

**T.C.
TRAKYA
ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK
REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Erol BENLİER

DOKSİSİKLİNİN KEMİK GREFTLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Devran İĞREK

EDİRNE - 2019



TEŞEKKÜR

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan annem, babam ve her zaman yanımda olan sevgili eşime, asistanı olmaktan gurur duyduğum tez danışman hocam Prof. Dr. Erol BENLİER'e, hoşgörüsü ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Hüsametdin TOP'a, yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Dağhan DAĞDELEN'e, tüm klinik ve ameliyathane çalışanlarımıza teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
KEMİK DOKUNUN GENEL YAPISI.....	3
KEMİK KIRIKLARI	8
KEMİK GREFTLERİ.....	10
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR.....	14
DOKSİSİKLİN.....	17
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	19
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA.....	38
SONUÇLAR.....	42
ÖZET	43
SUMMARY	45
KAYNAKLAR.....	47
EKLER.....	53

SİMGE VE KISALTMALAR

ALP	: Alkalen Fosfotaz
Ca	: Kalsiyum
CaPO₄	: Kalsiyum Fosfat
DDKKA	: Deminarelize dondurulmuş kurutulmuş Allogreft
ESM	: Ekstraselüler Matriks
İM	: İntramuskuler
M-CSF	: Makrofaj- Koloni Stimüle Edici Faktör
MDKKA	: Mineralize Dondurulmuş Kurutulmuş Allogreft
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NF-κB	: Reseptör Aktivatör Faktör Kappa
P	: Fosfor
TIMP	: Matriks Metalloproteinaz doku İnhibitörü
Zn	: Çinko

GİRİŞ VE AMAÇ

İskelet sistemi ile ilgili kemik defekti problemleri günümüzde rekonstrüktif cerrahinin önemli uğraş alanlarından biridir. Kemik defektlerinin onarımı ile ilgili tarih boyunca çeşitli operasyonlar planlanmış ve yapılmıştır. Kemik defektleri, travmaya, tümöral sebeplere, enfeksiyonlara, gelişimsel anomalilere ve kırıklar gibi sebeplere bağlı olarak gelişebilmektedir. Konjenital veya sonradan meydana gelen kemik defektlerinin onarımında sıklıkla greft kullanımı gerekmektedir. Kemik greftlemesinde de altın standart uygulama otojen kemik greftlerinin kullanılmasıdır. Otojen kemik greftleri kullanılarak yapılan operasyonlardan sonra greft kayıpları yaşanabilmektedir. Yeni bir otojen kemik grefti kaynağının kullanılması donör alan yetersizliği, donör alanda enfeksiyon, sinir hasarı oluşturma ihtimali, operasyon süresinin uzaması, hastanın hastanede yatış süresinin uzaması gibi sorunları beraberinde getirmektedir. Bu problemlerden dolayı tarihsel süreç içerisinde ve günümüzde otojen olmayan allogreftler, alloplastik materyeller, zenogreftler gibi kemik kaynakları kullanılmaktadır. Bu kemik grefti kaynaklarında kendi içerisinde hastalık taşıma, immün reaksiyon oluşturma, otojen kemik kaynakları gibi iyileşme gösterememe gibi problemler gösterebilmektedir. Günümüzde halen otojen kemik grefti dışında ideal kemik grefti materyali oluşturmak için çalışmalar devam etmektedir.

Otojen kemik greftlerinin diğer kemik grefti materyellerine üstünlükleri mekanik, biyolojik, immünojenik açıdan vücutla aynı olmasıdır. Bulaşıcı hastalık ve rejeksiyon riskinin olmaması önemlidir. Osteojenik özelliğe sahip tek kemik grefti kaynağıdır. Bu özelliklerinden dolayı iyileşme süresini kısaltması, ikinci bir operasyona ihtiyacı azaltması, hastanede yatış süresini azaltarak hastanın daha kısa sürede günlük yaşantısına dönmesini sağlamaktadır.

Tetrasiklin grubu ilaçlardan biri olan doksisiklin bakteriyostatik olarak etki gösteren bir antibiyotiktir. Ancak yapılan çalışmalarda antimikrobiyal etkilerinin yanında birçok hücresel fonksiyonu da etkileyen pluripotent ilaçlar olduğu gösterilmiştir. Bu etkilerinden biriside matriks metalloproteinaz inhibisyonudur. Doksisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin matriks metalloproteinaz inhibisyonu yoluyla, yara iyileşmesinde kollojenazları inhibe ettiği, aortik anevrizmada damar intima kalınlığında azalttığı, artritlerde doku yıkımını azalttığı, tümör hücre invazyonunu tümör metastazı ve tümör anjiyogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Biz de bu çalışmada otojen kemik greftlerinin kaybının ve rezorbsiyonun azaltılması amacıyla rat modelinde doksisiklinin kullanarak matriks metalloproteinaz inhibisyonu yoluyla rat femurundan alınan segmenter kemik parçasını yerine tekrar intramedüller çivileme yöntemiyle iade ederek kemik greftinin kırık hattındaki iyileşmesinin üzerine olan etkisini görmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

KEMİK DOKUNUN GENEL YAPISI

Yetişkin iskeletin ana yapısını oluşturan kemik dokusu yumuşak dokuları destekler, kafatasının üst kısmı ve göğüs kafesi boşluklarında olduğu gibi, hayati önem taşıyan organları korur ve kan hücrelerini yapan kemik iliğini barındırır. Kemik ayrıca kalsiyum, fosfat ve diğer iyonlara ait bir depo olarak iş görür ve bu önemli iyonların vücut sıvılarındaki derişimlerini sabit tutabilmek için, kontrollü olarak salınmasını sağlar (1). Kemikler, iskelet kası kasılmaları ile oluşan kuvvetleri çoğaltarak, bunları vücut hareketlerine dönüştüren bir kaldıraç sistemi oluştururlar.

