozukluğa dağıtımını gerçekleştirmek için, sıklıkla uygun bir taşıyıcı ağıta ihtiyaç duyulur ve bunun için birkaç farklı malzeme önerilmiştir. İdeal iskele biyo-uyumlu, osteo-uyumlu olmalı ve kemik oluşumuna, osteoindüksiyon ve kemik gelişimine izin vermelidir. Ayrıca, iskele mekanik güç ve direnç göstermeli, ayrıştırılan ürünleri hiçbir enfeksiyonu tetiklememelidir³.

Son yıllarda yeni polimer ve sentetik materyaller geliştirilmiştir ve bunlar iskele olarak test edilmektedirler. Ancak, günümüzdeki bütün iskelelerin ortak özellikleri biyo- uyumlu ve yeniden emilebilir olmalarıdır. Yeni bileşenler ve polimerlerin çokluğuna ek olarak, kemiğe benzer bileşimleri sebebiyle kalsiyum fosfat veya kalsiyum karbonat- temelli iskeleler kullanılmaktadır³.

2.8. Kalsiyum Fosfat İskeleleri

2.8.1. Beta-Trikalsiyum Fosfat

Beta – trikalsiyum fosfat (BTCP) kemiksel oluşum için iskele olarak kullanılan ilk bileşimlerden biridir. Bu, neredeyse Süngerimsi kemiğe eş bir basınç ve gerilme direncine sahiptir ve bu da onu iskele malzemesi olarak kullanımı için çekici bir bileşim kılıyor. 1920 lere kadar erken dönemlerde bile, segmental kemik bozukluklarına enjekte edildiğinde BTCP'nin kemik birleşimini artırdığına dair raporlar bulunmaktadır. Araştırma modellerinde, BTCP sıçanlardaki kemik iyileşmesini artırmak için boş iskele olarak kullanıldı ve köpeklerin kafatası kusurlarında iskele kemik iliğinden elde edilmiş stromal hücrelerle kemik oluşumuna katkı sağladığı gösterildi. Buna ilaveten, araştırmacılar köpeklerdeki kafatası kusurlarını düzeltmek için BTCP, kolajen ve fibrin yapıştırıcıyla tutturulan otolog kemik kısımlarından oluşan bileşik bir iskele kullandılar. BTCP canlı dokudaki kemikle yer değişmesine rağmen, değişim tahmini 1:1 oranında gerçekleşmemektedir. Başka bir deyişle, BTCP emildikçe, BTCP nin emiliminden daha az yeni kemik oluşmaktadır. Bu da klinik uygulanabilirliğini bir noktaya kadar sınırlandırmaktadır³.

2.8.2. Çift fazlı Kalsiyum Fosfat

Bifazik kalsiyum fosfat BTCP ve HA nın değişen oranlarda karışımıdır. BCP iskelesi canlı organizmada emildiği için, bu implantasyonun mikro ortamına kalsiyum ve fosfat iyonları salar. Bu iyonlar sonradan doğuştan olmayan (de novo) kemiğin oluşumu için kullanılabilir. BCP iskelelerin kritik boyuttaki kafatası bozukluklarını gidermede kullanımına dair çok fazla yayınlanmış veri yoktur³.

2.8.3. Oktakalsiyum Fosfat

Oktakalsiyum fosfat apatit kristallerin biyolojik bir öncülüdür ve canlı organizmalarda osteoblast ayrışımı ve olgunlaşmasına katkı sağladığı gösterilmiştir. Araştırmalar ayrıca göstermiştir ki HA ve BTCP ile kıyaslandığında OCP osteoblastların iskeleye bağlanmalarını artırma kapasitesine de sahiptir. Dahası, OCP/kolajen iskelelerin yalnız HA ya da BTCP veya HA/kolajen ya da

BTCP/kolajen iskelelerle kıyaslandığında, sıçan kafatası kusurlarında gelişmiş kemik oluşumunu yönlendirdiği belirtilmiştir. OCP iskelelerin bir diğer yararı ise, HA veya BTCP nin bir özelliği olmayan, osteoindüktif oluşudur³.

2.8.4. Kalsiyum Sülfat İskeleler

Paris alçısı olarak da bilinen kalsiyum sülfatın bağlantılı osteojenik hücreler ve kan damarlarının sarması için osteokondaktif bir alt katman olarak davrandığı düşünülür; bunun meydana gelmesi için, kalsiyum sülfatın canlı endosteum ya da periosteumla yakın etkileşimde olması bir zorunluluktur. Ayrıca, kalsiyum sülfat iskeleler osteoblastlar için mükemmel bir tutunma alanı olarak işlem görür ve nakilde herhangi bir kayda değer iltihaplanmaya (inflammation) sebep olmaz. Canlı doku olarak sıçan kafatası kusurlarında çalışmalar gerçekleştirildi ve gösterildi ki allojenik kemik matriksiyle birleştirildiğinde kalsiyum sülfat kemik oluşumunu artırmaktadır³.

2.9. Titanyum

Bir metal olarak Titanyum ticari olarak 1946'dan önce kullanıma girmemiştir. Titanyumun radyoopak oluşu ve operasyon sırasında şekillendirmenin zor oluşu nedeniyle beyin cerrahları metal olmayan maddelere yönelmiştir. Tomografinin kullanıma girmesinden önce metallerin radyoopak oluşu metallerin kraniyoplastide kullanımını sınırlayan en önemli faktör olmuştur⁴⁰.

2.10. Metil-Metakrilat

Otolog kemik grefti yokluğunda metilakrilat kraniyoplasti için en sık kullanılan alloplastik materyallerden biridir¹¹⁰. Akrilik doku reaksiyonu oluşturmaması sebebiyle kraniyoplastide kullanılmıştır. Akriliğin sertleşmeden önce istenilen şeklin verilebilmesi, hafif olması, ısı iletiminin daha az olması ve radyolüsent olması gibi üstün özellikleri mevcuttur^{39,40}.

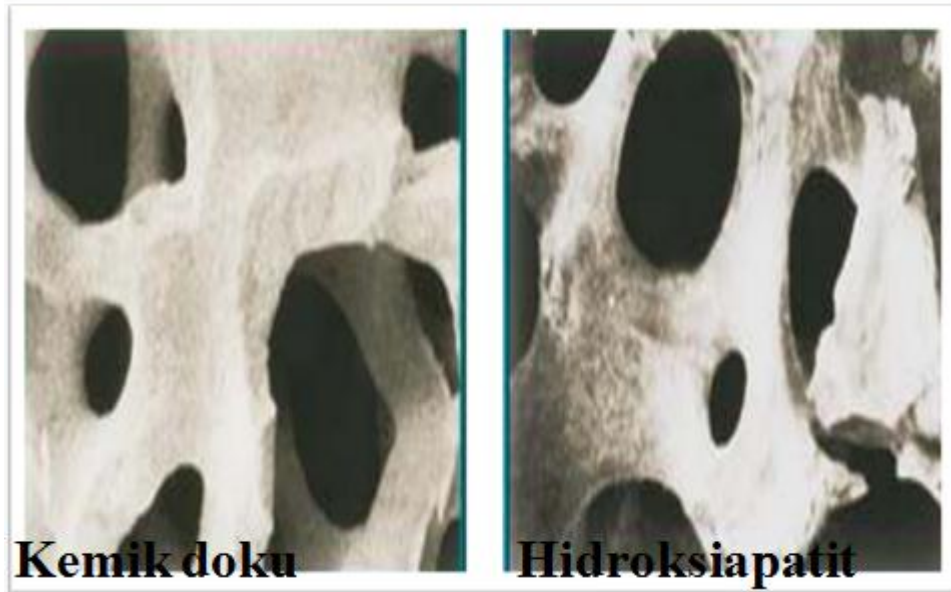
2.11. Medpor (Porous Polyethylene)

Medpor polietilen implant kozmetik kraniyoplastide sık kullanılan biyoyumlu esnek bir implanttır. Gözenekli yapısı, vaskülarite gelişmesini sağlar,

kemik ve yumuşak doku enfeksiyonu insidansını azaltmak için implantın gücünü artırır. İnsanlarda kullanımı uzun yıllar boyunca istikrarlı olarak kanıtlanmıştır¹⁰⁷.

2.12. Hidroksiapatit

$[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ biyouyumu en iyi olan seramiklerden biridir. Hidroksiapatit [HA] 1.67 olan Ca/P oranı ile mineralize insan kemiğine kimyasal olarak çok benzerdir⁷⁰. HA, çeşitli toz ve partikül formlarda kemik onarımı için yaygın olarak kullanılır. Mükemmel biyouyumluluk, biyoaktivite ve osteokondüksiyon özelliklerine sahiptir. Hidroksiapatit fizyolojik pH, fizyolojik sıcaklık ve sıvı bileşimi ortamlarında en kararlı kalsiyum fosfat bileşiğidir. HA, doğal mineralize kemiğe kimyasal benzerliğı nedeniyle yerleştirildiğı sert dokularda güçlü afinite sergiler (şekil 1).



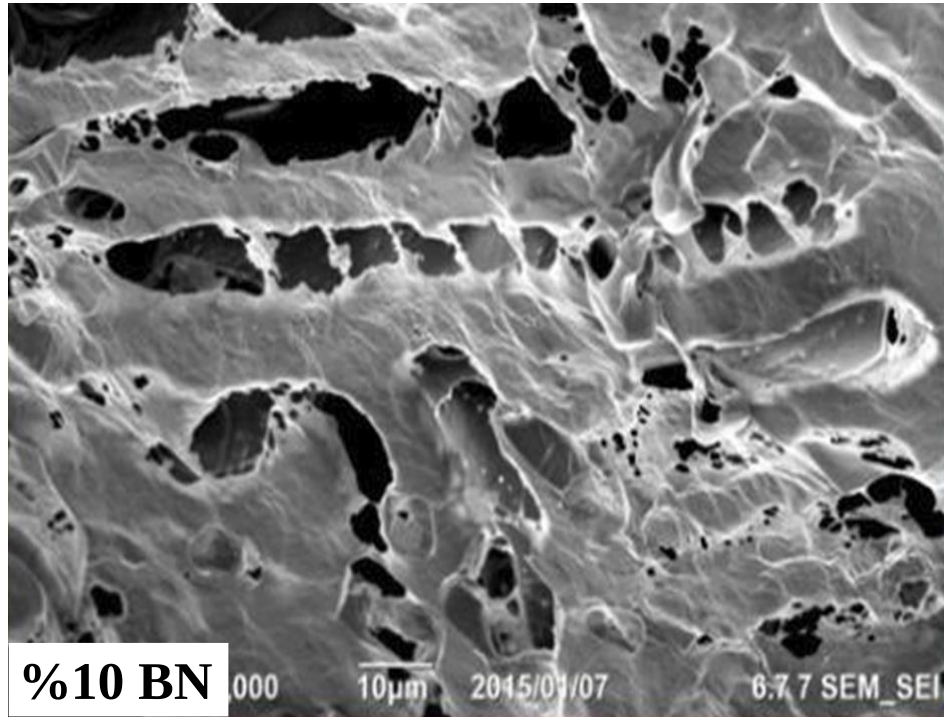
şekil 1. Kemik Doku ve Hidroksiapatit yapısı

Hidroksiapatit, osteokondüktif ve biyouyumlu olması sebebiyle *in vivo* olarak uygulanmasının hemen sonrasında inflamatuvar yanıt oluşturmaz. Operasyon sonrası görülen enfeksiyonların, HA ile doğrudan ilgili olduğı kanıtlanamamıştır⁷¹. Kemiğın seramik içine doğru ilerlemesi sırasında, gözenekli yapının yarık yüzeylerinde strese bağılı mikro kırıklar yarattığı bilinmektedir⁷². Yeni oluşan kırıklar seramiğın osteokondüktif yüzey miktarını artırır, kemik oluşumunun daha fazla HA içine

ilerlemesini sağlar ve bu bölgelerde HA ile kemik arasındaki bağlanmayı artırarak iyileşmeyi hızlandırır. Seramik içinde şekillenen mikro kırıklar mekanik olarak dayanıksızlık oluşturmak yerine, HA ile olan bağ yapısını kuvvetlendirir. Bu durum kemik gelişimi için istenilen bir özelliktir⁷³.

2.13. Bor Nitrür (BN) veya Boron Nitrit

Kendine has fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması nedeni ile biyomalzeme uygulamalarında tercih edilir. Grafite benzer hegzagonal yapıda, yoğunluğu düşük, ısı iletkenliği yüksek, kararlı kimyasal yapıda, kolay işlenilebilir ve toksik olmayan bir malzemedir⁷⁴(Şekil 2). Bornitrür uygulamalarının biyoyumluluğu test edilmiş ve toksik etkisi olmadığı gözlenmiştir⁷⁵.Yapılan çalışmalar bor'un kemik fonksiyonu, kemik büyümesi ve devamlılığını sağlamak açısından yararlı etkilere sahip olduğu göstermiştir⁷⁶. Bor eksikliğinin kemik büyümesi için olumsuz bir faktör olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır⁷⁷.



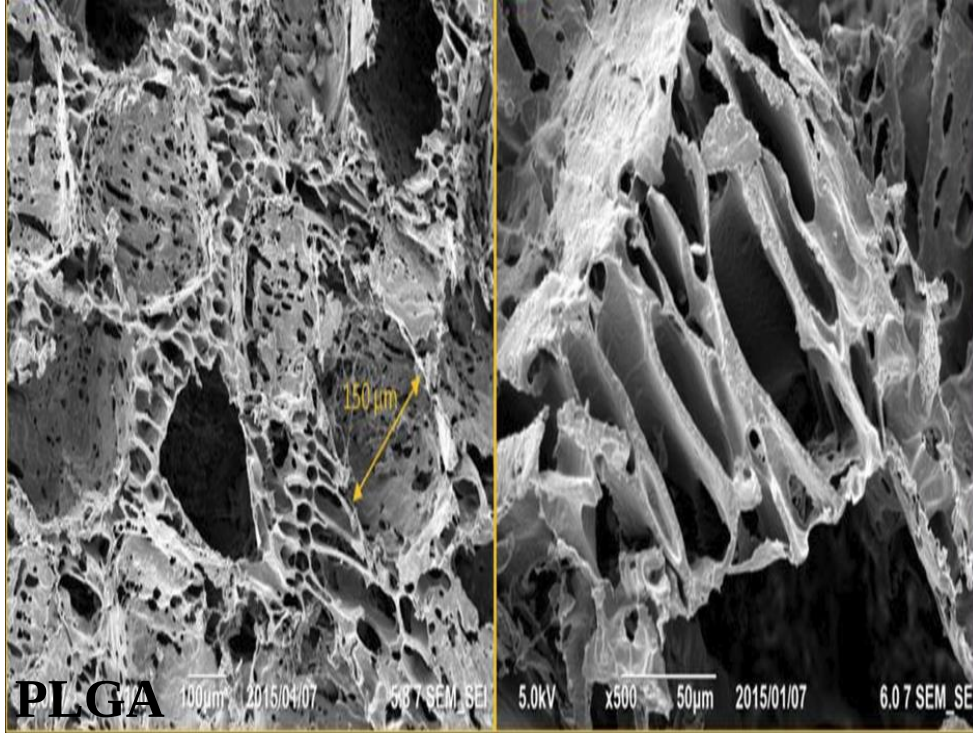
Şekil 2. %10 BN içeren HAp-PLGA Örnekleri Elektron Mikroskop Görüntüsü

Kompozit terimi birbirlerinin zayıf yönlerini düzelterek üstün özellikler elde etmek amacıyla bir araya getirilmiş değişik türden veya fazlardan oluşan malzemeler olarak tanımlanmaktadır⁷⁶. Yapılan laboratuvar ölçekli çalışmalarda hegzagonal bor

nitür (HBN) takviyeli HA kompozitlerin mekanik özelliklerin gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir⁷⁸. Hidroksiapatit (HA) içerisinde Bor nitür bulunmasının kemik hücrelerinin oluşumu ve hayatta kalması üzerine hiçbir olumsuz etkisi olmadığı belirtilmiştir⁷⁹.

2.14. PLGA

Kemik doku mühendisliğinde sentetik veya doğal scaffoldlar genellikle çeşitli polimer, biyoaktif camlar ve seramikler ile hazırlanmıştır³¹. FDA (U.S. Food and Drug Administration) scaffoldlar arasında poli-laktit ko-glycolide asit (PLGA) kullanımını da onaylamıştır. PLGA, sentetik bir polimer materyal olup, yapılmış olan in vivo ve in vitro kemik iyileşmesi çalışmalarında biyouyumluluk ve mekaniksel bakımdan çeşitli oranlarda arzu edilen iskele yapısını oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 3)^{32,33}. Ancak PLGA'nın laktik ve glikolik asit oluşumu gibi yan tesirleri meydana gelebileceği gibi bununla birlikte kemik iyileşmesinde uyumluluk ve biyogüvenilirliği bakımından deneysel ve klinik çalışmalarda yapılmıştır³⁴.



Şekil 3. Katkısız PLGA Örneğine ait İkincil Elektron Mikroskop Görüntüsü

PLGA iskelet yapısı, osteoblast veya mezenkimal kök hücre implantasyonu yapılarak kemik iyileşmesini teşvik eden önemli greft adayları

arasındadır. Ayrıca PLGA scaffoldlar, uygun bir kök hücre kaynağı kullanılarak kemik iyileşme süresini kısaltmak ve doku miktarını arttırmada kullanılabilecek önemli potansiyel greftler içerisinde yer almaktadır³⁵.