Kemik doku osteoblast, osteosit ve osteoklastlardan oluşur. Osteoblastlar; mineralize olan ve kemiği oluşturan bağ dokusu matriksini yaparlar. Osteoblastların prekürsörleri; kemik iliği stromal hücreleri, kondrositler, kas hücreleri ve adipositleri de oluşturan multipotentmezenşimal kök hücrelerdir (1). Matriksin sentezi esnasında osteoblastlar, aktif protein sentezi yapıp salgılayan hücrelerin yapısına sahiptir. Matriksin salgılanması, daha önce yapılmış kemik matriksi ile temas halinde olan osteoblast yüzeylerinden olur. Böylece yeni fakat henüz kalsifiye olmamış matriks, osteoblastlar ile daha önce meydana gelmiş kemik matriksi arasında yer alır. Bu olaya "kemik appozisyonu" denir (2) ve zamanla Ca^{+2} tuzlarının çökmesi ile kalsifikasyon tamamlanır. Bazı osteoblastlar gittikçe yeni meydana gelmiş matriks ile kuşatılırlar ve osteositlere dönüşürler (3). Bu sırada lakünaları oluştururlar.

Osteositler; Kemik matriksi içerisinde lakünlara yerleşmiş hücrelerdir. Osteositler kemik gelişimini regüle eden büyüme faktörlerini salgılar. Osteositler ve onların dendritik uzantıları periferel dolaşım ile devamlılık gösteren jel yapısındaki bir matriks ile çevrilidir. Aktif olarak kemik matriksin bakımından sorumlu bu hücrelerin ölümlerini takiben matriks erimesi görülür.

Osteoklastlar; Kalsifiye kemik matriksini sindirme kapasitesi olan özelleşmiş çok çekirdekli (sitoplazmalarında çok miktarda mitokondri ve alkalenfosfataz içerirler) hücrelerdir. Mononükleermonosit/makrofaj öncülerinin füzyonu sonucunda oluşurlar. Reseptor activator faktor kappa B (NF-kB) ligandı (RANKL) ve makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) osteoklastların gelişimi, fonksiyonu ve hayatta kalması için esansiyel olan iki sitokindir (1). Osteoklastlar trabeküler yüzey üzerinde yada kortikal kemik içerisinde belli bir limite kadar mineral ve matriksi ortadan kaldırır. Kemik remodelizasyonu sırasında sayısı azalan, rezorbsiyonun arttığı durumlarda ise sayısı artan hücrelerdir. Rezorbsiyon sırasında Howship lakünalarını olarak adlandırılan alanları oluştururlar. Aynı zamanda hormonalara karşı çok duyarlı olup osteoblastlarla uyumlu olarak çalışarak kemiğin yıkımı ve şekillenmesinde önemlidirler (4).

Kemik Dokunun Kanlanması

Kemik dokusunun dolaşımı üç farklı vasküler sistem tarafından sağlanır. Bunlar medullar sistem, metafizyel sistem ve periosteal sistemdir. Diafiz bölgesini medullar sistem tarafından kanlandırılır. Metafiz bölgesi kansellöz kemiğin baskın olarak bulunduğu alandır ve metafizyel sistem tarafından kanlandırılır. Periosteal sistem kemiğin dış kortikalindeki kanlanmadan sorumludur (5). Bu sistemler arasındaki anastomozlar oldukça güçlüdür ve herhangi birinde sorun olursa diğer sistemler baskın hale gelerek bu açığı kapatır.

Kemik Matriksi

Kemik matriksinin yaklaşık %50 - %60' ını inorganik maddeler oluşturur geri kalan kısım organik kemik matriksidir (1). Kemik organik matriksi osteoblastlar tarafından salgılanan ve osteoid adı verilen mineralize olmamış organik yapıdan oluşur. Organik yapının % 90'ını tip I kollajen; % 10'unu ise proteoglikanlar, kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyalüronik asit ve non-kollajen proteinler meydana getirir (6). Kemikte bulunan kollojen yapının vücuttaki diğer kollojenlerden farklı olarak mineralize olma özelliği vardır (7).

Nonkollojen matriks proteinleri osteoblastlarca sentezlenen osteonektin, osteopontin ve osteokalsindir. Bunlar kemiğin mineralizasyonunda görev alırlar. Özellikle osteokalsinin osteoblast inhibisyonu yapması önemlidir.

Kemiğin inorganik elemanları özellikle kalsiyum ve fosfordur. Bununla birlikte magnezyum, sitrat, potasyum ve sodyumda bulunur. Kalsiyum ve fosfor birlikte hidroksiapatit kristallerini oluşturur. Hidroksiapatit kristallerinin kollojen liflerle ilişkisi kemik dokunun sertliğini ve direncini belirler (8).

Kemik Zarları

Periosteum ve endosteum: Kemiğin iç yüzeyinde endosteum, dış yüzeyinde periosteum bulunmaktadır. Tabakalar halinde kemik yapan hücreler ve bağ dokusu ile örtülüdürler (9).

Periosteum kollejen lif ve fibroblastlardan oluşan bir dış tabakaya sahiptir. Uzun kemiklerin eklem yüzeyleri hariç bütün kemiklerin dış yüzeyini kaplar. İç yüzeyinde osteojenik, dış yüzeyinde fibröz tabakası bulunur (10). Fibröz tabakada fibroblastlar, duysal ve sempatik sinir lifleri, kan damarları yerleşmiştir (11). İç tabakasında bulunan osteoprogenitör hücrelerin travmaya sekonder olarak aktive olma yeteneği vardır. Periosteumun esas görevi kemik dokusunu beslemek, apozisyonel kemik büyümesini sağlamak ve kemik tamiri için destek sağlamaktır (9). İçerisinde bulunan kollojen lif demetleri sharpey liflerini oluşturur, bu lifler matriks içine uzanarak periosteumu kemiğe bağlar (12).

Endosteum kemik içindeki bütün boşlukları astarlardan kalın bir hücre tabakasıdır ve osteoprogenitör hücreler sahiptir. Bu hücreler kemik matriksini salgılayan hücrelere, osteoblastlara veya iç yüzeyi döşeyen kemik astar yapısına dönüşebilme yetisine sahiptir. Kemik yapımının yanı sıra hematopoetik hücre yapma yetenekleri de vardır (13).

KEMİK DOKUSU TİPLERİ

Primer Kemik Dokusu

İntrauterin hayatta bulunan ve ilk şekillenen kemik dokusudur. Olgunlaşmamış kemik dokusu da denir. Kırık iyileşmesinde bulunan ilk kemik dokusudur. Mineral miktarı azdır ve kollejen lifleri düzensizdir. Yetişkinlerde primer kemik dokusu; diş alveollerinde, kafatası yassı kemiklerinin sutura kısımlarında ve tendon kemik bileşkelerinde bulunur.

Sekonder Kemik Dokusu

Erişkinlerde bulunan olgun kemik türüdür. İkincil kemik dokusunda kollejen lifleri düzenli şekilde sıralanmıştır ve nörovasküler yapıların etrafında osteon (havers) sistemini oluşturur (14). Havers sistemi dış dairesel lamelcikler iç dairesel lamelcikler ve interstisyel lamelciklerden oluşur. İç dairesel lameller kemik iliği etrafında, dış dairesel lameller periostun hemen altında yerleşimlidir. Her iki lameller arasında interstisyel lameller ve diğer havers sistemleri yerleşmiştir (15). Sekonder kemik dokusunun iki alt grubu vardır; Spongioz kemik ve kompakt kemik.

Spongioz kemik yapısal olarak kompakt kemiğe benzer ancak süngerimsi bir yapıya sahiptir. Yoğunluğu düşük ve esnektir. Trabeküler bir yapıya sahiptir bu yapısından dolayı kemik iliği ile doludur ve kanlanması yüksektir (13). Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ile yassı kemiklerin iç yüzleri süngerimsi kemikten yapılmıştır.

Kompakt kemik dokuya dokuya çıplak gözle bakıldığında homojen ve kompakt görünür. Kollejen lifleri düzenli şekilde sıralanmıştır. Mikroskobik incelemede kemiğin uzun eksenine paralel seyreden Havers kanalları ve bunları birbirine bağlayan Volkman kanallarından oluşur (16). Matriksi sertleşmiş kemik dokusunun beslenmesi bu kanallarda bulunan kan damarlarından çıkan besleyici maddelerin difüzyonu ile sağlanır. Volkman kanalları periosteum ve endosteum arasında yerleşmiştir. Nörovasküler yapıların endosteum ve periosteum arasındaki aynı zamanda haversian sistemle olan bağlantısını sağlar.

KEMİKLEŞME (OSSİFİKASYON)

Kemikleşme Embriyonel dönemde ve doğumdan sonra bağ doku ve kıkırdak dokunun kemiğe dönüşmesine kemikleşme denir. Kemikleşme intrauterin hayatın 7.-12. Haftaları arasında başlar ve 20-25 yaş aralığına kadar yavaşlayarak devam eder.

İntramembranöz Kemikleşme (Zar İçinde Kemikleşme)

Kemiğin, direkt olarak embriyonel dönem bağ dokusu olan mezenkimal doku üzerinden oluşmasıdır. Mezenkimal hücreler hızla bölünerek osteoprogenitör hücrelere onlarda osteoblastlara dönüşürler. Osteoblastlar kemik doku ara maddesini sentezler ve osteositlere dönüşürler. Osteositlerden salgılanan osteoid doku, kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) iyonları Alkalen Fosfotaz (ALP) enziminin etkisiyle birleşerek kalsiyum fosfat (CaPO_4) oluşturur. Yassı kemiklerde bu şekilde kemikleşme görülür (17).

Endokondral Kemikleşme (Kıkırdak İçi Kemikleşme)

Kemiğin bağ dokudan hiyalin kıkırdaka dönüşüp daha sonra oluşmasıdır. Endokondral kemikleşmede embriyonik mezenkimal hücreler, gelişmekte olan kemiğin yaklaşık boyut ve şeklinde kıkırdak bir kalıp oluşturmak için yoğunlaşırlar (18). Uzun ve kısa kemiklerde bu şekilde kemikleşme görülür. Kemikleşmenin başladığı odaya ossifikasyon merkezi denir. Ossifikasyon merkezleri kemik tiplerine göre farklılık gösterir. Dinamik bir süreç olarak sürekli devam eder.

ANATOMİK YAPILARINA GÖRE KEMİK TİPLERİ

Uzun Kemikler

Kemiğin uzunluğu, genişlik ve kalınlığından fazladır. Kol, ön kol, uyluk, bacak ve parmak kemikleri uzun kemiklerdir. Epifiz, metafiz, diafiz şeklinde üç bölümden oluşurlar. Diafiz kısmında cavitas medullaris bulunur ve sarı kemik iliğini içerir (19).

Kısa Kemikler

Uzunluğu, genişliği ve kalınlığı birbirine eşit olan kemiklerdir. Tarsal kemikler, karpal kemikler kısa kemiklerdir (19).

Yassı Kemikler

İnce, yassı ve kavisli kemiklerdir. Kafatası kubbesi kemikleri, kostal kemikler, skapula ve iliak kemik yassı kemiklerdir (19).

Düzensiz Kemikler

Uzun, kısa ve yassı kemik tiplerinden herhangi birine uymayan, belli bir şekli olmayan kemiklerdir. Düzensiz kemikler baskılara karşı son derece sağlam kemiklerdir. Omurlar, alt çene ve üst çene kemikleri düzensiz kemiklerdir (19).

Susamsı Kemikler

Bazı tendonlar ile kasları kemikleri bağlayan fibröz bağlar içinde bulunan kemiklerdir. Diz kapağı kemiği tipik susamsı kemiktir (19).