2.15. Pediyatrik Kullanım için Malzemeler

Titanyum implantlar, alloplastik, ve inorganik iskele materyalleri, pediyatrik hasta grubu için en uygun seçenek değildir. Bu hastalarda kafatası haznesinin daha fazla kemikleşmesi gerektiği için, otojen ve allojenik destekli kemikler, osteoentegrasyon ve pediyatrik kafatasının büyüme kapasitesi açısından daha uygun seçeneklerdir. Beyin cerrahları, plastik cerrahlar ve maksillofasiyal cerrahlar arasındaki görüş birliği; hibrid alloplastik materyaller kullanılarak pediyatrik hastalarda başarılı tedaviler gerçekleştirilmiştir³.

2.16. Antioksidan Enzimler

Oksidatif stresi oluşturan serbest radikaller orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Biyomolekülleri oksitleme yeteneklerinden dolayı bu moleküller oksidan veya pro-oksidan olarak isimlendirilirler^{74,75}. Orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahip olması nedeniyle, biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Bu özelliği nedeniyle oksijen diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerken, radikal olmayan maddelerle daha yavaş reaksiyona girmektedir. Oksijen atomu orbitallerindeki elektronların farklı dizilimi serbest radikallerin oluşumuna neden olur⁷⁶.

Biyolojik önemi olan bu reaktif oksijen türlerinin (ROS) en bilinen örnekleri arasında hidroksil (HO $\cdot$), süperoksit (O $_2^{\cdot-}$), peroksil (ROO $\cdot$), alkoksil (RO $\cdot$) ve nitrik oksit (NO $\cdot$) sayılabilir. Singlet oksijen (1O_2), ozon (O $_3$), hidrojen peroksit(H $_2O_2$) ve hipoklorik asit (HOCl) gibi radikal olmayan reaktif oksijen türleride vardır⁷⁵.

Reaktif oksijen türlerinin fizyolojik miktarları hücre fonksiyonları için gerekli iken fazlası nükleik asitler, lipitler, proteinler, doymamış yağ asitleri ve karbohidratlar gibi önemli biyomoleküllere zarar verebilir ve mutasyonlar oluşturarak DNA'da hasarlara sebep olurlar. Hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunması ve normal fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge korunmalıdır⁷⁵.

Serbest radikalleri oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen kaynaklar olmak üzere ikiye ayrılır. Endojen kaynaklar; Elektron Transport Zinciri, oto-oksidasyon reaksiyonlar, ksantin oksidaz, galaktoz oksidaz, lipooksigenaz gibi oksidan enzimler ve fagosit hücreleridir. Eksojen kaynaklar arasında; ilaç oksidasyonları, radyasyon, ozon, X-ışınları, UV-ışınları, sigara dumanı, egzoz gazları ve kükürtdioksit yer alır⁷⁷. Ekzojen yada endojen kaynaklar aracılığıyla oluşan O₂ kaynaklı reaktif ürünler vücudun antioksidan savunma sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) tarafından zararsızlaştırılır⁷⁵.

Ekzojen veya endojen kaynaklı serbest radikallerin en belirgin etkileri, yağ asitleri üzerine etki ederek lipid peroksidasyonunu başlatmalarıdır. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarları geri dönüşümsüzdür. Ayrıca geçiş metalleri katalizörlüğünde lipid hidroperoksitlerinin, yıkılması ile zararlı aldehitler oluşur. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir. Bu sayede malondialdehit ölçümü ile lipid peroksidasyonunun (LPO) değerlendirilmesi yapılabilmektedir^{75, 78}. Proteinler ise lipitlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler.

Antioksidan enzimler arasında yer alan **Süperoksit dismutaz (SOD)**, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. SOD enziminin fagositozla hücre içine alınan bakterilerin etkisiz hale getirilmesinde önemli rolü vardır. Bu sebeple granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. SOD yüksek katalitik aktivitesiyle hücrelerde süper oksit birikmesine izin vermez. Böylece lipid peroksidasyonunu da inhibe eder. Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar. Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde aktivitesi yüksek bir enzimdir. Katalaz normal koşullar altında hücre için gerekli olmasada hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında önemli bir rol oynar. Hidrojen peroksiti hücreden çıkmadan ve oksijene dönüşmeden yakalar. Bu yolla kimyasal indirgemeler ve toksinlerle direkt etkileşim için O₂ konsantrasyonunu korur⁷⁹. **Glutatyon (GSH)**, birçok hücrede bulunur. Çalışmalar, oksidatif strese maruz kalan hayvanlarda GSH aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir⁸⁰. Glutatyon Redüktaz, glutatyon disülfid (GSSG) 'in redükte formuna (GSH) indirgenmesini

katalizler. Glutasyon Peroksidaz (GSH P_x), hidrojen peroksiti indirgeyerek hücrel antioksidan savunma sisteminde önemli bir rol oynar.

Çevresel faktörler, vücuda alınan çeşitli kimyasal bileşikler, çeşitli enfeksiyonlar ve doku travmaları radikallerin artışına neden olurlar⁸⁷. Doku hasarına neden olan reaktif oksijen türlerinin üretimi, oksidatif strese neden oldukları için oksidatif olaylar zinciri olarak adlandırılır. Kemik dokuda oluşan kırık sonrasında oksidatif stres artmaktadır^{82, 83}.

2.17. Deneysel Kafa Travma Modelleri

Travmatik beyin hasarında hayvan modelleri kullanılmasının amacı fizyopatolojik incelemelerin veya tedavi seçeneklerinin tekrarlanabilirliğinin sağlanmasıdır⁸⁴. Yapılacak araştırma hipotezindeki beklentiler doğrultusunda model seçimi yapılmaktadır. Geçmiş yıllardaki araştırmalarda kullanılan travma modelleri, beyin hasarının biyomekanik incelenmesinde yeterli iken, günümüzde kullanılan modeller moleküler düzeyde incelemelere imkan verecek şekilde dizayn edilmektedir⁸⁵.

Seçilen modelin yapılacak çalışmaya göre;

- hasarı indüklemek için kullanılan mekanik kuvvete karşı kontrollü, tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasına,
- yapılan hasarın insanlardaki travmatik hasara benzerlik göstermesine,
- hasar sonucu fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal veya davranışsal parametrelerin hasara neden olan mekanik kuvvet ile orantılı olmasına,
- uygulanan mekanik kuvvetin oluşturabileceği patofizyolojik bozuklukların tahmin edilebilir olmasına dikkat edilmelidir⁸⁶.

2.18. Canlı Organizma Hayvan Modellerinde Kafatası Defektleri

Kritik boyuttaki kafatası defektlerini iyileştirmek için canlı organizmalarda kemik oluşumu aktif bir araştırma alanıdır³ (Tablo1).

Tablo 1. Günümüzde Kullanılan Hayvan Modellerinin Özellikleri

Hayvan modeli	Avantaj	Dezavantaj
Fare	Küçük boyut, kolay bakım, düşük maliyet	Küçük boyut, cerrahi işlem zorluğu
Sıçan	Fareye göre; büyük, uygun maliyet, cerrahi işlem kolaylığı	Fare modeline benzer ama daha pahalı
Tavşan	Sıçana göre; büyük, cerrahi işlem kolaylığı	Sıçana göre; daha pahalı
Maymun	İnsanlara çok yakın bu yüzden en aktarılabilir model	Pahalı, etik endişeler
Köpek	Cerrahi işlem kolaylığı	Pahalı, etik endişeler
Koyun	Cerrahi işlem kolaylığı	Pahalı, etik endişeler

2.19. Küçük Hayvan Modelleri

Fare, günümüzde temel bilimsel araştırmalarda bakım kolaylığı ve düşük maliyeti yüzünden en yaygın kullanılan hayvan modelidir. Buna ilaveten, gelişmiş moleküler ve hücresel biyoloji analitik gereçler hazırda mevcuttur ve yüksek oranda tekrar elde edilebilir sonuçlar üretmektedir. Farede, kritik boyuttaki kafatası defekti, 5mm veya daha büyük olarak tanımlanır. Genelde, bu tür bir defekt farenin kafatasında yuvarlak dairesel testere kullanılarak oluşturulur. Bu modeli kullanmanın zorluğu farenin küçük boyutlu olmasıdır. Beyin zarı, dura mater ve kafatasının üst kısmının yakın ilişkisi sebebiyle, durayı muhafaza edecek bir kranyotomi teknik olarak zordur. Dura materi muhafaza etmek önemlidir çünkü bazı araştırmalar göstermiştir ki dura kafatasının kemiksel oluşumunda etkilidir³.

2003'te Aalami ve arkadaşları; bebek farede(6 günlük) yetişkinlerdekine(60 günlük) oranla önemli düzeyde daha büyük bir kafatası defekti iyileştirildiğini bildirmiştir. Bu prosedürlerde yazarlar dura materi muhafaza etmede özellikle dikkatli davranmışlardır. Evvelki çalışmalar göstermişti ki bebek fareler kritik boyuttaki kusurları doğal yolla tedavi etme kapasitesine sahip olmalarına rağmen, bu yetenek, dura materin kötüleştirilmesi halinde, devre dışı kaldığı söylenmektedir. Dura materin kemik iyileşmesinde etkili olduğu gözleminin daha ileri bir destekleyicisi şu bulgu ki yetişkin kobaylardaki kritik boyuttaki kemiksel kusurlar yetiştikine, bebek kobaylardan alınan dura materin allotransplantasyonu

giderilebildiği bildirilmiştir. Dura materi muhafaza etmek için farelerdeki kranyotomiler kesme mikroskopi yardımıyla gerçekleştirilmelidir³.

Kritik boyuttaki kafatası defektleri için yaygın olarak kullanılan bir diğer hayvan modeli de sıçanlardır. Sıçanda, kritik boyuttaki kafatası defektleri 8mm veya daha büyük çaplı olarak tanımlanır. 1982’de Takagi ve Urist gösterdi ki Sprague-Dawley sıçanlarındaki 8 mm çapındaki kafatası defektleri dört haftaya kadar 5mm iyileşti ve 12 haftaya kadar başka bir iyileşme kaydedilmedi. Daha küçük bir hayvan yerine sıçanların kullanılmasının faydaları, daha geniş olan boyutları ve bunun sonucu olarak kişinin teknik olarak daha sağlam kranyotomiler gerçekleştirmesinin sağlanmış olmasıdır³.

2.20. Daha Büyük Hayvan Modelleri

Daha büyük hayvan modelleri kullanmanın en önemli yararı daha büyük bir boyutun operasyon esnasında sağladığı daha yüksek kontrol ve kesinliktir. Tavşan, kobay, köpek, koyun, ve maymun cerrahi bölgede daha fazla kontrol imkanı sağlamaktadır. Diğer taraftansa, bu hayvanların alınması ve bakımı daha pahalıdır ve ayrıca fazla yer kaplamaktadırlar³.

Kritik boyuttaki kafatası defektleri ile ilgili ilk çalışmalar 1899 yılında, tavşanlardaki dura mater varlığının kafatasında kemiksel iyileşmenin gerçekleşmesi için gerekli olduğunu rapor eden Berezowsky tarafından yapılmıştır. Tavşanlarda kritik boyuttaki defekt 15 mm veya daha büyüktür. Kritik boyuttaki defektleri incelemek için literatürde diğer büyük hayvanlar da belirtilmiştir. Örneğin, köpekler de kritik boyuttaki kafatası defekti 20 mm çapındadır. Son zamanlarda, maymunlar gibi primatlar (15mm) ve koyunlar da kritik boyuttaki kafatası defektlerini incelemek için kullanılmaktadırlar³.

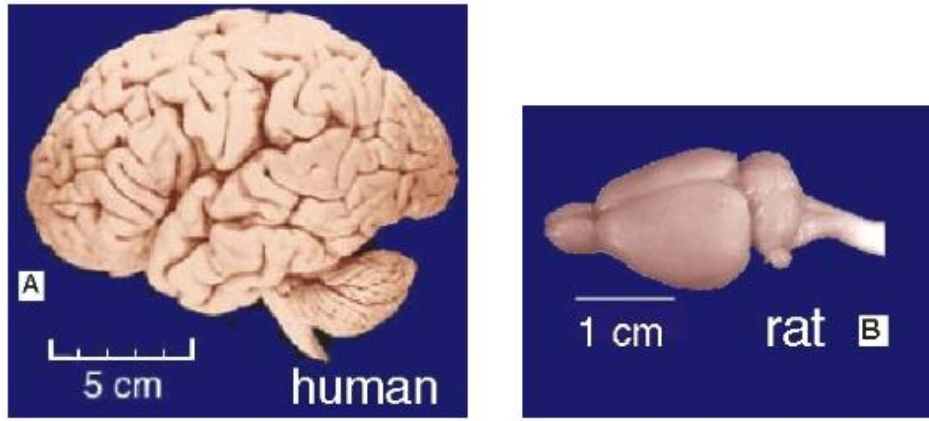
2.21. Ratlarda Beyin Anatomisi

İnsanlarda olduğu gibiratlarda da beyin; ön beyin (prosencefalon-forebrain), orta beyin (mesencefalon- midbrain) ve arka beyin (rhombencefalon-hindbrain) oluşturacak şekilde bölümlere ayrılır. Beynin en büyük kısmı olan ön beyin, diensefalon ve telensefalon olarak iki alt bölümde incelenir. İki büyük serebral hemisferden oluşan telensefalon beynin en büyük kısmını oluşturur. En dikkat çeken

iki özelliği; lisencephalos (gyrus ve sulcuslar bulunmaz), yani kıvrımları olmayan düz yapıda olması ve bulbus olfactoriusların oldukça büyük olmasıdır. Kortikal gri maddemiktari ise çok azdır. Ratlarda optic chiasma beyin tabanında bulbus olfactoriusların hemen caudalinde bulunur^{87,88}.

Serebellum bol kıvrımlıdır. Orta lob, ortanın iki yanında birer yan lob ve bunların dış yanlarında yer alan parafloküler loblar olarak 5 ayrı bölümden oluşur. Parafloküler loblar kemirgenlere has bir özelliktir ve içine yerleştiği periotik kapsül petros kemiğin uzantısıdır (Şekil 4)⁸⁸.

Beyin ventrikülleri insandakine benzerdir. İnsanlarda olduğu gibi 12 çift cranial sinirleri vardır⁸⁸.



Şekil 4 A: İnsan beyin yapısı; gyrus ve sulcuslar belirgin

Şekil 4 B: Rat beyin yapısı; tipik olan lisencephaloz görülmekte ve beynin ön bölümünde belirgin halde görülen bulbus olfactoriuslar

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan kafatası defektlerinin postoperatif dönemde tüm gruplardaki oksidatif stres düzeyleri biyokimyasal olarak ölçüldü ve doku değişiklikleri histomorfolojik olarak incelendi. Elde edilen biyokimyasal ve histomorfolojik bulgular eşliğinde kullanılan greftlerin uzun dönemde beyin parankimi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

3. GEREÇ-YÖNTEM

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji, Histoloji ve Embriyoloji, Patoloji Anabilim Dalları Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Mikroskopik incelemeler Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bir Histolog ve bir Patolog tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hayvan Seçimi ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) bünyesindeki deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen daha önce üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış, sağlıklı olduğu bilinen ve ağırlıkları 250-280 gram arasında değişen toplam 60 adet Albino Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney süresince, sıçanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu, Standart Sıçan Yemi) verildi. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde laboratuvarında normal oda sıcaklığında (22 °C) barındırıldı ve beslendi. Çalışmamızın tüm aşamalarının Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 28.11.2014 tarih ve 8 sayılı yazısı ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının 20.11.2014 tarih ve 421909-01-02=5550 sayılı kararları ile etik kurallara uygun olduğu onaylandı.

Her biri 10 adet hayvandan oluşan kontrol grubu ile birlikte 6 ayrı gruptan oluşan toplam 60 adet sıçan çalışmaya alındı (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışma grupları

Gruplar	Hayvan sayısı	Tedavi	Doz
I	10	Kontrol	-
II	10	Defekt	-
III	10	Defekt+Otogreft	-
IV	10	Defekt+%10 HA	%10 HA
V	10	Defekt+%10 BN	%10 BN
VI	10	Defekt+PLGA	

3.2. Kranioplasti İçin Kullanılacak Scaffold Materyal Hazırlanması

Eskişehir Üniversitesi Nanoteknoloji Mühendisliği ve Sabancı Üniversitesi Laboratuvarında üretilen scaffold materyali temin edildi. Mevcut scaffold materyali hayvanlarda açılan kraniektomi alanı büyüklüğüne göre tarafımızca hazırlandı.

3.2.1. PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid)] İskelesinin (Taşıyıcı) Yapımı

Elekler yardımıyla 212 ve 425 µm çapında sodyum klorür (NaCl) parçacıkları elde edildi. %12 PLGA/ 1,4-dioksan çözeltisi gruplarda belirlenen oranlarda hazırlanan Bor Nitrür ve Hidroksiapatit oranında karıştırılarak 1 saat boyunca 45°C’ de sonikasyon yapıldı. Hazırlanan çözeltiler 1: 10 oranında PLGA/NaCl olacak şekilde tuz ile karıştırıldıktan teflon kalıplar içerisine dökülerek -20°C de 1 saat inkübe edildi.