KEMİK KIRIKLARI

Kırık, kemiğin kortikal ve periosteal devamlılığının bozulması olarak tanımlanır (20). Kırık iyileşmesi kırılma anından başlayan ve yıllarca devam eden dinamik bir süreçtir. Kırık iyileşmesinde en önemli faktör kanlanmadır. Kemik iyileşmesi kırığın oluşmasını takiben başlayan kompleks biyolojik olaylar sonucunda gerçekleşir. Bu süreçte gerçekleşen intrasellüler ve ekstrasellüler olaylar büyüme faktörleri, vaskülarite, oksijenizasyon, pH, hormonlar, elektriksel yoğunluk ve mekanik stabilite gibi pek çok faktörden etkilenir. Kemik kırıklarının sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (20):

Etyolojik faktöre göre;

- Travmatik kırıklar
- Patolojik kırıklar
- Stres kırıkları

Dış ortam ile ilişkisine göre;

- Kapalı kırıklar
- Açık kırıklar

Deplasman durumlarına göre;

- Nondeplase kırıklar
- Deplase kırıklar
 1. Translasyon derecesi
 2. Angulasyon derecesi
 3. Rotasyon derecesi

Kırık paternine göre;

- Transver kırıklar
- Oblik kırıklar
- Spiral kırıklar
- Segmental kırıklar
- Komünike kırıklar

Primer Kırık İyileşmesi

Rijit internal fiksasyonla görülen dış kallus gelişmeden olan iyileşmedir. İlk aşamada osteoklastlar Havers kanallarından geçerek nekrotik kemik alanlarının rezorbsiyonunu yapar ardından osteoblastlar vasküler alanlar içeren osteonları oluşturur ve immatür karakterde olan kemik dokusu oluşur. Bu oluşan immatür kemik dokusu birkaç ay içerisinde matür forma döner.

Sekonder Kırık İyileşmesi

Kırığın kapalı yöntemle operasyon yapılmadan veya bazı operasyonlar sonrası olan iyileşme şeklidir. Histolojik olarak iyileşme süresindeki evreler birbirinden zaman olarak kesin sınırlarla ayrılamaz. Her evre daima kendinden bir önceki veya birsonraki evre içinde

bulunur. Kırık iyileşmesindeki en uzun evre yeniden şekillenme, en kısa evre enflamasyon evresidir.

Cruess ve Dumont' a göre ikincil kırık iyileşmesinin 3 evresi vardır:

1. Yangı (enflamasyon) evresi
2. Onarım (reperasyon) evresi
3. Yeniden şekillenme (remodeling) evresi

Enflamasyon fazı: Kırık oluşumu ile beraber kemik matrikste hasarlanma, periost ve endosteumda laserasyonlar, hücrelerde nekroz ve kemik kırık uçlarının yer değiştirmesi meydana gelir. Vasküler bütünlüğün bozulduğu kırık alanında osteositlere giden kan akımı azalır ve boş lakünalar, lizis ve piknotik görünümde osteositler oluşur. Kırık alanında kan ve lenf birikimi oluşarak hematoma gelişir. Hematom kırık iyileşmesinde önemli bir aşamadır, kırık uçlarını bir arada tutar fakat açık kırıklarda hematomun dışarıya disloke olması iyileşmeyi geciktiren bir durumdur (20). Diğer yara iyileşme süreçlerine benzer şekilde, bu evrede makrofajlar, nötrofiller, trombositler ve yaralanan kemik hücreleri tarafından üretilen IL1, IL6, TNF A gibi proenflamatuar moleküllerin salınımı ile karakterizedir. Bu moleküller yaralanmayı izleyen 24 saat içerisinde en üst düzeye ulaşır ve kırığı izleyen 72 saatte en alt düzeye geriler.

Onarım evresi: İkinci gün başlayıp 40. güne kadar devam eden ve primer kallus yapısının oluştuğu aşamadır. Onarım fazı hematomun organize olmasıyla başlar. Bu aşamada lokalsitokinlere cevap veren periosteal ve endosteal progenitör hücreler, fibroblast, kondroblast ve osteoblast oluşturmak üzere farklılaşırlar. İlk 2 hafta içerisinde primerkallus dokusu oluşur. Kemik uçları ayrı ise yumuşak (köprü) kallus dokusu oluşur. Yumuşak kallus endokondral kemikleşme sonucu sert kallusa dönüşür. Primer kallus dokuda Tip 2 kollajen baskın iken sert kallusa dönüşüm gerçekleştikçe Tip 2 kollojen Tip 1 kollajene dönüşür. Onarım fazı kırık uçları birleşene kadar, kortikal devamlılık sağlanana kadar devam eder. Kallus miktarını, içeriğini, şeklini; kemik yapısı, kırık etrafı yumuşak dokular, stabilite gibi birçok faktör etkiler

Remodelling evresi: Onarım evresinin ortalarında başlayıp yıllarca devam eden aktif bir süreçtir. Kırık iyileşmesi gerçekleştikten sonra kemiğin maruz kaldığı yüklerle orantılı olarak kemiğin normal konfigürasyonun ve şeklinin oluşması sağlanır. Sert kallus dokusu

lameller kemik ile sürekli yer değiştirir. Sert kallus bir yandan osteoklastların etkisiyle rezorbe edilirken, diğer yandan osteoblast etkisiyle lamellar kemik oluşumu sağlar (21).

KEMİK GREFTLERİ

Kemik defektleri enfeksiyonlara, tümörlere, travmaya, konjenital sebeplere bağlı olarak meydana gelebilir. Yüzyıllardır kemik defeklerinin onarımı için çeşitli yollar denenmiştir. İlk başarılı kemik grefti uygulaması Job Vanmeekeren tarafından köpek kafatasından alınarak yaralı bir askerin kafatasındaki kemik doku defektine yapılmıştır. Vanmerren ilk başarılı otojen kemik grefti cerrahisini yapmıştır. Otojen kemik grefti kullanımı kemik grefti cerrahisinde altın standart uygulamadır (22-24). Bunun yanı sıra allojenik, zenojenik, sentetik, inorganik kemik grefti seçenekleride günümüzde kullanılmaktadır. İdeal kemik greftinin taşıması gereken özellikler şu şekilde sıralanabilir (25-29);