Daha sonra örnekler 2 gün süre ile freeze-dry yapıldıktan sonra saf su içerisine atılarak tuzun çözünmesi sağlandı. Her 6 saatte bir suyu değiştirilen örnekler 2 gün sonra -80°C de dondurulduktan sonra 2 gün daha freeze-dry edildi. Deney numuneleri -80°C’ de deney gününe kadar saklandı.

3.2.2. Sol-Jel Yöntemiyle HA Elde Edilmesi

Çalışmada kalsiyum ve fosfor bileşenleri olarak kalsiyum nitrat tetra hidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (Merck) ®, %99) ve amonyum dihidrojen fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, (Sigma Aldrich ®), %99) seçilerek solüsyona pH ayarı için amonyak (NH_3 , (Merck) ®) eklendi. Kalsiyum öncü bileşeni etil alkolle ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, (Merck) ®) hazırlanırken fosfor bileşeninin hazırlanmasında ultra saf su kullanıldı.

Uygulanan yöntemde amonyum dihidrojen fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) ve kalsiyum nitrat tetra hidratın ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) başlangıç çözeltileri $\text{Ca/P} = 1.67$ olacak şekilde hazırlanDI. Her bir çözeltinin pH’sı NH_3 ile 10’a ayarlandıktan sonra kalsiyum çözeltisi fosfat çözeltisine bir peristaltik pompa ile 3 mL.dk⁻¹’lık hızla ilave edilirken, süspansiyon bir mekanik karıştırıcı ile 600 rpm’de karıştırılarak homojenlik sağlanmıştır. Yaşlandırma süresi sonunda ortamda bulunan NO_3^- ve NH_4^+ iyonlarını uzaklaştırmak için santrifüjleme sonrası ultra saf su ile yıkama yapılmış olup süzme işlemini takiben yapılan kurutma sonucu nano boyutlu HA üretilmiştir.

3.2.3. Trikalsiyum fosfat (TCP)–Hekzagonal Bor Nitrür Kompozitlerinin Elde Edilmesi

Uygun bileşimdeki kompozitlerinin hazırlanmasında TCP(tri kalsiyum fosfat) tozları kullanıldı. Yapılan çalışmada tozlar agat havanda uygun tane boyutuna getirildikten sonra plastik değirmende zirkonyabilya kullanılarak sulu ortamda karıştırıldı. Çalışma sırasında değişik porozite oluşturmak amacıyla farklı oranlarda PVA (polyvinilalkol) kullanıldı. Standart TCP ve TCP-hBN kompozit kompozisyonları bilyalı değirmende hazırlandı. Hazırlanan çamurlar etüvde 24 saat kurutulduktan sonra halkalı değirmende 3 dakika süre ile öğütüldü. Tozların ısı özellikleri DSC cihazında belirlendi. Tozların şekillendirilmesinde tek eksenli el presi kullanıldı. Tozlar 17 mm çapa sahip çelik kalıplar kullanılarak 500 psi yük altında pelet haline getirildi. Şekillendirilen numuneler, etüvde 24 saat bekletildikten sonra 600°C’de bağlayıcı uzaklaştırma işlemine tabi tutuldu.

Numunelerin ısı işlemleri 900-1000-1100-1200°C’de olmak üzere dört ayrı sıcaklıkta gerçekleştirildi. Numunelerin boyut küçülmeleri hesaplanarak yoğunlukları Archimedes prensibine göre ölçülüp görünür poroziteleri hesaplandı. Numunelerin görüntü analizleri SEM (taramalı elektron mikroskobu) cihazında gerçekleştirildi. XRD analizleri numuneler öğütüldükten sonra Rigaku Rint 2000 x- ışınları difraktometresinde 2°/dk hız ile 10-70° 2θ açıları arasında CuKα x-ışını ile gerçekleştirildi.

Numunelerin karakterizasyonu sonrasında elde edilen porozite miktarlarına ve yoğunluk değerlerine göre en uygun materyal ve ısı işlem sıcaklıkları belirlendi.

3.2.4. Bor Nitrür ve Hidroksiapatit Emdirilmiş Scaffold Malzeme Karakterizasyonu

Kompozit malzemeler yapısal ve morfolojik olarak karakterize edildi. Yapısal karakterizasyonda Raman Spektroskopisi tekniği kullanılırken, morfolojik incelemede ise Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) tekniğinden yararlanılmıştır.

3.3 . Kraniyotomi ve Kraniyoplasti Aşamaları

Preoperatif analjezi için i.m Metamizol sodyum 30 mg/kg dozunda uygulandıktan sonra ratların anestezi altında kafalarının parietal bölgesi tıraşlanarak poliviniliode ile temizlendi(Resim 1).



Resim 1. Saçlı derinin %10 luk polivinil iodine ile sterilizasyonu

Hayvanlara anestezi içi 50 mg/kg ksilazin ve 70mg/kg ketamin karışımı intraperitoneal olarak uygulandı. Daha sonra bistüri yardımı ile frontoparyetal cilt insizyonu yapılarak parietal kemiğe ulaşıldı(Resim 2).



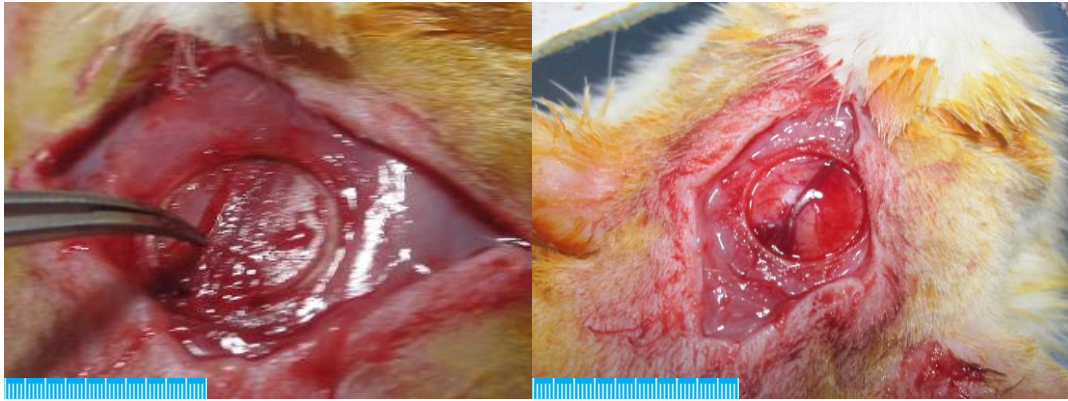
Resim 2: Frontooksipital cilt insizyonu ile cilt flebinin diseksiyonu

Parietal kemiğin merkezinden 8 mm çapında trepanfrez yardımı ile kraniotomi yapıldı(Resim 3).



Resim 3: Kraniyuma 8 mm çapında trepanfrez yardımı ile kraniotomi yapılması

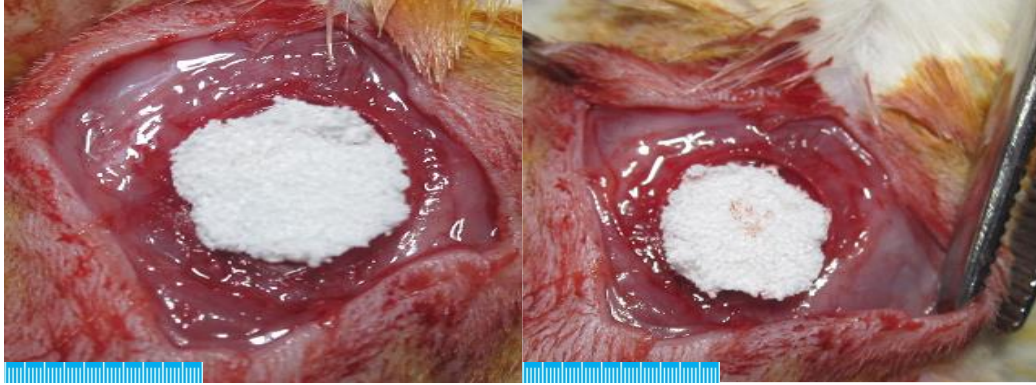
Daha sonra bikortikal kraniyal kemik dura üzerinden kaldırıldı (Resim 4- 5)



Resim 4-5: 8 mm çapında bikotikal kraniyal kemiğin dura üzerinden kaldırılması

İşlem sırasında cerrahi bölge izotonik ile sürekli olarak yıkandı. Kontrol grubunda yer alan hayvanlara herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. Defekt grubuna kraniotomi defekti oluşturulup herhangi bir implant yerleştirilmeden cilt ile

kapatıldı. Diğer gruplarda ise Bor nitrür (BN)/Hidroksiapatit (HA) / Poly lactic –co-glycolic acid (PLGA) emdirilmiş scaffoldlar yerleştirildi (Resim 6-7-8).



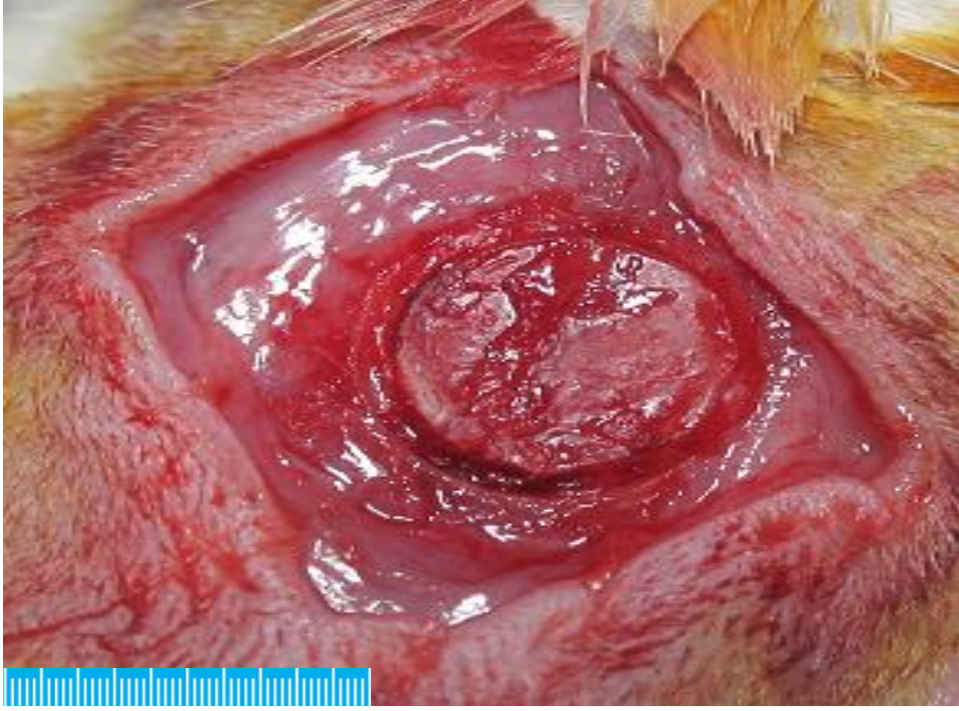
Resim 6: Kraniyotomi defektine BN emdirilmiş scaffold yerleştirilmesi

Resim 7: Kraniyotomi defektine HA emdirilmiş scaffold yerleştirilmesi



Resim 8: Kraniyotomi defektine PLGA emdirilmiş scaffold yerleştirilmesi

Son grupta (Defekt otogreft grubu) ise kraniyotomi defekti kendi kemikleri yerleştirilerek otogreftle kapatıldı (Şekil 9).



Resim 9: Kraniyotomi defektine otogreft yerleştirilmesi

Cilt 2/0 ipek s  t  rle primer kapatıldı. Postop analjezi ve enfeksiyonu   nlemek i  in; Metamizol sodyum 30 mg/kg ve Sefazolin sodyum 20 mg/kg dozunda 3 g  n boyunca i.m uygulandı. Ratlar 1 ay boyunca iyile  meye bırakıldı.

3.4 Histomorfolojik ve Biyokimyasal Analizler İçin Materyal Elde Edilmesi

Tüm gruplar 4 hafta takipten sonra yüksek doz tiopental (50 mg/kg) ile sakrifiye edilerek çalışma sonlandırıldı. Gruplardaki hayvanların kalvarial kemikleri implant ile beraber çıkarıldı. Biyokimyasal analiz için lezyon alanından beyin dokusu alındı ve çalışma öncesi -80°C’de dondurucuda korumaya bırakıldı. Histopatolojik inceleme için araknoid mater, piamater, gri ve beyaz cevher içeren beyin dokusu örnekleri alındı. Histopatolojik çalışma için ayrılan örnekler % 10'luk nötral formaldehit solusyonuna konularak fiksasyon işlemine bırakıldı. Kullanılan greftlerin duramatere yapışık olmasından dolayı duramater dokusu örneklenemedi.

3.5. Histopatolojik analizler

3.5.1. Doku Takip İşlemleri

Çalışma gurubunda yer alan deneklerden beyin zarları ile beyaz ve gri cevher içeren beyin örnekleri doku takip kasetlerine alınarak takip işlemine başlandı.

Akarsuda yıkama: Dokular 1 saat süresince akar musluk suyunda yıkandı.

Dehidratasyon işlemi: Yıkama sonrası dokular dehidratasyon işlemi için;

- %50’lik Etil Alkol solüsyonunda 20 dk,
- %60’lik Etil Alkol solüsyonunda 20 dk,
- %70’lik Etil Alkol solüsyonunda 20 dk,
- %80’lik Etil Alkol solüsyonunda 20 dk,
- %90’lık Etil Alkol solüsyonunda 1 saat,
- %100’lük Etil Alkol solüsyonunda 1 saat,
- %100’lük Etil Alkol solüsyonunda 1 saat
- alkol serilerinde belirtilen sürelerde takip edildi.

Şeffaflandırma (Temizleme) işlemi: Dehidratasyon işlemi sonrası dokular;

- 1/1 oranında karıştırılmış %99,5’lik Ksilen (Merck) ® / % 96’lık Etil Alkol’den elde edilmiş solusyonda 15 dk,
- %99,5’lik Ksilen solusyonunda 75 dk süresince bekletildi.

İnfiltrasyon işlemi (Sertleştirme): Şeffaflandırma işlemi sonrası dokular;

- -Ksilen + boncuk parafin (Merck) ® karışımında 60°C'lik etüvde 1 saat,
- -Boncuk parafinde 60 °C'lik etüvde 1 saat,
- -Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 2 saat
- süre boyunca bekletildi.

3.5.2. Gömme işlemi:

İnfiltrasyon işlemi sonrası sertleştirilen dokular bloğun ortasına gelecek şekilde 58-60 derecede eritilmiş parafin içine gömüldü. Dokular gömüldükten sonra parafin hızlı bir şekilde soğutularak kristal yapısına dönmesi sağlandı ve gömme işlemi sonlandırıldı.

3.5.3. Kesit Alma İşlemi

Elde edilen parafin bloklara gömülü bulunan dokular buz dolabında +4 derecede soğutuldu. Buz kalıpları üzerine alınan parafin bloklar Leica RM2125RT mikrotom cihazı ile 5 µm kalınlığında kesilerek sıcak su banyosu yardımı ile lam üzerine alındı.

3.5.4. Deparafinizasyon İşlemi

Lamlara alınan doku kesitleri sepetlere yerleştirilip 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilerek parafinden arındırılması sağlandı. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için 10'ar dakika 2 ayrı ksilen solusyonunda bekletilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı.

3.5.5. Boyama-Kapama İşlemleri

Deparafinizasyon işlemi biten doku kesitleri;

- % 95'lik Etil Alkol solüsyonunda 2 dk,
- % 80'lik Etil Alkol solüsyonunda 2 dk,
- % 70'lik Etil Alkol solüsyonunda 2 dk,
- % 60'lik Etil Alkol solüsyonunda 2 dk,
- Çeşme suyunda yıkama 5 dk,
- Hematoksilen (Merck) ® boya solusyonunda 5 dk,

- Asit alkol soluyonunda 1-3 sn,
- Çeşme suyunda yıkama 5 dk,
- Eosin (Merck) ® boya solusyonunda 3 dk,
- Çeşme suyunda yıkama 5 dk,
- % 96'lık Etil Alkol solüsyonunda 10 dk,
- % 99,5'lik ksilen solusyonda 20 dk,
- % 99,5'lik ksilen solusyonda 20 dk,
- % 99,5'lik ksilen solusyonda 20 dk

Sürelerinde takip edilerek boyama işlemi tamamlanan kesitler üzerine entellan (Merck) ® damlatılarak kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

3.5.6. Kesitlerin Değerlendirilmesi ve Fotoğraf Çekimi

Elde edilen Hematoksilen-Eosin (H&E) boyalı prepratların mikroskopik değerlendirilmesi Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında Olympus BH 40 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında yapıldı ve fotoğraflandı.

Morfolojik incelemede araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapıları değerlendirildi.

Subaraknoidal mesafede oluşan dilatasyon için;

Piamater ve araknoid mater arası genişlik % 10'dan az ise olağan, %10-25 ise hafif, %26-50 ise orta, % 51 ve üzeri ise şiddetli olarak değerlendirildi.

Apopitotik nöron için;

Parankim içinde 10 büyük büyütme alanında (BBA) tespit edilen apopitotik nöron hiç yoksa olağan, 1-2 ise hafif, 3-5 ise orta, 6 ve üzeri ise şiddetli olarak değerlendirildi.

Subaraknoidal mesafede tespit edilen inflamatuvar hücreler (makrofaj, nötrofil, lenfosit) için;

Subaraknoidal mesafede 10 büyük büyütme alanında (BBA) tespit edilen inflamatuvar hücreler (makrofaj, nötrofil, lenfosit) 1-2 ise olağan, 3-5 ise hafif, 6-8 ise orta, 9 ve üzeri ise şiddetli olarak değerlendirildi.^{36,111}

Histopatolojik incelemede morfolojik bulgular şiddetine göre;

- ✓ Olağan morfolojik bulgular: 0,
- ✓ Hafif şiddette lezyon: 1,
- ✓ Orta şiddette lezyon: 2,
- ✓ Şiddetli lezyon: 3 şeklinde skorlandı.

3.6. Biyokimyasal Çalışmalar

3.6.1 Süpernatant Hazırlanması

Her hayvandan elde edilen ve 100 µg beyin dokusu spesifik homojenat tamponunda, buz üzerinde Tissue Lyser ile homojenize edildi. Daha sonra kit protokollerine uygun olarak santrifüje edildi. Hazırlanan her süpernatanttan enzim seviyeleri özellikle rat dokusu için dizayn edilmiş yüksek hassasiyetteki kitler ile ölçüldü. Ayrıca uygun tampon ile homojenize edilmiş tüm beyin süpernatantlarında bütün dotalar her miligram protein için ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi.

Protein konsantrasyonları ticari protein standartları kullanılarak Lowry metodu ile tespit edildi (SigmaAldrich, Total protein kit-TP0300-1KT-USA).

3.6.2. SüperoksitDismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini

Süperoksid Dismutaz Assay (Cayman ® Chemical Superoxide Dismutase Assay Kit Item Number 706002) kiti kullanıldı. Bu metotta, ksantin/ksantinoksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri Tetrazolium'u indirgeyerek renkli formazon oluşturuldu. Bu kompleksin 560 nm'de maksimum absorbans vermesi sağlandı. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturdu. Ortamda SOD olduğunda ise Tetrazolium indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluştu, buna bağlı aktivite hesabı yapıldı.

Doku homojenizasyonu;

- Dokular kırmızı kan hücresi ve kan pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkandı.
- Sıvı azot altında dokular homojenize edildi.

➤ Dokular 70 mM süktroz, 210 mM mannitol ve 1 mM EGTA içeren pH'sı 7,2 olan doku başına 1 ml soğuk HEPES buffer ile ultra turrax homojenizatörde buz üstünde 1 dakika boyunca homojenize edildi.

➤ Tüm numuneler işlem bitene kadar + 4 derecede muhafaza edildi.

➤ +4 derecede 1,500 xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.

➤ Süpernatant kısmı ayrıştırılarak ölçüm yapıldı

SOD Enzim Düzey Ölçümü

➤ Çalışma 96 kuyucuklu platelerde gerçekleştirildi.

➤ Örnek kuyularına 20 µL örnek ve 20 µL Standart eklendi.

➤ 200 µL seyreltilmiş radikal detektör tüm kuyulara eklendi ve 10 dk. karıştırıcıya konuldu.

➤ Reaksiyonu başlatmak için 20 µL seyreltilmiş Xantin Oksidaz eklendi.

➤ Birkaç saniye plate'in üstü kapalı şekilde çalkalayıcıda bekletildi.

➤ Oda sıcaklığında 20dk boyunca inkübe edildikten sonra 460 nm'de Elisa okuyucuda

➤ okutuldu.

SOD Aktivitesinin Hesaplanması:

% İnhibisyon= $(A_K - A_N) / A_K \times 100$ formülü ile hesaplandı.

A_K : Kör absorbansı

A_N : Numune absorbansı

%50'lik inhibisyona 1 U denildiği için

Aktivite (U/mL)= $[(\% \text{ inhibisyon} / 50) \times (1 / 0.1)]$ mL

Spesifik aktivite (U/ mg protein)= $[U / \text{mL} / \text{mg} / \text{mL protein}]$. Sonuçlar, U/mg protein olarak ifade edildi.

3.6.3. Total Glutasyon (GSSG/GSH) Enzim Aktivite Tayini

Total glutasyon (Cell Biolabs OxiSelect™ Total Glutathione (GSSG/GSH) Assay Kit STA-312) kiti ile ölçüm yapıldı. GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizlendi. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px 'in oluşturduğu

GSSG, glutatyonredüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgendir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ınNADP'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalması 405 nm'de okunmasıyla hesaplama yapıldı.

Enzim ünitesi; birim zamanda okside olan mikromol NADPH miktarıdır.

Deneyin yapılışı: Dalga boyu 405 nm'ye ayarlanan Elisa cihazında numunelerin absorbans değerleri 10 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

Doku homojenizasyonu:

- Dokular kırmızı kan hücresi ve kan pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkandı.
- Sıvı azot altında dokularımızı homejenize edildi.
- Sonra 1 ml MPA çözeltisi (5 gr MPA kristalleri 100 mL deiyonize suda çözülür) eklenerek ve Ultra Turraxhomojenizatörde 1 dakika buzda homojenize edildi.

GSH-Px Enzim Düzey Ölçümü

- Homojenize numuneler 15 dakika + 4°C' de 12000 Rpm' de santrifüje edilip süpernatantları ölçüm için toplandı.
- 96 kuyuluk plate'e 25 µL 1X glutatyon redüktaz her bir kuyuya eklendi. 1X NADPH solüsyonundan 25 µL her kuyuya eklendi.
- Hazırlanan glutatyon standartlarından veya örneklerden 190 µL her kuyuya eklendi. Plate okuyucu kinetik ölçüm için 405 nm' de okumaya ayarlandı. 1X kromojenden 50 µL eklendi ve karıştırıldı. Hızlı bir şekilde 10 dk boyunca 1 dk aralıklarla 405 nm' de absorbans okundu.

GSH-Px aktivitesinin hesaplanması:

$IU/L = [(AA/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1/0.02)$ formülü ile hesaplandı.

Spesifik aktivite IU/L mg protein = (IU/L) / (1000 x W)

W: gram protein miktarı

3.6.4. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktar Tayini

Tiyobarbitürik asit Assay kiti (Cell Biolabs OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) STA-330) ile ölçüm yapıldı. En çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 90-95°C’de reaksiyona giren malondialdehit (MDA) ile diğer TBARS pembe renkli kromojen meydana getirdi. 15 dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan numunelerin absorbansları 532 nm’de spektrofotometrik olarak okundu.

Doku homojenizasyonu;

- Dokular kırmızı kan hücresi ve kan pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkandı
- Dokularımız daha sonra sıvı azot altında homojenize edildi.
- Homojenize dokulardan 100’er µg tartılarak tüplere konuldu. Her tüpe hazırladığımız 1X BHT in PBS solüsyonundan 1 mL eklendi.
- Tüpler buz içine konularak homojenizatörde 30 sn homojenize edildi.
- Homojenize dokular 10.000 g’ de 5 dk boyunca santrifüje edildi ve süpernatantları toplandı.

Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Ölçümü

Çalışma 96 kuyucuklu plate’lerde yapıldı.

- Santrifüj sonrasında elde ettiğimiz süpernatantları yeniden numaralandırdığımız başka tüplere 100 µL hacminde eklendi. Bunun yanında standartlarımız da ayrı tüplere 100’er µL olacak şekilde koyuldu.
- Kristalize durumdaki SDS lysis solusyonu çözündürüldükten sonra her bir numuneye (standartlar da dahil) 100’er µL eklendi.
- Oda sıcaklığında 5 dk. İnkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra ölçüm yapılacak her tüpe 250 µL TBA reagent eklendi.
- Tüplerin ağzı kapatılıp 95°C ‘de 45 ila 60 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında tüpler 5 dk buz üzerinde bekletildi.
- Daha sonra tüm tüpler 3000 rpm’de 15 dk santrifüje edilerek süpernatant alındı.

➤ 96 wellplate'e numuneler yüklendi (her wellplate' e 200 µL) ve 532 nm Abs' de okutuldu.

Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Aktivitesi Hesaplanması:

20 mM/L stok standart çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak TBARS miktarı yaş gram doku başına nanomol olarak hesaplandı.

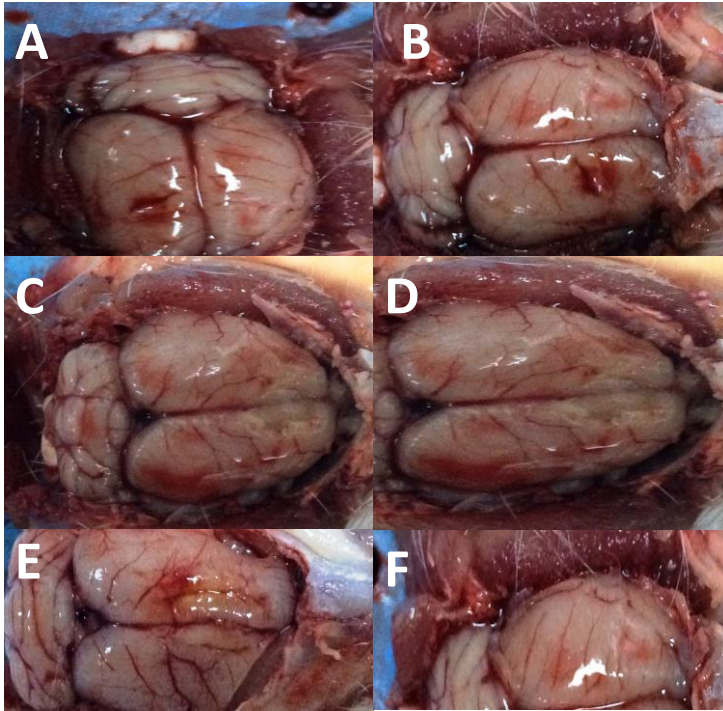
3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS for Windows Version 15.0 paket programında yapıldı. Sayısal değişkenler ortalama±standart sapma ve [Min – Maks] değerler ile kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde ile özetlendi. Elde edilen sonuçlar ortalama(ort)±standart sapma(ss) olarak verildi ve 0.05'in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testinde post-hoc testlerinden “Duncan” tekniği (Gruplar aynı harf ile ifade ediliyorsa istatistiksel olarak anlamsız, farklı harf ile ifade ediliyorsa istatistiksel olarak anlamlıdır) kullanılarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

Yapılan çalışmada hayvan deneklerden materyal alınması sırasında makroskopik incelemeler Patolog tarafından yapıldı. Kontrol (Sağlıklı) grubuna ait deneklerde araknoid mater ve beyin korteksi olağan (Resim 10 A), Defekt+Otogreft grubunda kortekste hafif ödeme bağlı parlak görünüm (Resim 10 B), Defekt grubunda kortekste dejeneratif görünüm ve kirli beyaz renk değişikliği (Resim 10 C), Defekt+PLGA grubunda kortekste dejeneratif görünüm ve kirli beyaz renk değişikliği (Resim 10 D), Defekt+HA grubunda kortekste ödem ve krem-sarı renkli dejeneratif görünüm (Resim 10 E), Defekt+BN grubunda kortekste hafif ödeme bağlı parlak görünüm (Resim 10 F) gösterdikleri izlendi. Dokular patolojik inceleme için %10 nötral formol solusyonunda fiksasyona bırakıldı.



Resim 10 A: Olağan görünümde araknoid mater ve beyin korteksi,

Resim 10 B: Kortekste hafif ödeme bağlı parlak görünüm,

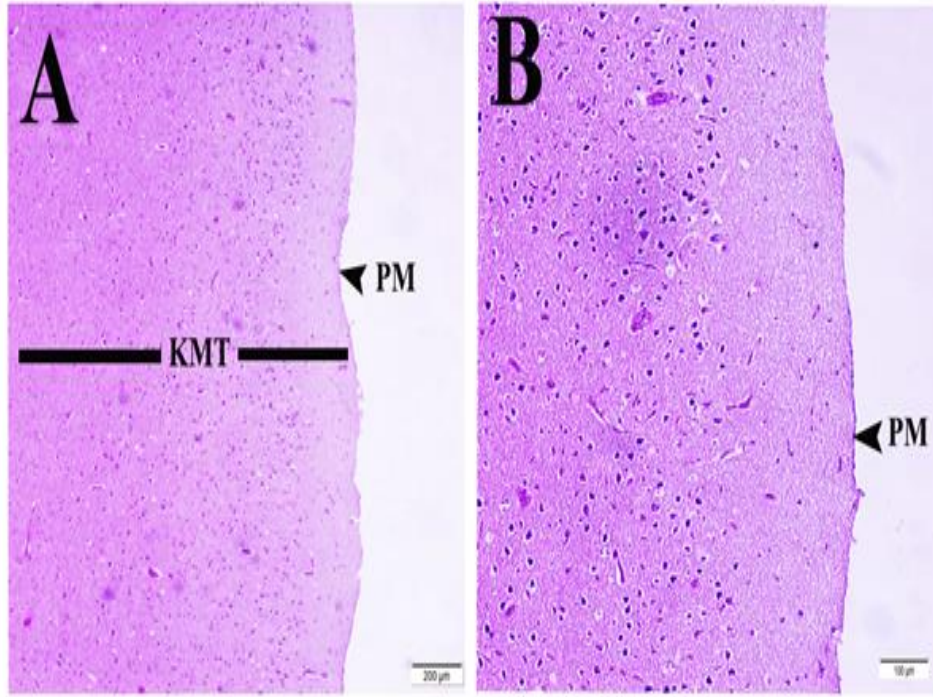
Resim 10 C- D: Kortekste dejeneratif görünüm ve kirli beyaz renk değişikliği,

Resim 10 E: Kortekste ödem ve krem-sarı renkli dejeneratif görünüm,

Resim 10 F: Kortekste hafif ödeme bağlı parlak görünüm

4.1.1. Kontrol Grubu

Bu gruba ait deneklerden elde edilen dokularda incelemeye alınan araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının olağan histomorfolojik bulgular sergilediği izlendi. Beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA’da hiç apoptotik nöron izlenmedi. Piamater doku bütünlüğünün korunduğu ve korteks ile sıkı bağlantısının devam etmesi dikkati çekti (Resim 11.A-B).



Resim 11.A) Olağan histomorfolojik bulgular gösteren korteks-moleküler tabaka H&E (x100).

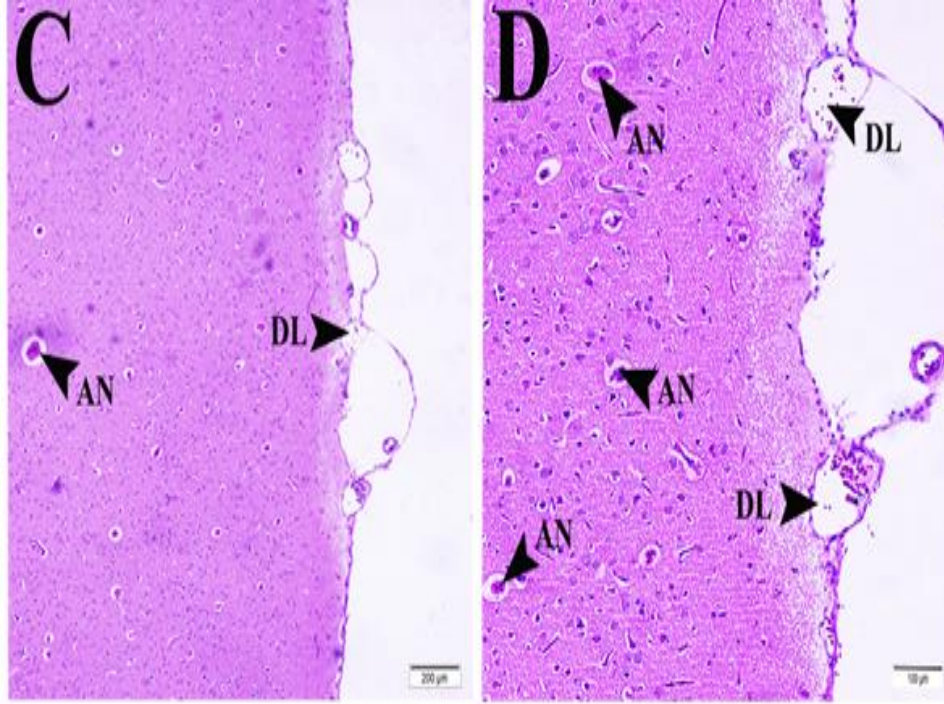
Resim 11.B) Olağan histomorfolojik bulgular gösteren korteks-moleküler tabaka H&E (x400).

(KMT: Korteks moleküler tabaka, PM: Pia mater)

4.1.2. Defekt Grubu

Bu gruba ait deneklerden elde edilen dokularda incelemeye alınan araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia mater tabakasında doku bütünlüğünün kaybolduğu ve beyin korteksinde pia matere yakın alanlarda beyin dokusunda ödem, vakuolizasyon gibi dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Özellikle piamater ile araknoid

mater arasında ödem ve buna bağlı şiddetli dilatasyon (%51 ve üzeri), özellikle damarlar çevresinde şiddetli iltihabi hücre infiltrasyonu (10 BBA'da 9 ve üzeri) dikkati çekti. Yer yer pia materin korteksten ayrılması ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA'da 6 ve üzeri apoptotik nöron izlendi. Piamater altında bulunan vasküler yapılarda dilatasyon ve endotel belirginleşmesi gözlemlendi (Resim 12.C-D).