- | | |
|--|---------------------------------------|
| - Greft materyali toksik olmamalı, | - Kolay uygulanabilmeli ve |
| - Antijenik olmamalı, | şekillendirilebilmeli, |
| - İritan olmamalı, | - Uygulandıkları bölgede osteojenik |
| - Karsinojenik olmamalı, | özellik göstermeli, |
| - Minimal enflamatuar reaksiyona | - Kolay elde edilebilmeli veya |
| sebeb olmalı, | üretilebilmeli, |
| - Biyomekanik olarak dokuların fiziksel | - Ucuz olmalı, |
| özelliklerine uyum gösterebilmeli, | - Fonksiyonel kuvvetlere karşı |
| - Çevre dokular ile uyumları iyi olmalı, | koyabilecek güç ve esneklikte olmalı, |
| - Bioadeziv olmalı, | - Çabuk iyileşmeli, |
| - Biokorozyona karşı dirençli olmalı, | - Enfeksiyona dirençli olmalıdır |

Kemik Greftlerinin İyileşmesi

Kemik greftlerinin iyileşmesi kemik kırık iyileşmesiyle benzer özellikler göstermektedir. Otojen kemik grefti yapıldıktan sonra alıcı dokuda hematoma ile kaplanır ve inflammatuar hücrelerce çevrelenirler. Bunlardan salgılanan sitokinler aracılığıyla yeni damar oluşumu başlar. Nonvaskülerize kemik greftlerinde ilk önce nekroz meydana gelir ve geriye bir miktar osteosit kalır. Alıcı kan damarları greft içerisine doğru proliferasyon olarak alıcı osteosit mezenkimal kök hücrelerin greft içerisinde çoğalmasını sağlar. Greft içerisindeki

Havers kanallarından vasküler büyüme gerçekleşir. Vasküler dokunun greft içerisine invaze olarak osteoblastların bu bölgeye gelerek yeni kemik üretimini katılmasına creeping substitution denir. Kortikal kemik greftleri hiçbir zaman tam olarak kansellöz kemik greftleri gibi dayanıklı hale gelemez çünkü nekrotik kemik alanları tam olarak rezorbe olmaz iyileşen kemikte ölü ve canlı kemik dokuları birlikte bulunur.

Osteointegrasyon: Greftin alıcı kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunabilmesidir. Alıcı kemik ile uygulanan greft arasında herhangi bir fibrotik doku meydana gelmeden kemik greftin tutunmasıdır.

Osteokondüksiyon: Greftin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik yapıcı hücreler için destek sağlamasıdır (30). Vücutta toksik reaksiyon göstermezler ancak yeni kemik oluşumunu indüklemeye yetenekleri yoktur. Hidroksiapatit, kollojen ve kalsiyum fosfat osteokondüktif özelliğe sahiptir.

Osteoindüksiyon: Uygulanan greft materyelinin plüripotent hücrelerin osteoblastik fenotipe dönmelerini uyarmaktır (31).

Osteogenesis: Greft hücresel elemanlarının nakledilen alanda yeni kemik oluşturabilmesidir. Yeni kemik oluşabilmesi için yeterli sayıda progenitör hücrenin ortamda olması gerekir. Osteogenez yalnızca taze otojen kemikte ve kemik iliği hücrelerinde bulunan bir özelliktir (26, 32-34).

Kemik İyileşmesin Etkileyen Faktörler

- 1) Greftleme yapılacak alanın debridmanının uygun şekilde yapılması ve alıcı alanın kanlanması iyi olduğundan emin olunması.
- 2) Greftleme yapılacak alanın daha önce radyoterapi almış olması alıcı sahanın mikrosirkülasyonunu bozar bu da greft rezorbsiyonunu artırır.
- 3) Greftin kansellöz kısmının alıcının kansellöz kısmı ile temas edecek şekilde yerleştirilmesi greft rezorbsiyonunu azaltır.
- 4) Kemik grefti alındıktan sonra 1 saat içerisinde alıcı alana adapte edilmelidir süre uzadıkça greftteki osteosit ve osteoblastların sayısı azalır.

- 5) Kemik greftin rijit fiksasyonu sağlanmalıdır bu sayede normal kırık iyileşmesi fazlalarının seyri sağlanır. Rijit fiksasyon hızlı revaskülarizasyonu, kompresyon ile greft ile alıcı alan arasındaki bağlantının artmasını sağlar.
- 6) Kemik grefti alınırken kullanılan kesici uçların keski olması ve uygun devirde çalışması sağlanmalı. Serum fizyolojik ile soğutularak greft uçlarında termal etkiye bağlı hücre kaybının önüne geçilmelidir.
- 7) Periostu korunmuş kemik greftlerin yaşayabilirliği daha fazladır.

Otojen Kemik Greftleri

Otojen greftler kansellöz greftler, damarlı ve damarsız kortikal greftler olarak ayrılabilir. Kemik greftleri kırık kaynaması gibi kanama, inflamasyon, revaskülarizasyon ve remodelasyon aşamalarından sonra kemik dokusuyla birleşir. Diğer kemik grefti materyellerine üstünlükleri mekanik, biyolojik, immünojenik açıdan vücutla aynı olmasıdır. Bulaşıcı hastalık ve rejeksiyon riskinin olmaması önemlidir. Otogreftler canlı osteojenik hücreleri, kemik matriks proteinlerini içerir ve kemik büyümesini destekler. Osteojenik özelliğe sahip tek greft materyeli otojen kemiklerdir. Vasküler olmayan otojen kemik greftleride operasyon sonrası ilk 5 gün osteojenik özelliğe sahiptir daha sonra bu özelliklerini kaybederler, osteoindüktif ve osteokondüktif etkileri devam eder (35).

Otogreftlerin uygulamalarında mevcut kaynakların kısıtlılığı, cerrahi alanda oluşturduğu ağrı, sinir yaralanması ve enfeksiyon riski olması kullanımlarını kısıtlar. Komplikasyon oranı %10'a kadar çıkabilir. Otolog kansellöz greftler kortikal greftlerle karşılaştırıldığında daha osteojenik olarak kabul edilmektedir. Kortikal greftteki yapısal boşluklar ve damarlardaki mikroanastomozlar sınırlı revaskülarizasyon ve besin difüzyonuna izin verir. Kansellöz greftler hemen ve güçlü bir yapısal destek sağlamamaktadırlar. Kansellöz kemik greftlerde erken dönemde mekanik destek gücü kortikal kemik greftlerdekinden daha az oranda izlenir. Kansellöz kemik greftler, kortikal greftin sağladığı mekanik destek güce ulaşmak için 6-12 ay arasında bir zamana ihtiyaç gösterirler. Osteoindüktif etkisi yüksek olmakla beraber iyileşme sonrası asıl olarak osteokondüktif bir işlev görür ve yeni oluşan kan damarlarıyla yeni osteoblast ve osteoblast prekürsörlerinin büyümesini destekler. Yaklaşık 6-8 hafta içinde kortikal grefte eşdeğer bir dayanıklılığa ulaşır. Otolog kortikal greftlerin osteoindüktif özellikleri neredeyse çok azdır, daha çok osteokondüktiftir. Otolog kortikal greftler acil yapısal destek gerektiren 5-6 cm

segmental defektlerde iyi bir seçenektir. Daha büyük defektlerde kemik doku içeren flepler tercih edilmelidir.