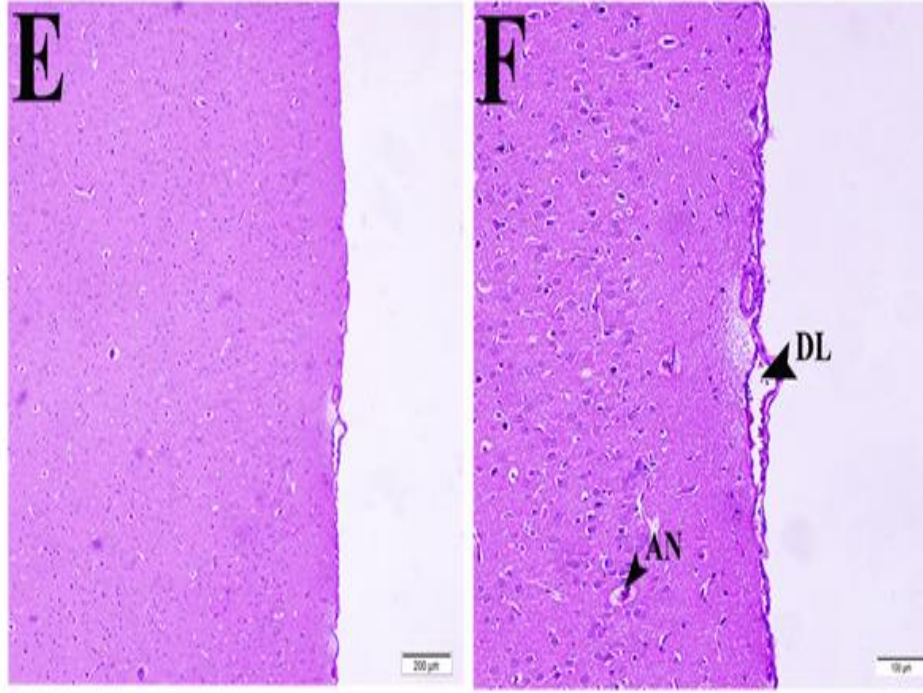
Resim 12.C) Beyin dokusundan yer yer ayrılan piamater ve subaraknoidal mesafede şiddetli dilatasyon H&E (x100).

Resim 12.D) Beyin dokusundan yer yer ayrılan piamater, subaraknoidal mesafede şiddetli dilatasyon ve kortekste izlenen çok sayıda apoptotik nöron H&E (x400).
(AN: Apoptotik Nöronlar, DL: Dilatasyon)

4.1.3. Defekt+Otogreft Grubu

Bu gruba ait deneklerden elde edilen dokularda incelemeye alınan araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia materin altında yer alan vasküler yapılarda hafif şiddette dilatasyon ile subaraknoidal mesafede hafif şiddette (%10-25) dilatasyon ve tek tük iltihabi hücre infiltrasyonu (10 BBA'da 3-5) dikkati çekti. Bunun yanında pia materin hemen alt kısmında beyin parankim dokusunda hafif şiddette ödem ve

beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA'da 1-2 arası apoptotik nöron gözlemlendi(Resim 13 E-F).



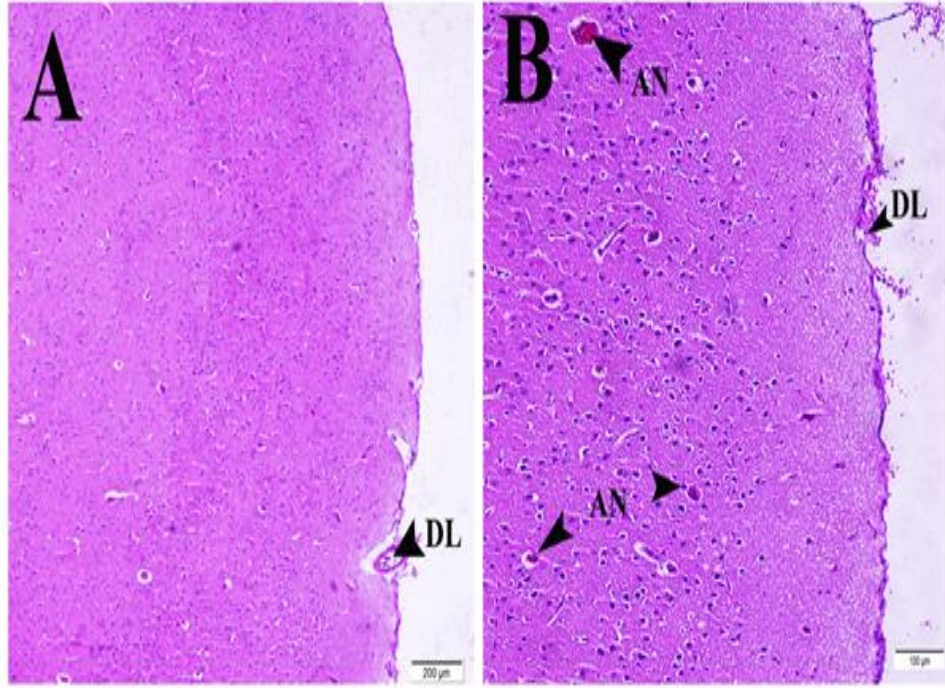
Resim 13E) Piamater altında yer alan vasküler yapılarda hafif dilatasyon ve seyrek apoptotik nöron H&E (x100)

Resim 13F) Piamater altında yer alan vasküler yapılarda hafif dilatasyon ve seyrek apoptotik nöron H&E (x400)

(AN: Apoptotik Nöronlar, DL: Dilatasyon)

4.1.4. Defekt + %10 HA Grubu

Bu grupta yer alan deneklerden elde edilen dokularda incelemeye alınan araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia materin altında yer alan vasküler yapılarda hafif şiddette dilatasyon ile subaraknoidal mesafede orta şiddette (%26-50) dilatasyon ve subaraknoidal mesafede orta şiddette (10 BBA'da 6-8) iltihabi hücre infiltrasyonu dikkati çekti. Bunun yanında pia materin hemen alt kısmında beyin parankim dokusunda hafif şiddette ödem ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA'da 3-5 arası apoptotik nöron gözlemlendi. Fokal alanlarda piamater doku bütünlüğünün buzulduğu izlendi (Resim 14.A-B)

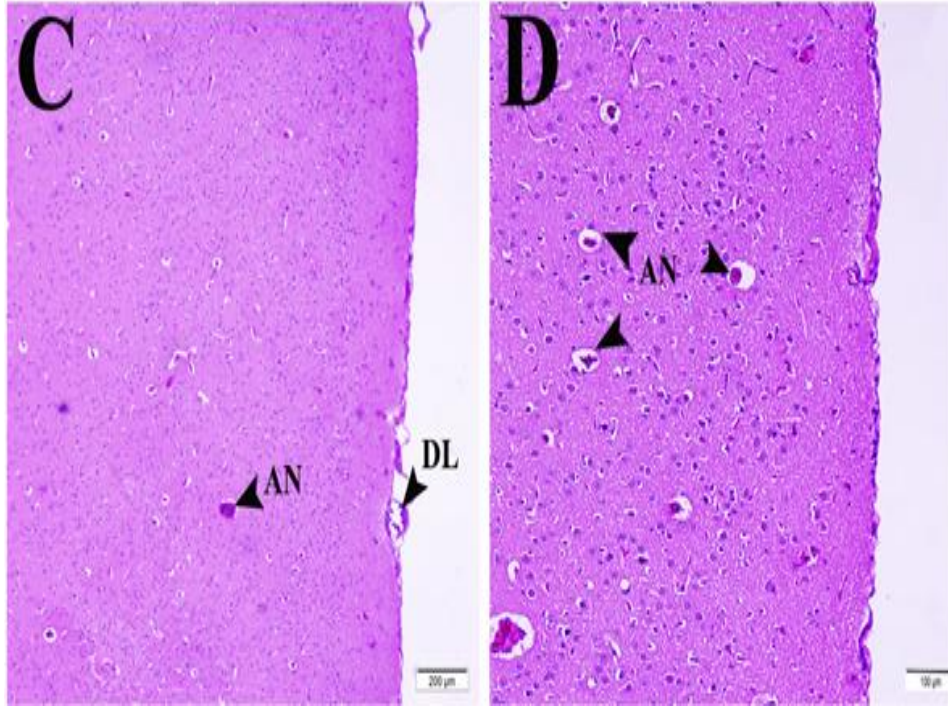


Resim 14.A-B) Piamater altında yer alan vasküler yapılarda hafif dilatasyon, subaraknoidal mesafede orta şiddette dilatasyon ve apoptotik nöronlar H&E (x100-400)

(AN: Apoptotik Nöronlar, DL: dilatasyon)

4.1.5. Defekt + %10 BN Grubu

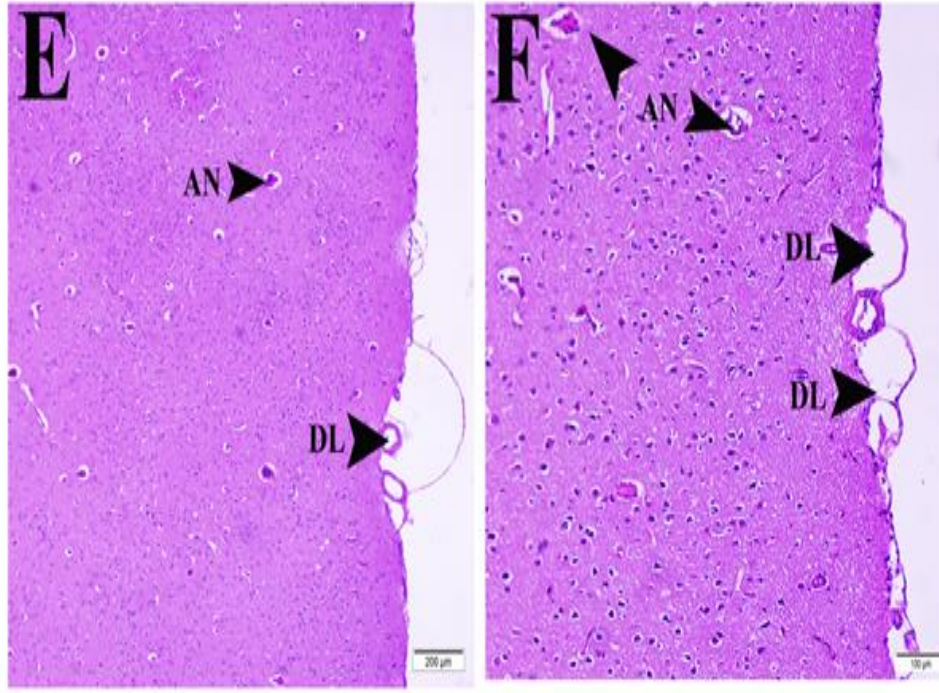
Bu grupta yer alan deneklerden elde edilen dokularda incelemeye alınan araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia materin altında yer alan vasküler yapılarda hafif şiddette dilatasyon ve subaraknoidal mesafede orta şiddette (%25-50) dilatasyon ve subaraknoidal mesafede orta şiddette (10 BBA’da 6-8) iltihabi hücre infiltrasyonu dikkati çekti. Bunun yanında pia materin hemen alt kısmında beyin parankim dokusunda hafif şiddette ödem ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA’da 3-5 arası apoptotik nöron gözlemlendi. Fokal alanlarda piamater doku bütünlüğünün buzulduğu izlendi (Resim 15. C-D).



Resim 15. C-D) Piamater altında yer alan vasküler yapılarda hafif dilatasyon, subaraknoidal mesafede orta şiddette dilatasyon ve apoptotik nöronlar H&E (x100-400)

(AN: Apoptotik Nöronlar, DL: Dilatasyon)

Defekt + scaffold grubuna ait deneklerden elde edilen dokularda incelemeye alınan araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia mater tabakasında doku bütünlüğünün kaybolduğu ve beyin korteksinde pia matere yakın alanlarda beyin dokusunda ödem, vakuolizasyon gibi dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Özellikle piamater ile araknoid mater arasında ödem ve buna bağlı şiddetli dilatasyon (%51 ve üzeri), damarlar çevresinde şiddetli iltihabi hücre infiltrasyonu (10 BBA’da 9 ve üzeri) dikkati çekti. Yer yer pia materin korteksten ayrılması ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA’da 6 ve üzeri apoptotik nöron izlendi. Piamater altında bulunan vasküler yapılarda dilatasyon ve endotel belirginleşmesi gözlemlendi (Resim 16.E-F).



Resim 16.E) Beyin dokusundan yer yer ayrılan piamater ve subaraknoidal mesafede şiddetli dilatasyon H&E (x100).

Resim16.F) Beyin dokusundan yer yer ayrılan piamater, subaraknoidal mesafede şiddetli dilatasyon ve kortekste izlenen çok sayıda apoptotik nöron H&E (x400).

(AN: Apoptotik Nöronlar, DL: Dilatasyon)

Tablo 3. Beyin histomorfolojik bulgular skor tablosu

Gruplar	Dilatasyon (DL)	Apoptotik Nöron(AN)	İltihabi hücreler
Sağlıklı	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Defekt	3 ^e	3 ^e	3 ^e
Otograft	1 ^b	1 ^b	1 ^b
%10 HA	2 ^{bc}	1 ^b	1 ^{bc}
%10 BN	2 ^{bc}	1 ^b	1 ^b
Scaffold	2 ^e	2 ^e	2 ^e

0: Olağan morfolojik bulgular, 1: hafif şiddette lezyon, 2: orta şiddette lezyon,

3: şiddetli lezyon

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Altı çalışma grubuna ait deneklerden elde edilen beyin dokusu yapılan ön hazırlık aşamaları sonrasında spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi düzey analizleri yapıldı (Tablo 4).

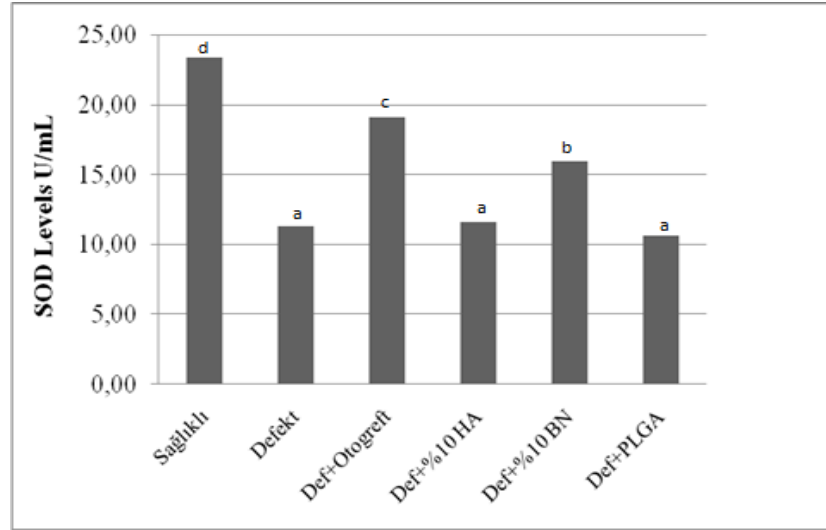
Tablo 4. Enzim aktivite düzeyleri

Gruplar	SOD(U/mL)			GSH(mmol/mL)			MDA(nmol/mL)		
	ORT		STD	ORT		STD	ORT		STD
Kontrol	23,34	±	4,66	7,82	±	0,57	2,22	±	0,62
Defekt	11,31	±	1,06	3,22	±	0,39	7,85	±	0,97
Defekt+Otogreft	19,09	±	4,91	6,55	±	0,27	3,82	±	0,94
Defekt+%10 HA	11,59	±	1,47	4,85	±	0,08	6,50	±	0,87
Defekt+%10 BN	15,91	±	2,27	6,67	±	0,66	5,01	±	0,75
Defekt+PLGA	10,59	±	1,27	4,21	±	0,34	7,96	±	1,34

SOD; Süper oksit dismutaz, GSH; Glutasyon peroksidaz, MDA; Malondialdehit, HA; Hidroksiapatit, BN; Bor nitrit, PLGA; Polylactic-co-glycolic acid

Altı çalışma grubuna ait deneklerden elde edilen SOD enzim aktivite düzeyleri defekt, defekt+HA, defekt+ PLGA gruplarında kontrol grubuna göre enzim aktivite düzeyleri düşük izlendi. Defekt+ Otogreft ve Defekt+BN grubunda ise kontrol grubuna yakın enzim aktivite düzeyleri saptandı (Tablo 5).

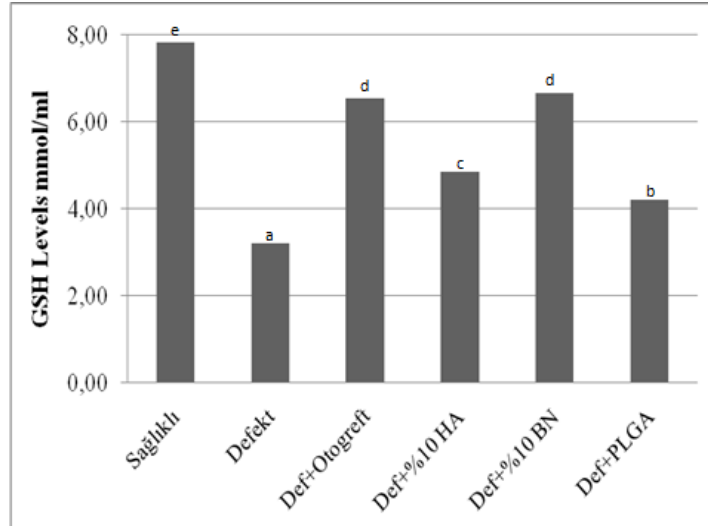
Tablo 5. SOD Enzim Aktivite Düzeyleri Gruplar Arası İstatiksel Analiz



HA; Hidroksiapatit, BN; Bor nitrür, PLGA; Polylactic-co-glycolic acid

Altı çalışma grubuna ait deneklerden elde edilen GSH enzim aktivite düzeyleri defekt, defekt+HA, defekt+ PLGA gruplarında kontrol grubuna göre enzim aktivite düzeyleri düşük izlendi. Defekt+ Otogreft ve Defekt+BN grubunda ise kontrol grubuna yakın enzim aktivite düzeyleri saptandı (Tablo 6).

Tablo 6. GSH Enzim Aktivite Düzeyleri Gruplar Arası İstatiksel Analiz

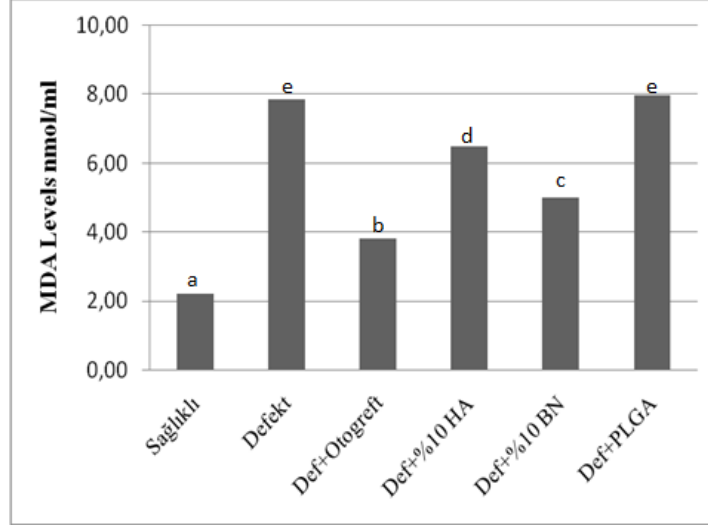


HA; Hidroksiapatit, BN; Bor nitrür, PLGA; Polylactic-co-glycolic acid

Altı çalışma grubuna ait deneklerden elde edilen MDA enzim aktivite düzeyleri defekt, defekt+HA, defekt+ PLGA gruplarında kontrol grubuna göre

enzim aktivite düzeyleri yüksek izlendi. Defekt+ Ototogreft ve Defekt+BN grubunda ise kontrol grubuna yakın enzim aktivite düzeyleri saptandı (Tablo 7).

Tablo 7. MDA Enzim Aktivite Düzeyleri Gruplar Arası İstatiksel Analiz



5. TARTIŞMA

Kafatası defektleri mortalite ve morbidite ile sonuçlanabilen ve kişinin fiziksel ve ruh sağlığını önemli derecede etkileyen, yaşam kalitesini düşüren ve iş kaybına sebep olan ciddi bir sağlık sorunudur. Bu nedenle kafatası defektlerinin tedavisi oldukça önemlidir. Tarihten bugüne kadar kafatası defektlerinin tamiri için çok çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Kraniyoplasti, kozmetik problemler nedeniyle ortaya çıkmış ve nöroşirurji pratiğinde sık kullanılan bir cerrahi girişimdir. Günümüzde ideal kraniyoplasti materyaline ulaşamamış ve bununla ilişkili olarak ideal cerrahi teknik sunulamamıştır. Dolayısıyla materyal ve teknik konusunda halen belirli bir protokol sağlanamamıştır. Bu anlamda çeşitli nedenlerle kafatasında oluşan defektlerin kapatılması için yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kafatası defektlerinin tamiri ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalar günümüzde yoğun olarak devam etmektedir ¹.

Kranyumda defekte yol açan nedenlerin başında travmalar gelmektedir. Bunu kraniyal veya intrakraniyal yerleşimli tümörler izlemektedir ⁸⁹. Kraniyum defektlerini incelediğimizde defekte yol açan nedenler arasında travmanın %67, tümörlerin %17, dekompressif kraniyotominin %12.5, osteomyelitin %5 oranında olduğu bildirilmektedir².

Kraniyal defektlerinin rekonstrüksiyonunda 19. Yüzyıldan günümüze kadar otojen greftler, sentetik, yarı sentetik ve alloplastik materyaller kullanılmıştır. Kemik doku iyileşmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, kemik defektlerinin kendiliğinden ve hızlı bir biçimde rejenerasyonunu sağlayacak yöntemler üzerinde çalışılmıştır. Daha büyük defektlerde ise, rekonstrüksiyon amacıyla kullanılan kemik grefti veya kemik benzeri alloplastik maddelerin daha hızlı ve az komplikasyonla osteointegrasyona yardımcı olacak yöntemler ve kombinasyonları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla bazı başarılı sonuçlar elde edilmesine karşın, bu çalışmaların kliniğe yansımaları istenilen düzeyde olmamıştır⁹⁰.

Deney hayvanlarında kraniyumdaki defektlerin rejeneratif kapasitelerinin insanlardakinden daha iyi olduğu bilindiğinden çalışmamızı Wistar Albino ratların kraniyal bölgelerinde gerçekleştirdik.

Sıçanlarda kritik büyüklükteki kemik defektinin boyutu konusunda net bir yanıt yoktur. Birçok araştırmacı 8 mm'yi kritik büyüklük olarak kabul ederken, bir

kısmı da 6 mm ve hatta 4 mm'yi kritik boyut kemik defekti olarak kabul etmiştir⁷. 8 mm'nin altındaki defektlerin kendiliğinden iyileşme eğilimi göstermeleri sebebiyle ratlarda 8 mm'nin ideal kritik defekt büyüklüğü olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise 8 mm'lik tam kat kemik defekti oluşturularak, kritik büyüklükteki kraniyal kemik defekti oluşturulmuştur.

Kraniyal kemik defektinin iyileşmesi sırasında ölü boşluğu çevreleyen dokuların sağlıklı olması gerekmektedir. Kraniyumda periosteum ve özellikle dura kemik iyileşmesinde önemlidir. Yeni kemik oluşumu çevreden merkeze doğru (sentripedal) dur⁹¹. Dura ve periosteum olmaksızın, etraftaki kemik dokunun yeni damarlanması ve kemikleşmesi yetersizdir. Diğer iskelet yapılarının aksine, kraniyal kemiklerin iyileşmesinde periosteumun önemi daha azdır^{91,92}. Fakat dura ile periosteumun karşılıklı etkileşiminin de önemli olduğu bildirilmiştir⁹². Bu çalışmada kemik defekti oluşturulurken dura ve altındaki sagittal sinüs korunmuş ve kesilen periosteum, defekt üzerine getirilerek onarılmıştır. İçeride kalan ölü boşlukta yumuşak doku büyümesi ve fibroblastik aktivite, greft ve membran kullanılarak en aza indirgenmiş ve implante edilen materyallerin çevre dokulara migrasyonu önlenmiştir.

Son yıllarda ticari olarak birçok kemik greft materyali üretilmiştir. Ancak bu materyallerin kullanımı ile ilgili geniş kapsamlı çalışmalar bulunmamaktadır. Kemik defektleri onarımında kullanılan ve altın standart olarak nitelendirilen otogreftler etkin bir çözüm olmakla birlikte, sınırlı miktarda elde edilebilmesi, ek bir cerrahi girişime ihtiyaç duyulması ve kemik iyileşmesi süresinin uzaması gibi dezavantajları bulunmaktadır^{93, 94}. Allogreft kullanımında da hastalık taşıma riski ve yapılan sterilizasyon işlemleriyle greftin özelliklerini kaybetmesi gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır.

Söhr tarafından 1907 yılında yapılan bir çalışmada kraniyal defekte uygun dış tabula periosteum olmaksızın kullanılmıştır. Bu teknik günümüzde halen kullanılmaktadır ve kemik dokusunun transplantasyonunun ilk örneğidir. İç tabulanın kraniyoplastide kullanımı dış tabula kullanımından daha yenidir. Örneğin olfaktör oluk menengiomu olan bir hastaya frontal kraniyotomi yapıp daha sonra frontal kraniyotomide çıkartılan kemiğin iç tabulası, olfaktör bölgedeki defekti kapatmakta kullanılabilmektedir⁴⁰.

İlk kez Sicard Dambrin tarafından kraniyoplasti materyali olarak kullanılan kadaverik kafatası sodyum bikarbonat, ksilol, alkol ve eterde bekletildikten sonra kuru sıcak sterilizasyon uygulanmış ve daha sonra kraniyoplastide kullanılmıştır. Bu işlemlerden sonra sadece dış tabuların sağlam olarak kaldığını bu materyal ile uygulanan kraniyoplastilerde yabancı madde reaksiyonu gözlemediklerini ifade etmişlerdir. Fakat daha sonraki serilerde kadaverik kranyum ile uygulanan kraniyoplastilerde yüksek enfeksiyon ve kemik rezorbsiyonu görülmesi bu yöntemin kullanımını azaltmıştır. Günümüzde Burr-hole deliklerini kapatmakta halen allogreft materyeller kullanılarak kranyum şekli korunmasına rağmen nöroşirurji pratiğinde otogreftler, allogreftlere göre daha fazla tercih edilmektedir ⁴⁰.

Kemik otogreft ve allogreftlerinin dezavantajları nedeniyle, otogreft ve allogreftlere alternatif olarak çeşitli organik veya inorganik-sentetik materyallerin kemik grefti olarak kullanılması ve etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla deneysel araştırmalar yapılmasına yol açmıştır. Alternatif olarak sunulan ideal bir sentetik greft materyali, kemik yapıcı osteojenik hücrelere dönüşerek farklılaşabilecek progenitör (kök) hücrelerle, bu hücrelerin yerleşeceği ve gelişmesine uygun ortam sağlayacak osteokondüktif matriks yapı ve osteoprogenitör hücreleri etkileyerek kemik oluşturmalarını sağlayacak osteoindüktif proteinler içermelidir ⁹⁵.

Kemik rejenerasyonu omurga ve kafatası cerrahisinde en temel ve önemli amaçlardan biridir. Uzun kemik kırık iyileşmesinde, omurga füzyonlarında ve kemik defektlerini doldurmak için, otojen kansellöz (spongioz) kemik grefti günümüzde "altın standard" olarak kabul edilmiştir. Bunun en büyük nedeni; kemik iyileşmesine yardım eden kemik iliğinde bulunan osteoprogenitör hücreler, osteokondüktif hidroksiapatit kollajen matriks, osteoindüktif büyüme faktörleri gibi asıl komponentleri sağlamasıdır.

Otojen kansellöz kemik greftinin (OKKG) birçok dezavantajı vardır. Bunlar arasında donör (verici) bölge ağrısı ve parestezisi, greft miktarının yetersizliği, %8-10'lara yaklaşan enfeksiyon riski sayılabilir ⁹³.

Sert doku defekt bölgelerinde uygulandıklarında uzun süre fiziksel yapılarını koruyan ve son yıllarda kemik grefti materyali olarak önem kazanan β -trikalsiyum fosfat esaslı greft malzemeleri, klinikte yaygın kullanım alanı bulmaktadır. β -trikalsiyum fosfatın tam olarak rezorbsiyonunun 12-18 ay arasında olduğu

gösterilmiştir. Bu süre içerisinde fonksiyonel ve anatomik olarak orijinal kemikle yer değiştirdiği görülmüştür⁹⁶. Kemik greft uygulamalarında, rezorbsiyon hız ve mekanizması çok önemlidir. Uygulanacak olan materyal yeni kemik yapımında osteoindüktif ve osteokondüktif etki gösterirken, zaman içerisinde ortamdan tamamen uzaklaşarak yeni kemikle yer değiştirebilmelidir.

Çeşitli nedenlerle oluşmuş kemik defektlerinde gerçekleştirilen osteotomi alanlarında sıklıkla kemik grefti kullanılarak rekonstrüksiyonlar yapılmıştır⁹⁷. Defekt alanları spontan iyileşmeye bırakıldığında, fibrotik yapının göçü ile bölgede fibröz doku oluşumu başlar. Bu şekilde gerçekleşen fibrotik iyileşme sonucunda klinik olarak kaynamama (non-union) ve enkapsülasyon gibi komplikasyonlar oluşabilmektedir. Bu komplikasyonları önlemek ve kemik hücrelerinin bölgede rejenerasyonunu sağlamak amacıyla defektlerin greft materyali ile rekonstrüksiyonuna ihtiyaç vardır⁹⁸.

Son yıllardaki araştırmalarda, sentetik materyallerde büyük gelişmeler yaşanmıştır. Bu araştırmaların öncesinde sentetik materyaller, çok sık tercih edilmemekteydi. Hatta dünya çapında tüm greftler içinde sentetik greft kullanımı sadece %10'la sınırlıydı. Bu sınırlı kullanımlarının nedeni, tahmin edilemeyen rezorbsiyon süreleri, şekillendirmedeki zorluk, yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaları ile yetersiz klinik ve deneysel çalışmalardı. Sentetik materyaller ile ilgili çalışmalar arttıkça komplikasyonlar azalmış, otogreftlere ve allogreftlere olan üstünlükleri ortaya çıkmış ve kullanımları yaygınlaşmıştır^{99, 100}.

Sentetik greft materyalleri grubu içinde yer alan PLGA, sentetik bir polimer materyal olup, yapılmış olan in vivo ve in vitro kemik iyileşmesi çalışmalarında bio-uyumluluk ve mekaniksel bakımdan çeşitli oranlarda arzu edilen iskele yapısını oluşturduğu tesbit edilmiştir^{32, 33}.

Titanyumun içindeki tetraklorid oranının azaltılabilmesi 1965 yılında Simpson tarafından kraniyoplastilerde kullanımına imkan sağlamıştır¹⁰⁸. Simpson diğer metallerle karşılaştırmasında Titanyum'un radyolusent, ucuz olmasının, bio-uyumluluğunun olmasını avantaj olarak göstermiş fakat operasyon sırasında şekil vermenin güç olduğunu bildirmiştir¹⁰⁹. Titanyumun kraniyoplastide kullanımı pek uzun sürmemiştir. Çünkü radyopak oluşu ve operasyon sırasında şekillendirmenin zor oluşu nedeniyle beyin cerrahları metal olmayan maddelere yönelmiştir.

Tomografinin kullanıma girmesinden önce metallerin radyopak oluşu metallerin kraniyoplastide kullanımını sınırlayan en önemli faktör olmuştur⁴⁰.

Otolog kemik grefti yokluğunda metilakrilat kraniyoplasti için en sık kullanılan alloplastik materyallerden biridir. Akrilik doku reaksiyonu oluşturmaması sebebiyle kraniyoplastide kullanılmıştır. Akriliğin sertleşmeden önce istenilen şeklin verilebilmesi, hafif olması, ısı iletiminin daha az olması ve radyolüsent olması gibi üstün özellikleri mevcuttur. Kleinschmidt tarafından tavşanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmada metil-metakrilatın duraya yapıştığını fakat altındaki dokularda reaksiyona neden olmadığı belirtilmiştir. Fakat metil-metakrilat kırılabilir bir madde olduğu ve uygulanan hastalarda radyolüsent olması nedeniyle kırıklar ve çatlakların tespitinde zorluk çekilmiştir. Bu nedenle içine bir miktar radyopak madde konulmuş ve direkt grafilerde görünür hale getirilerek kullanılmıştır. Galieieh ve Hovin metil-metakrilat içerisine paslanmaz çelik gömerek akriliğin kırılma riskini azaltmıştır. Malis, paslanmaz çelik meş yerine titanyum meş kullanılmasını savunmuştur. Orijinal şeklinde kraniyal defekte göre önceden metil- metakrilat hasta üzerinde hazırlanıp daha sonra steril edilerek kullanılmaktaydı. Günümüz teknolojisinde steril halde ameliyatta kullanılabilen yada bilgisayar ve görüntüleme teknolojisi yardımıyla operasyon öncesi hastaya özel olarak hazırlanıp steril edilerek kullanılabilir⁴⁰. Ayrıca polimetilakrilat (PMMA)'ın sitotoksik etkisi ve güçlü lipid çözücü etkisi ile sinir dokusunda nöronal hasarlara yol açtığı deneysel olarak kanıtlanmıştır¹⁰¹.

Medpor (porus polietilen) ise literatürde küçük ve orta genişlikte defektlerin kapatılmasında çok uygun bir materyal olmasına rağmen, darbeye daha az dayanıklı ve büyük defektleri kapamada kullanımı zor bir materyal olarak bildirilmiştir. Polietilen biyolojik olarak uygun bir materyaldir ve içerdiği yaklaşık 150 mikrometrelik delikçikler sayesinde iskeleti birbiri ile ilişkilidir. Delikli yapısı sayesinde erken fibrovasküler ve yumuşak doku büyümesine izin verir. İçeriğindeki kemik yapı ise implantı güçlendirdiği gibi, aynı zamanda enfeksiyon riskini de azaltır. Polietilen, doku sıvısında çözülmez, yapısal olarak sağlamdır ve rezorbe olmaz. İmmün reaksiyona neden olmaz .