Otojen kemik kaynakları: Nonvaskülerize kaynaklar ve vaskülerize kaynaklar olarak ikiye ayrılır. Nonvaskülerize iliak krest, nonvaskülerize kalvaryel kemik, nonvaskülerize kosta greftleri, tibia, trokantermajor, olekranon ve Radius nonvaskülerize kemik kaynaklarına örnektir. Vaskülerize fibula, vaskülerize iliak krest, vaskülerize kosta, skapula, metatars ve Radius da vaskülerize kemik kaynaklarındandır.

Allojenik Kemik Greftleri

Allogreftler donör morbiditesi ve ağrı açısından otogreftlere iyi bir alternatiftir. Uygulaması ve temini otogreftlerden daha kolaydır. Allogreft kullanımının dezavantajı hastalık etkenleri bulaştırmaktır. Primer olarak osteokondüktiftir, içerdiği çeşitli büyüme faktörlerinin etkisiyle daha düşük oranlarda osteoindüktif etki gösterir. Allogreftlerin, jel, kollajen sünger gibi formlar da mevcut olmasına karşın genel olarak partikül formunda kullanılırlar. Kortikal veya spongios kemik bölgelerinden elde edilip, demineralize dondurulmuş-kurutulmuş (DDKKA) veya mineralize dondurulmuş-kurutulmuş (MDKKA) kemik allogrefti şeklinde hazırlanırlar.

Ksenogreftler

Başka türden canlıların kemiklerinin insanda kullanımıdır. Doğal kemik minerallerini taşımlarına rağmen organik komponent içermezler. Ksenogreftlerin oluşturdukları immün reaksiyon ve yüksek rezorbsiyon oranları nedeniyle insanda kullanışı olmadıkları görülmüştür.

Kullanılmakta olan ksenogreftler genellikle sığır kaynaklıdır. Deproteinize edilmiş sığır kaynaklı kemik greftinin insan kemik yapısına benzer özellikleri bulunmaktadır ve rezorbsiyona olan direnci otojen kemikten daha fazladır.

Alloplastik Kemik Greftleri

Alloplastik kemik greftleri insan veya hayvan kaynaklı değildir. Sentetik olarak elde edildikleri için bulaşıcı hastalık taşıma riskleri yoktur ancak azda olsa antijenik cevap oluşturma riskleri vardır. Hidroksiapatit, kalsiyumfosfat, trikalsiyum fosfat, bioaktif camlar bu gruptadır.

MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

Hücre matriks etkileşimleri, ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler tarafından düzenlenir. Proteolitik enzimler matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin denetlenmesi, hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümünde temel rol oynar. Bu enzim sistemlerinin içinde Matriks Metalloproteinazlar (MMP) önemli bir yer tutar. MMP'ler, ESM bileşenlerini yıkıma uğratan çinko (Zn^{++}) ve Ca^{++} bağımlı endopeptidaz ailesidir. Türlerine göre; endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, damar düz kas hücreleri, T lenfositler, trombositler, kondrositler, keratinositler, epitel hücreleri mezenşimal hücreler, nötrofiller, trofoblastlar ve osteoblastlar gibi çok çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir (36).

Matriksmetalloproteinazlar ilk olarak 1949'da depolimerize edici enzimler olarak tanımlanmıştır ve ilk tespit edildiklerinde tümör büyümesinde stromal oluşumu ve kan damarlarının oluşumunu arttırdığı düşünülmüştür. Günümüzde yapılan çalışmalar MMP enzim ailelerinin epifizlere ait kıkırdak displazileri, kanser ve metastaz, kalp yetmezliği ve serebraliskemide belirgin etkilerinin olduğu gösterilmiştir (37).

Matriks Metalloproteinazların Yapısı Ve Sınıflandırılması

Bu güne kadar tanımlanan 24 çeşit matriks metalloproteinazın belirli ortak yapısal özellikleri vardır. Üç bölgeye ayrılırlar. MMP'lerin tümü tipik olarak N terminalinde enzimin öncü dizilimi olan pre-domain içerirler. Bu öncü dizilim, enzimi salgılanma için işaretler ve salgılanma sonrasında kaybolur. İkinci bölge olan pro-domain, enzimin kalıcı formda kalmasından sorumlu olup enzimin etkinleşmesinin ardından kaybolur. Bir sonraki bölge Zn^{++} bağlayan bölümü içeren katalitik domaindir. Katalitik domain ek olarak 2- 3 Ca^{++} iyonu içerir. Bu bölge stabilite ve enzimatik etkinliğin oluşması için gereklidir (38).

Matriksmetalloproteinazlar hücre dışı proteinler olmakla beraber MMP-1, MMP-2 ve MMP-11'in hücre içinde de bulunup hücre içi proteinler üzerinde etkileri olabileceği bildirilmektedir. Matriksmetalloproteinazlar bu yapısal bütünlüğü düzenleme özelliğinden dolayı bazı fizyolojik olaylarda (kemik yeniden yapılanması, embriyonik gelişim, hücre göçü, yara iyileşmesi, doku rezorpsiyonu, blastokist gömülmesi, organ yapısının gelişimi, sinir büyümesi, ovulasyon, servikal genişleme, endometrial döngü, anjiyogenez, apoptozis) önemlidirler. MMP etkinliğinin denetiminin kaybolması sonucunda artrit, kanser, ateroskleroz, ülser, fibrozis ve anevrizma gibi hastalıklara yakalanma olasılığında artış

görülmektedir. MMP'lerin etkinlikleri matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) tarafından düzenlenmektedir. Günümüze kadar 24 farklı MMP tanımlanmıştır (39).