Kraniyoplastide kullanılan akrilik, titanyum gibi sentetik greft materyallerinin postoperatif dönemde beyin parankimi üzerine etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırıldığı ve değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Mekanik kararlılıklarının iyi oluşu ve yüksek oksijen geçirgenliğine sahip olmaları biyomateryallere bu alanda avantaj sağlar. Ancak biyomateryal yapımında kullanılan bazı monomerlerin; insan eritrositlerinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı, insan ve deney hayvanlarında nörotoksik etkilerinin yanı sıra alerjik, toksik etkilerde gösterdiği bilinmektedir.

Grimes ve arkadaşları 2 yıl boyunca kliniklerine başvuran benign tümör, düşük evreli kondrosarkomlar ve tümör benzeri lezyonu olan 30 hastaya lezyonları çıkarıldıktan sonra defekt bölgesine bifazik kalsiyum fosfat (β -TCP/HA) içeriğini uygulamışlar ve 2 yıl boyunca hastaları takip etmişlerdir. Hastaların sadece 6'sında komplikasyon gözlemlendiğini, komplikasyonların greftle ilişkili olmadığını, 28 hastanın günlük aktivitelerine tam anlamıyla geri döndüklerini belirtmişlerdir. Aynı zamanda bifazik kalsiyum fosfatı, kemik grefti olarak tümör benzeri lezyonların eksizyonu sonrası uygulamasını otojen greft uygulamasına göre daha etkili bulduklarını belirten araştırmacılar, komplikasyon oranını da otojen greftlerin komplikasyonuna göre oldukça düşük bulmuşlardır¹⁰¹.

İdeal greft materyaline ulaşma çabaları, sentetik greft materyalleri grubu içinde yer alan Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat üzerinde çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Hidroksiapatit gibi Trikalsiyum Fosfat da biyoabsorbe olan ve biyouyumlu bir materyaldir. TCP bir kalsiyum fosfat formudur ve genellikle β -trikalsiyum fosfat şeklinde kullanılır.

Çalışmamızda kullandığımız β -TCP/HA karışımında kullanılan her iki greft materyali daha önce tek başlarına defalarca kullanılmış olup, başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak özellikle β -TCP'in yerleştirildiği defekte kırılma özelliği göstermesi, kuvvetlere karşı koyamaması ve HA'in de rezorbe olmayıp uzun zaman defekt bölgesinde kalması çeşitli komplikasyonlara neden olmuştur. Bu komplikasyonları (postoperatif enfeksiyon ve fraktür) ortadan kaldırmak için, iki greft materyali bir araya getirilip değişik oranlarda kombine edilerek kemik defektlerinde kullanılmaya başlanmıştır¹⁰².

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, kemik defektlerinde kullanılmak üzere hazırlanan sentetik greft materyallerinin ya kendileri içinde ya da otojen greft veya büyüme faktörleri ile kombinasyonunun kullanılmasını önermektedir. Bu kombinasyonların amacı, greft materyallerinin tek başına kullanıldıklarında ortaya çıkan dezavantajlarının, kombinasyonda kullanılan diğerk greft materyali tarafından tolere edilip ideal grefte ulařılmasıdır¹⁰⁴.

Çalışmamızda belirli yoğunlukta hazırlanan hidroksiapatit ve bor nitrürün kalvarial kemik defektleri üzerine etkisi veya etkilerini araştırmak ve bor mineralinin sağık alanında kullanılabilir olabileceğini amaçladık. Hegzagonal Bor Nitrürün [HBN] kranyum defektlerinde kullanıldığı bir uygulama henüz yoktur.

Lahiri D ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada BN ve hidroksiapatitin in-vitro ortamda osteoblastların biyokompatitesinde önemli rollerinin olduğunu gösterilmiştir. 2010 yılında yapılan diğerk çalışmada ise BN'n toksisitesinin olmadığını gstermiřtir³⁷.

Çalışmamızda Sağıklı gruba herhangi bir işlem uygulanmadı. Defekt kontrol grubunda defekt oluşturulup herhangi bir implant yerleştirilmedi. Diğerk gruplara ise PLGA, HA ve HBN içeren scaffoldlar yerleştirildi.

Deney süresi sonunda ratların histopatolojik ve biyokimyasal bulguları değerlendirildi.

Histopatolojik bulgu sonuçları değerlendirildiğinde bütün grupların beyin dokusuna yapılan doku takibi ve hematoksilen eozin boyaması sonucunda sağıklı grupta incelemeye alınan araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının olağan histomorfolojik bulgular sergilediği izlendi. Beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA'da hiç apoptotik nöron izlenmedi. Piamater doku bütünlüğünün korunduğu ve korteks ile sıkı bağlantısının devam etmesi dikkati çekti, **defekt grubunda** araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia mater tabakasında doku bütünlüğünün kaybolduğu ve beyin korteksinde pia matere yakın alanlarda beyin dokusunda ödem, vakuolizasyon gibi dejeneratif değişiklikler gözlendi. Özellikle piamater ile araknoid mater arasında ödem ve buna bağlı şiddetli dilatasyon (%51 ve üzeri), özellikle damarlar çevresinde şiddetli iltihabi hücre infiltrasyonu (10 BBA'da 9 ve üzeri) dikkati çekti. Yer yer pia materin

korteksten ayrılması ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA'da 6 ve üzeri apoptotik nöron izlendi. Piamater altında bulunan vasküler yapılarda dilatasyon ve endotel belirginleşmesi gözlemlendi. **Defekt + otograft grubunda** araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia materin altında yer alan vasküler yapılarda hafif şiddette dilatasyon ile subaraknoidal mesafede hafif şiddette (%10-25) dilatasyon ve tek tük iltihabi hücre infiltrasyonu (10 BBA'da 3-5) dikkati çekti. Bunun yanında pia materin hemen alt kısmında beyin parankim dokusunda hafif şiddette ödem ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA'da 1-2 arası apoptotik nöron gözlemlendi. **Defekt + %10 HA grubunda** araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia materin altında yer alan vasküler yapılarda hafif şiddette dilatasyon ile subaraknoidal mesafede orta şiddette (%26-50) dilatasyon ve subaraknoidal mesafede orta şiddette (10 BBA'da 6-8) iltihabi hücre infiltrasyonu dikkati çekti. Bunun yanında pia materin hemen alt kısmında beyin parankim dokusunda hafif şiddette ödem ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA'da 3-5 arası apoptotik nöron gözlemlendi. Fokal alanlarda piamater doku bütünlüğünün bozulduğu izlendi. **Defekt + %10 BN** araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia materin altında yer alan vasküler yapılarda hafif şiddette dilatasyon ve subaraknoidal mesafede orta şiddette (%25-50) dilatasyon ve subaraknoidal mesafede orta şiddette (10 BBA'da 6-8) iltihabi hücre infiltrasyonu dikkati çekti. Bunun yanında pia materin hemen alt kısmında beyin parankim dokusunda hafif şiddette ödem ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10 BBA'da 3-5 arası apoptotik nöron gözlemlendi. Fokal alanlarda piamater doku bütünlüğünün bozulduğu izlendi. **Defekt + scaffold grubunda** araknoid mater, subaraknoidal mesafe, piamater, beyaz ve gri cevher ile damar yapılarının histomorfolojik incelemesinde; pia mater tabakasında doku bütünlüğünün kaybolduğu ve beyin korteksinde pia matere yakın alanlarda beyin dokusunda ödem, vakuolizasyon gibi dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Özellikle piamater ile araknoid mater arasında ödem ve buna bağlı şiddetli dilatasyon (%51 ve üzeri), damarlar çevresinde şiddetli iltihabi hücre infiltrasyonu (10 BBA'da 9 ve üzeri) dikkati çekti. Yer yer pia materin korteksten ayrılması ve beyin korteksinde moleküler tabakada 10

BBA'da 6 ve üzeri apoptotik nöron izlendi. Piamater altında bulunan vasküler yapılarda dilatasyon ve endotel belirginleşmesi gözlemlendi.

Glutasyon (**GSH**), kimyasal olarak reaktif toksik bileşikler ya da oksidatif strese karşı hücrel savunmada rol oynayan en önemli moleküllerden biridir. Glutasyon redükte ve okside durumlarda bulunur. Redükte formunda, sisteininthiol grubu reaktif oksijen ürünleri gibi stabil olmayan moleküllere, indirgeyici ekuvalanları verebilme yeteneğindedir. Bu mekanizma ile koruyucu etki ortaya koyar. GSH enzimatik olmayan antioksidan sistemin önemli bir parçasıdır. Azalmış hücrel GSH düzeyleri ve GSH sentez kapasitesi gibi durumlarda hücreler radyasyona ve bazı ilaçlara duyarlı hale gelir. Parasetamol'ün yeterli derecede yüksek dozlarında oksidatif stresin bir mediatörü olarak NAPQI'nın, GSH düzeylerinde azalmaya ve bu azalmaya bağlı olarak lipid peroksidasyonunda artışa yol açtığı bilinmektedir¹⁰⁵.

Süperoksit dismutaz [SOD] süperoksitin oksijen ve hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir enzim ailesidir. Bu nedenle oksijene maruz kalan neredeyse tüm hücrelerde önemli bir antioksidan savunma mekanizmasını oluşturur. Süperoksit hücrelerde ana reaktif oksijen ürünlerinden biridir ve bu nedenle SOD bir anahtar antioksidan rol oynar. Katalaz ve SOD gibi antioksidan enzimler lipid peroksidazlar ya da reaktif oksijen ürünleri tarafından kolayca inaktive olurlar¹⁰⁶.

Çalışmamızda defektli bölgeden alınan doku örneklerinden yararlanılarak SOD, GSH ve LPO enzim aktivitelerini içeren biyokimyasal analizler yapıldı. Lipid peroksidasyon ölçümlerinde bu enzimin son ürünü olan MDA, oksidatif stres indikatörü olarak kabul edilmektedir³⁸. Bu nedenle bazı çalışmalarda LPO yerine MDA ifadesi kullanılmaktadır. Çalışmamızda da literatür bilgiye paralel olarak MDA ifadesi kullanıldı. Çalışmamızdaki biyokimyasal sonuçların istatistiksel analizine göre otogreft ve BN içerikli greft materyali SOD ve GSH aktivitesini artırarak antioksidan etki göstermiştir. PLGA ve HA gruplarının SOD ve GSH aktivitesinin belirlenmesinde ise birbirine yakın sonuçlar elde edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BN içerikli greftin ve otogreftin MDA düzeyinde artışa neden olmadığı gözlemlendi. Defekt grubu ve PLGA kullanılan grupta MDA düzeyinde anlamlı artış gözlemlendi. HA içeren greft grubunda MDA düzeyi kontrol ile defekt grubu arasında bir değer gözlemlendi.

Detaylı literatür taramasında kraniyoplasti yöntemleri ve kullanılan greft materyalleri ile ilgili çok sayıda çalışmaya rastlanılmıştır. Ancak çoğu çalışmada genellikle kraniyoplasti yöntemlerinin birbirine olan üstünlükleri ve cerrahi pratikte uygulanabilirliklerinin tartışıldığı yada kullanılan greft materyalinin uyumu ve kemik gelişimine yaptığı katkıların araştırıldığı görülmüştür. Oysaki başarılı bir kraniyoplasti işlemi sonrası morbidite ve mortalite açısından verimliliğin esas olduğu göz ardı edilmemelidir. Bunun içinde kraniyoplasti işlemi sonrası beyin parankimi hasarının en aza indirgenmesi kaçınılmaz bir gerçekliktir. Bu yüzden günümüz nöroşijurji pratiğinde çoğu vakada otogreft alternatifi kullanılmaktadır.

Çalışmamızda ciddi travma sonrası otogreft şansını kaybetmiş vakalar için alternatif olabilecek greftlerin beyin parankimi üzerine hücresel düzeyde yaptığı histomorfolojik ve biyokimyasal değişiklikler incelenerek kraniyoplasti sonrası takip süreçleri analiz edildi. Elde edilen biyokimyasal veriler ve histomorfolojik bulgular değerlendirildiğinde; nöroşijurji pratiğinde kullanılan diğer greftlere göre beyin dokusunda minimum düzeyde serbest radikal oluşumuna neden olması ve daha az morfolojik değişiklik ile otogreftte yakın sonuçlar elde edilmesi diğer greftlerle karşılaştırıldığında BN ile hazırlanmış sentetik greftlerin cerrahi pratikte alternatif bir kraniyoplasti yöntemi olduğu sonucuna varıldı.

Sonuç olarak günümüzde trafik kazaları, ateşli silah yaralanmaları ile iş kazalarının görülme sıklığı artmakta ve eşlik eden ciddi kafa travmaları, travma sonrası ilk yardım olanaklarının iyileştirilmesi nedenleriyle kraniyoplasti ihtiyacı olan nöroşijurji vakaları artmaya devam etmektedir. Bu tür vakalarda acil şartlar düzeltildikten ve yaşam riski ortadan kaldırıldıktan sonra en önem arzeden konu olan greft materyali seçimi ve bu materyallerin vakalarda oluşturacağı iyileşmeye katkı ve gelişebilecek komplikasyonların en aza indirilmesi yanısıra vakalarda yeni nörolojik bozukluklar ve fonksiyon kayıplarıdır. Her ne kadar çalışmamızda BN ile hazırladığımız sentetik greftle otogreftte çok yakın sonuçlar elde etmiş olsakta bu greftlerin cerrahi pratikte kullanılabilmesi için geniş hayvan çalışmaları ile tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi, klinik çalışmalar ve ideal bir kraniyoplasti için gerekli diğer özellikler için yeterli olduğuna dair çalışmalar ile desteklenmelidir.

6. SONUÇLAR

1. Çalışma grupları arasında piamater ile araknoid mater arasında ödem ve buna bağlı dilatasyon açısından; kontrol ve otogreft gruplarına en yakın histomorfolojik bulgular BN ve HA gruplarında elde edildi. Defekt ve scaffold gruplarında ise histomorfolojik bulguların kontrol ve otogreft gruplarına göre şiddetli değişiklikler içerdiği gözlemlendi.

2. Çalışma grupları arasında beyin parankimi içinde yer alan apoptotik nöron yoğunluğu açısından; kontrol ve otogreft grubuna en yakın histomorfolojik bulgular, BN ve HA gruplarında elde edildi. Defekt ve scaffold gruplarında ise apoptotik nöron yoğunluğu kontrol ve otogreft gruplarına göre şiddetli değişiklikler içerdiği gözlemlendi.

3. Çalışma grupları arasında piamater ile araknoid mater arasında yer alan iltihabi hücre yoğunluğu açısından; kontrol ve otogreft grubuna en yakın histomorfolojik bulgular, BN ve HA gruplarında elde edildi. Defekt ve scaffold gruplarında ise iltihabi hücre sayısı kontrol ve otogreft gruplarına göre şiddetli yoğunlukta gözlemlendi.

4. Histomorfolojik özellikler açısından BN ve HA'dan elde edilen greft materyallerinin iyileşme sürecinde beyin parankimi üzerine etkileri yönünden otogreftte alternatif olarak kullanılabileceğine ilişkin veriler elde edildi (ANOVA testi).

5. Çalışma grupları arasında SOD enzim aktivite düzeyleri açısından kontrol ve otogreft grubuna en yakın biyokimyasal veriler, BN ve HA gruplarında elde edildi. Defekt ve scaffold gruplarında ise SOD enzim aktivite düzeyleri kontrol ve otogreft gruplarına göre aşırı azalma gözlemlendi.

6. Çalışma grupları arasında GSH enzim aktivite düzeyleri açısından kontrol ve otogreft grubuna en yakın biyokimyasal veriler, BN ve HA gruplarında elde edildi. Defekt ve scaffold gruplarında ise GSH enzim aktivite düzeyleri kontrol ve otogreft gruplarına göre aşırı azalma gözlemlendi.

7. Çalışma grupları arasında MDA enzim aktivite düzeyleri açısından kontrol ve otogreft grubuna en yakın biyokimyasal veriler, BN ve HA gruplarında elde edildi. Defekt ve scaffold gruplarında ise MDA enzim aktivite düzeyleri kontrol ve otogreft gruplarına göre aşırı artış gözlemlendi.

8. Biyokimyasal özellikler açısından BN ve HA'dan elde edilen greft materyallerinin iyileşme sürecinde beyin parankimi üzerine etkileri yönünden otogreftte alternatif olarak kullanılabileceğine ilişkin veriler elde edildi(ANOVA testi).

KAYNAKLAR

1. Kurtar, A.S, Akın, O.N, 2006, Karniyektomi defekt onarımında demineralize kemik matriksi kullanılması ve hiperbarik oksijen tedavisinin füzyon üzerine etkileri, Uzmanlık Tezi Gülhane Askeri Tıp Akademisi.
2. Ersatz H. von Schadeldefecten durch unter der Kopfscharteverschobene oder Umgeklappte Periostknochen Jappen beziehungsweise Perioslappen. Beitrage zur klinischen Chirurgie, 1903, 37: 499-510.
3. Caroline Spalzki,M.D.,Jason Barr ,B.A., Meredith Wetterau,M.D.,Pierre B.Saadeh,M.D.,Stephen M.,Warren M.D.,2010. Cranial bone defects: current and future strategies. Neurosurg Focus 29 (6):E8. Institute of Reconstructive Plastic Surgery, New York University Langone Medical Center, New York.
4. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials.Journal of oral surgery, 1980, 38: 176-180.
5. Aybar Odstrcil A TE, Missana L. An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. Acta Odontol Latinoam, 2005, 18: 63-67.
6. Kubler N, Michel C, Zoller J, Bill J, Muhling J, Reuther J. Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 1995, 23: 337-346.
7. Ağa ayak KS. Rat kalvaryumunda oluşturulan kritik boyut defektlerinde mezenkimal k k h creleri, bifazik kalsiyum fosfat seramikleri ve trombositler zengin plazmanın kemik rejenerasyonu  zerine etkilerinin histolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılması Sağlık Bilimleri Enstit s  Diyarbakır: Dicle hniversitesi, 2011.
8. Nielsen FH. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. Nutrition, 2000, 16: 512-514.
9. Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. International orthopaedics, 2007, 31: 721-727.
10. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of

fractures and bone defects. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2005, 87: 1367-1378.

11. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. Journal of cellular and molecular medicine, 2006, 10: 7-19.
12. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clinical orthopaedics and related research, 1986: 299-308
13. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. Annals of surgery, 1982, 196: 100-109.
14. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. International journal of oral and maxillofacial surgery, 2001, 30: 58-62.
15. Sprini D RGB, Stefano L. D, Cianferotti L. Napoli N Correlation between osteoporosis and cardiovascular disease. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism, 2014, 11: 117-119.
16. Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, Shimizu H, Nakagami F, Koriyama H, Shimamura M, Miyake T, Rakugi H, Morishita R. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. Circulation research, 2010, 107: 466-475.
17. Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. The Biochemical journal, 1985, 232: 715-724.
18. Huan JL, Xing L, Qin XJ, Gao ZG, Pan XF, Zhao ZD. Expression and clinical significance of osteopontin in calcified breast tissue. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 2012, 13: 5219-5223.
19. Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CAG, Sodek J. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. Journal of Bone and Mineral Research, 2002, 17: 1486-1497.
20. Chatakun P, Nunez-Toldra R, Lopez EJD, Gil-Recio C, Martinez-Sarra E, Hernandez-Alfaro F, Ferres-Padro E, Giner-Tarrida L, Atari M. The effect of

- five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71: 113-142.
21. Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *Journal of bone and mineral research* 2010, 25: 695-705.
 22. Chmielnicka M, Wozniacka A, Torzecka JD. The influence of corticosteroid treatment on the OPG/RANK/RANKL pathway and osteocalcin in patients with pemphigus. *Postepy dermatologii i alergologii*, 2014, 31: 281-288.
 23. Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H, Tsuji H, Shide K, Kamao M, Chiba T, Inagaki N, Okano T, Kido S. High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2009, 20: 935-942.
 24. Zofkova I. Bone tissue as a systemic endocrine regulator. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2014.
 25. Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 2013, 19: 254-263.
 26. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 89: 747-754.
 27. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, Reinert CM, Tjia JS, Pierce WA, Wozney JM, Li XJ. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 1998, 13: 1483-1490.
 28. Boufker HI, Lagneaux L, Najar M, Piccart M, Ghanem G, Body JJ, Journe F. The Src inhibitor dasatinib accelerates the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into osteoblasts. *Bmc Cancer*, 2010, 10.
 29. Postiglione L, Domenico GD, Montagnani S, Spigna GD, Salzano S, Castaldo C, Ramaglia L, Sbordone L, Rossi G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces the osteoblastic differentiation of the

- human osteosarcoma cell line SaOS-2. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72: 85-97.
30. Wallace JM, Orr BG, Marini JC, Holl MMB. Nanoscale morphology of Type I collagen is altered in the Brl mouse model of Osteogenesis Imperfecta. *J Struct Biol*, 2011, 173: 146-152.
 31. Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*, 2010, 3: 3867-3910.
 32. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27: 1399-1409.
 33. Ngiam M, Liao S, Patil AJ, Cheng Z, Chan CK, Ramakrishna S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, 2009, 45: 4-16.
 34. Penk A, Forster Y, Scheidt HA, Nimptsch A, Hacker MC, Schulz-Siegmund M, Ahnert P, Schiller J, Rammelt S, Huster D. The pore size of PLGA bone implants determines the de novo formation of bone tissue in tibial head defects in rats. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 2013, 70: 925-935.
 35. Dogan A, Demirci S, Bayir Y, Halici Z, Karakus E, Aydin A, Cadirci E, Albayrak A, Demirci E, Karaman A, Ayan AK, Gundogdu C, Sahin F. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2014, 44: 246-253.
 36. Stacey E.: Central Nervous System. In Mills SE (eds). *Histology for Pathologist*. 3th ed. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins; 2007. chapter 11.
 37. Lahiri D, Singh V, Benaduce AP, Seal S, Kos L, Agarwal A. Boron nitride i.nanotube reinforced hydroxyapatite composite: mechanical and tribological performance and in-vitro biocompatibility to osteoblasts. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2011, 4: 44-56.

38. Goranov NV.,2007,Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. Vet Clin Pathol 36;192-195.
39. Könte H.,1984, Otojen Kranial fragmanlar ile kranial defektlerin primer tamiri.Uzmanlık Tezi,Atatürk Üniversitesi,Erzurum.
40. Şekerci, Z., Yılmaz, R.E., 2010, Temel nöroşüroloji, Türk Nöroşüroloji Derneği Yayınları,1(10), 473-483,
41. Wilkins, R.H.R., 1998, S.S: Neurosurgery. McGraw-Hill.
42. Sanan, A.H,S.J., 1997, Repairing Holes in the Head: A history of Kranioplasty.Neurosurgery 40:588-603.
43. Reeves, OL., 1950, Kranioplasty. Springfield. Charles e. Thomas.
44. Meekeren, J., 1968, Observationes Medico-Chirurgicae., Amsterdam, Ex Officina Henrici & Vindae Theodari Boom.
45. Asenjo, A., 1963, Neurosurgical Techniques. Springfield. Charles C Thomas.
46. Burrell, HL., 1888, The reimplantation of a trephine button of bone. Boston Med Surg J. 118;313-314.
47. Seydel, 1889, Kleinere Mitteilungen. Zentralbl Chir 16:209-211.
48. Dobrotworski, WJ., 1911, Die Rippen aiz Materialzur Knochenautoplastik. Zentralbl Chir.32: 1181-1183.
49. Morestin, H., 1915, Les transplantations cartilagineuses dans la chirurgie reparatrice. Soc Chir Bull Mem 41: 1994,2046.
50. Sicard, D: Resultants e loignes des kranyoplasties par homoplaque osseuse cranienne. Rev.Neurol 25:517518.
51. Finkemeier CG.,2002; Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am; 84-A(3): 454–464.
52. Badie, B, Preston J.K., Hartig G.K., 2000, Using titanium mesh for reconstruction of large anteriorcranial base defects. J Neurosurg 93:71 1-714.
53. Iwama, T, Yamada J, Imai S, Shimoda J, Funakoshi T, Sakai N., 2003, The use of frozen autogenous bone flaps in delayed karnioplasty revisited Neurosurgery 52:591-596;disussion 595-596.

54. Rish, BL, Dillon JD, Meirowsky AM, Caveness WF, Mohr JP, Kistler JP, Weiss GH., 1979, Kranioplasty: A review of 1030 cases of penetrating head injury. *Neurosurgery* 4:381-385.
55. Datti, R, Cavagnaro G, Camici S., 1985, Stainless steel wire mesh kranioplasty: ten' years experience with 183 patients (100 followed up). *Acta neurochir (Wien)* 78; 133-135.
56. Tokoro, K, Chiba Y, Tsubone K., 1989, Late infection after kranioplasty-review of 14 cases. *Neurological Med Chir (Tokyo)* 29: 196-201.
57. Miyake, H, Ohta T, Tanaka H., 2000, A new technique for kranioplasty with L-shaped titanium plates and combination ceramic implants composed hydroxyapatite and tricalcium phosphate (Cerattice) *Neurosurgery* 46:414-416.
58. Ergin N., Kadioğlu H.H., 1996, Reconstruction of cranial defects homolog bone with acrylic, otolog and homolog bone grafts. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 6: 24 – 27.
59. Başarır K, Selek H, Yıldız Y, Sağlık Y. 2005, [Nonvascularized fibular grafts in the reconstruction of bone defects in orthopedic oncology. *Acta Orthop Traumatol Turc* 39(4):p.300-306.
60. Jablonski P, Goh BL, Maguire J, Glogowski I, Howden BO, Thomson NM, Stein AN. 2005, Apoptosis and the expression of genes of the Bcl-2 family and TGF-beta1 in rat renal allografts transplanted after donor-specific blood transfusion. *Transplant Proc.* 37(1): p.93-95.
61. Bernard GW., 1991, Healing and repair of osseous defects. *Dent Clin North Am*;35(3): 469.
62. Chapman MW, Bucholz R, Cornell C., 1997, Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* , 79(4): 495-502.
63. Grimm B, Blom AW, Miles AW, Turner IG. 2002., In vitro endurance testing of bone graft materials for impaction grafting. *Bioceramics*; 14: 375-378.
64. Swain SK., 2009, Processing of porous hydroxyapatite scaffold. Thesis of master of technology in ceramic engineering, Rourkela National Institute of Technology.

65. Heise U, Osborn JF, Duwe F.,1990, Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *Int Orthop*; 14(3): 329-338.
66. Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco P.,1999, Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: Evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. 24(6): 579-589.
67. Balçık C, Şenköylü A, Koç N, Timuçin M, Korkusuz P, Korkusuz F.,2003, Segmenter defekt içeren uzun kemik kırıklarının tedavisinde kullanılan gözenekli hidroksiapatit ve kalsiyum fosfat seramik bloklarının in vivo uyumluluğu. *J Arthroplasty & Arthroscopic Surgery*; 14: 39-44.
68. Weimer, A.W., 1997. Carbide, Nitride and Boride Materials Synthesis and Processing. Chapman&Hall, London.
69. Demirci, S., Dogan, A., Sisli, B., Sahin, F., 2014. Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. *Cryobiology*.
70. Nielsen, F.H., Meacham, S.L., 2011. Growing Evidence for Human Health Benefits of Boron. *Journal of EvidenceBased Complementary & Alternative Medicine* 16, 169-180.
71. Nielsen, F.H., Stoecker, B.J., 2009. Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* 23, 195-203.
72. Ekavianty, P., Han, Y.H., Kim, B.N., Kim, Y.M., K., E., Y.K., J., Kim, D.I., Kim, K.H., Kim, S., 2013. Characterization of Boron Nitride-Reinforced Hydroxyapatite Composites Prepared by Spark Plasma Sintering and Hot Pres. *Journal of the Ceramic Society of Japan* 121, 344-347.
73. Lahiri, D., Singh, V., Benaduce, A.P., Seal, S., Kos, L., Agarwal, A., 2011. Boron nitride nanotube reinforced hydroxyapatite composite: mechanical and tribological performance and in-vitro biocompatibility to osteoblasts. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 4, 44-56.
74. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Oxford, pp 543.

75. Gülçin,İ.,2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of Toxicology, 345-391.
76. Kanfer JG, Ashwell JJ, Burns JJ.,1960, Formation of L-lyxonic and L-xylonic acids from L-ascorbic acid in rat kidney. J Biol Chem; 235: 2518–2521.
77. Fırat, S., 1997. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon glutatyonperoksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.D. Uzm.Tezi, Ankara.
78. Takeuchi K, Kagawa S, Mimaki H, Aoi M, Kawauchi S.,2002, COX and NOS isoforms involved in acid-induced duodenal bicarbonate secretion in rats. Dig Dis Sci; 47: 2116–2124.
79. Mates, J.M., Sanchez-Jimenes ,F., 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Front Biosci, 339-345.
80. Maraschiello C, Sárraga C, García RJA.,1999, Glutathione peroxidase activity, TBARS, and a-tocopherol in meat from chickens fed different diets. J Agric Food Chem;867-872.
81. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE.,1992, Free Radicals Antioxidants and Human Disease, Where are we now? J La Cli Med; 119(6): 598-620.
82. Ikeda Y, Anderson JH, Long DM.,1989, Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema. Neurosurgery ; 24: 679-684.
83. Rangan U, Bulkley GB.,1993, Prospects for treatment of free radical mediated tissue injury. Br Med Bull; 49: 700-718.
84. Lighthall JW, Anderson TE, 1994, The neurobiology of cenral nervous system trauma. New York/Oxford: Oxford University Press, 3–12.
85. Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM, 1994. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. J Neurotrauma 11: 499 – 506.
86. Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T, 2002. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat. Nat Rev Neurosci 3: 574– 579.
87. Bayramiçli, M., 2005. Deneysel Mikrocerrahi (1. bs.). İstanbul: Argos.

88. Cantürk, N. Z., Sayek, İ., 2005. Cerrahi Araştırma. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri.
89. Stula,1980, Cranioplasty effects after decompressif craniotomy: CT analysis. *Neurochirurgia* 23: 41-46.
90. Bostrom R, Mikos A,1997, Tissue engineering of bone. In: Atala A, Mooney DJ, Vacanti JP, et al (eds). *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*, vol 1. Boston: Birkhauser,:215–234
91. Ozerdem OR, Anlatıcı R, Bahar T, Kayaselcuk F, Barutcu O, Tuncer I, Sen O,2003, Roles of periosteum, dura, and adjacent bone on healing of cranial osteonecrosis. *J Craniofac Surg.* 14(3):371-9; discussion 380-382
92. Hobar PC, Schreiber JS, McCarthy JG, Thomas PA,1993, The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. *Plast Reconstr Surg.* 92(3):405-410.
93. Younger EM, Chapman MW.,1989, Morbidity at bone graft donor sites. *J orthop Trauma*; 3(3):192-195.
94. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS,1995, Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity: a statistical evaluation. *Spine* 20(9): 1055-1060.
95. Fleming, JE Jr, Cornell CN, Muschler GF., 2000, Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am*; 31 (3): 357-74.
96. Nemeth Z, Suba Z, Hrabak K, Barabas J, Szabo G.,2002, Autogenous bone versus betatricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations 2-3D CT, histologic and histomorphometric evaluations. *Orv. Hetil.*;143:25:1533-1538
97. Sanders D.L., Reinisch L.,2000,Wound Healing and collagen thermal damage in 7,5 µsec pulsed carbondioxide laser skin incisions, *Lasers. Surg. Med.*26:22-32
98. Walsh WR, Morberg P, Yu Y, Yang JI, Haggard W, Sheath PC, Svehla M, Bruce WJ.,1995, Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect.*Clin Orthopedic*;406:228-36.
99. Bostman O, Pihlajamaki H.,2000, Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: A rewiev. *Biomaterials.*21:2615-21

100. Cornell CN.,1999, Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 30:591-8.
101. Ruhaimi KA.,2000, Effect of adding resorbable calcium sulfate to grafting materials on early bone regeneration in osseous defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 6: 859-64.
102. Moore wr,Grave SE, Bain GI,2001, Synthetic bone graft sustitues.Australia and New Zealand Journal of Surgery 71: 354-61
103. Foitzik C, Darmstadt HS.,1999. Pure-phase Tricalcium phosphate for bone substitution in periodontal disease. *Quintessence.*;50:1049-58.
104. Erkoçak A.,1980, Genel Histoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 236-257.
105. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA 2007. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current opinion in pharmacology* 7:355-359.
106. Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK, Herunsalee A, Charuchongkolwongse S, Niumsukul S, Srichairat S ,2005, Antioxidative and cardioprotective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biological & pharmaceutical bulletin* 28:1165-1171.
107. William T. Couldwell, M.D., PH.D., Thomas C. Chen, M.D., Martin H. Weiss, M.D., Takanori Fukushima, M.D., D.M.Sc., William Dougherty, M.D.1994, *J Neurosurg* 81:483-486.
108. Simpson, D., 1965 Titanium in kranioplasty. *J Neurosurg* 22.292-293.
109. Spence, WT., 1954, Form-fittig plastic kranioplasty. *J Neurosurg* 11.219-225.
110. Stylianos P., Jacob G., Sergey S.,2015, Potential neurotoxic effects of polymethylmethacrylate during kranioplasty. *Journal of ClinicaNeuroscience* 22, 139-143.
111. High prevalence of brain pathology in violent prisoners: a qualitative CT and MRI scan study Kolja Schiltz • Joach Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci (2013) 263:607–616 . DOI 10.1007/s00406-013-0403-6.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

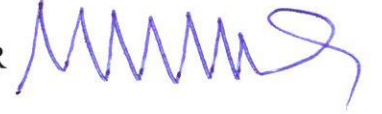
**BORNİTRÜR VE HİDROKSİAPATİT EMDİRİLMİŞ SCAFFOLD VEYA
OTOGREFT KRANİYOPLASTİSİ İLE KRANİYOTOMİ DEFEKTİNİN RAT BEYİN
PARANKİMİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr.Özkan ARABACI

Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi: 07/01/2010
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi: 06/07/2015
Uzmanlık Sınavı Tarihi: 06/07/2015

Tez Danışmanı

:Yrd.Doç.Dr.MürtezaÇAKIR



Jüri Üyesi

:Prof.Dr.Hakan Hadi KADIOĞLU



Jüri Üyesi

:Op.Dr.Coşkun YOLAŞ



Prof.Dr.Hakan Hadi KADIOĞLU
Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana Bilim Dalı Başkanı

TEMMUZ 2015
ERZURUM