Substrat özgüllüğü, sekans benzerliği ve domain içeriği göz önüne alındığında vertebralılardaki MMP'ler altı kümeye ayrılırlar; kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilizinler, membran tipi MMP'ler, diğer MMP'ler.

Kollajenazlar: MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 kollajenazlar grubunda yer alırlar. Bu enzimlerin ana özelliği, hücreler arası alanda tip I, II, III kollajenleri parçalayabilme yeteneğidir. MMP-1, uygun pH ve ısıda interstisyel kollajen tip I, Tip II ve Tip III'ü parçalar. Kollajen olmayan bazı substratları parçalar. MMP-8 de (insan nötrofil interstisyel kollajenazı) MMP-1'e çok benzer yapıdadır. Tip I kollajeni ve tip III kollajeni parçalar. MMP-13 (kollajenaz 3) diğerlerinden farklı olarak özellikle tip II kollajen üzerine daha etkilidir. Tip 2 kollajen kondrositlerden üretildiklerinden dolayı osteoartrit patogeneğinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Parçalanmış kollajenler denatüre olup jelatinlere dönüşürler ve diğer proteinazlar devreye girmesiyle parçalanırlar (37).

Jelatinazlar: Jelatinazlar grubunda MMP 2 (jelatinaz A) ve MMP 9 (jelatinaz B) yer alır. Denatüre olmuş kollajenleri ve jelatinleri sindirir. Bu enzimler kollajen, laminin ve jelatine bağlanan katalitik bölgenin içine yerleşmiş ve üç defa tekrarlanmış tip II fibronektin bölgesi içerir. Bu bölge jelatinazların, jelatin ve kollajene yüksek ilgi ile bağlanmalarını sağlar ve böylece proteolitik etkinliklerini artırır. MMP 9'dan farklı olarak MMP 2 ; Tip I, Tip II ve Tip III kollajeni parçalar. MMP2 si mutasyona uğrayan insanlarda multisentrik osteolizis hastalığı ortaya çıkar. Bu da MMP 2'nin insanlardaki kemik oluşumunda önemli olduğunu göstermektedir (39).

Tip IV kollajen , bazal membranların ana bileşenidir ve bazal membran toplam proteininin %40-65'ini oluşturur. İnterstisyel kollajenazlar tip IV kollajeni parçalayamazlar. Tip IV kollajenin helikal bölümünü parçalayan ilk kollajenaz fare melanoma hücre kültürlerinde gösterilmiştir. Daha sonra bunun insan fibroblast jelatinaz-A ile aynı olduğu anlaşılmıştır. Jelatinaz-A genel olarak interstisyel kollajenazların başlattığı kollajen yıkımını tamamlar. Jelatini interstisyel kollajenazlardan 100 kat daha hızlı parçalar. İnsan makrofaj, granülosit, keratinosit, ve diğer bazı hücre türleri bir glikoprotein olan jelatinaz-B'yi üretirler.

Stromelizinler: Stromelizin 1 (MMP 3) ve stromelizin 2 (MMP 10) benzer substrat özgüllüğüne sahip iken, MMP 3'ün proteolitik etkinliği MMP 10'a göre daha yüksektir. MMP 11, stromelizin 3 olarak da adlandırılmasına rağmen diğer MMP'ler içinde sınıflandırılır çünkü sekans ve substrat özgüllüğü MMP 3 ve 10'dan ayrıdır. Stromelizin 1 fibroblastlardan üretilir ve başlıca substratları proteoglikanlar, tip IV kollajen, laminin ve fibronektindir. Hücresel fibrinolizde de önemli işlevi olduğu düşünülmektedir. Stromelizin-2, stromelizin-1 ile aynı substratları parçalar fakat bulundukları dokular farklıdır. Örneğin keratinositlerde yalnızca stromelizin-2 uyarılırken romatoid sinovya sıvısında yalnızca stromelizin-1 bulunur. Yara iyileşmesi sırasında ise keratinositlerde her ikisi de eksprese edilir. Stromelizin-3 α 1-tripsin inhibitörünü parçalar ancak diğerlerinin etki ettiği ESM bileşenlerine etkisi yoktur. Fizyolojik rolü kesin olarak bilinmemekle birlikte epitelyal tümörlerin stromasında çok miktarda bulunduğu için serin proteaz inhibitörlerini baskılayarak plazmin gibi enzimlerin matriks proteinlerini parçalamasını sağladığı düşünülmektedir (37).

Metalloproteinaz İnhibisyonu

Matriks metalloproteinazların inhibisyonunda özel doku inhibitörleri TIMP'lar tanımlanmıştır . Genel olarak TIMP ailesi MMP'lerin katalitik bölgelerine bağlanarak substrata bağlanmayı engelleyerek etki gösterir. Tanımlanmış 4 adet TIMP türü vardır. TIMP 1-2-3-4 şeklinde tanımlanmış 4 alt türü olan TIMP'lar %41 %52 oranında sekans benzerliği göstermektedir (40). Fonksiyonel olarak benzerlik göstermekle birlikte farklı dokularda oranları değişmektedir. Bunun yanında genel proteinaz inhibitörleri olarak bilinen a2-makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve C-reaktif proteini de bulunmaktadır. TIMP aktivitesi için bütünlüğünün korunmuş olması gereklidir. MMP ve TIMP'ler arasında bulunan oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde değişiklik gösterir (41). Embriyogenez ve üreme, tümöral kitlelerin invazyon süreçleri, dermal yaşlanma, kemik oluşumu, eklem hastalıklarında MMP az ilişkileri ortaya konmuştur.

DOKSİSİKLİN

Geniş spektrumlu bir antibiyotik grubu olan tetrasiklinler bakteriostatik etki gösterirler. Bu grup antibiyotiklerin ilk üyesi 1948 yılında Benjamin Duggar tarafından streptomices aerofaciens isimli bakteriden izole edilmiş olan klortetrasiklindir. Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek etki gösterirler ribozomal 30 s ve 50s alt

ünitelerine bağlanarak aminoasit t –r F VF VV’nanın bağlandığı alanı inhibe eder ve peptid zinciri oluşumunu engellerler. Ortalama absorpsiyonları %60 /%70 kadardır. Tetrasiklinlerin antimikrobiyal ve antibiyotik özelliklerinin yanı sıra kolajenaz inhibisyonu yaptıkları da ortaya konmuştur (42, 43). Bu özelliklerine dayanılarak yapılan çalışmalarda doksisisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin periodontal hastalıklarda ve artritte doku yıkımını azalttığı, tümör metastazı ve tümör anjiyogenezin de inhibitör etki gösterdiği, miyokard enfarktüsünde doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (44-49). Tetrasiklinlerin bağ dokusunda yıkımı azaltıcı etkileri çeşitli mekanizmalar ile olur;

1) Hücre dışı mekanizmalar

- a) Tetrasiklinler Ca ve Zn’ye bağlanarak aktif MMP’lerin doğrudan inhibisyonunu sağlar
- b) Pro-metalloproteinazların oksidatif aktivasyonun inhibisyonunu sağlar
- c) MMP’lerin inhibisyonu a-1 proteinaz inhibitörü korur böylece indirekt olarak serin proteinaz aktivitesini azaltır bağ doku yıkımı azalır

2) Hücre sel mekanizmalara aracılık eder

- a) Sitokinler, indüklenebilir nitrik oksit sentetaz, fosfolipaz a2, prostoglandin sentezlerini azaltır
- b) Protein kinaz C ve calmoduline etki eder

3) Proanabolik etkilere aracılık eder

- a) Kollojen yapımını artırır
- b) Osteoblast aktivasyonunu ve kemik oluşumunu artırır

Farmokokinetik

Tetrasiklinler oral veya paranteral kullanılabilirler. Sindirim kanalından başlıca mide ve ince bağırsaklardan emilirler doksisisiklin ve minosiklinin emilim oranı %90-%100 arasında iken diğer tetrasiklin türevleri %60 -%70 oranında emilirler. Değişen oranlarda idrar, safra ve dışkıyla atılırlar. Doksisisiklin böbrek yetmezliğinde doz ayarlanması gerektirmez. Başlıca eliminasyon yolları böbreklerdir (43). Minosiklin göz yaşı ve tükürükte yüksek oranda yoğunlaşır.

Yan Etkileri (43)

- Dişlerde kalsiyum şelati oluşturmasına bağlı olarak diskolorasyon
- Fotosensitivizasyon
- Diyare
- Tromboflebit (iv kullanıma bağlı olarak)
- Aėızda kötü tat
- Fanconi tip sendrom (üremi tablosu)
- Psödotumorserebri



GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmanın hayvanlarının canlı olduğu dönemlerini içeren kısım Trakya üniversitesi hayvan deneyleri laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Plastik, rekonstruktif ve estetik cerrahi anabilimdalı, patoloji ve biyokimya anabilimdalı ortak çalışması ile birlikte yapılmıştır. Çalışma öncesinde hayvan deneyleri yerel etik kurulu onayı alınmıştır.

HAYVANLARIN ÖZELLİKLERİ VE BAKIM KOŞULLARI

Çalışmamızda kemik greftinin kırık iyileşmesi üzerine doksisisiklin etkisini inceleyebilmek amacıyla daha önceki kemik iyileşmesi modelleri örnek alınarak rat modeli uygun görülmüştür. Deneysel çalışma için 36adet sağlıklı wistar albino rat kullanılmıştır. Yaşları 10-12 hafta arasında olup ağırlıkları 400 – 500 gr arasındadır. Ratlar 21 ± 1 C° sıcaklıkta % 40-60 nem ihtiva eden ve 12 saatlik gece gündüz standartlarının sağlandığı laboratuvar koşullarında ve veteriner gözetiminde barındırıldılar. Ratların tümü standart pelet yem ve serbest su ile beslendiler. Takipleri boyunca birbirlerine zarar vermelerini engellemek amacıyla 2'li 3'lü gruplar şeklinde kafeslerde takip edildiler. Hayvanların hepsi numaralandırıldı.

ÇALIŞMANIN MATERYAL METODU

Çalışmamızda 10-12 haftalık toplam 36 wistar albino rat adet kullanıldı. 18 adetlik kontrol ve deney grubu olmak üzere 2 grup oluşturulduktan sonra gruplar kendi içerisinde; grup 1 (kontrol grubu) grup 1a ve grup 1b şeklinde 2 alt gruba ve grup 2 (deney grubu) grup

2a ve 2b şeklinde 2 alt gruba ayrılarak 9'ar rattan oluşan toplam 4 grup oluşturuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmaya alınan ratların grup dağılımları

	Kontrol Grupları (n=18)	Deney Grupları (n=18)
14. günde sakrifiye edilen (n=18)	Grup 1a (n=9)	Grup 2a (n=9)
28. günde sakrifiye edilen (n=18)	Grup 1b (n=9)	Grup 2b (n=9)

Çalışma başlangıcında tam genel anestezi altında tüm wistar albino ratların serumdaki bazal matriks metalloproteinaz tip 2 ve tip 9 un ölçülmesi için kuyruk venlerinden kan örnekleri alındı. Kan örneklerinin alınmasından 1 gün sonra ratların genel anestezi altında lateral dekübit pozisyonunda cerrahi işlem yapılacak olan uyluktan segmental kemik grefti alındı. Alınan kemik grefti intramedüller çivi yöntemi ile tespit edilerek yerine iade edildi. Cerrahi işlemden 1 gün sonra grup 2 de bulunan tüm ratlara doksisisiklin 5 mg /kg/gün olacak şekilde sulandırılarak (günlük ihtiyaç duyulan su miktarı göz önüne alınarak) gavaj yöntemi ile günlük olarak verildi. Grup 2 nin doksisisiklin tedavisinin 14. gününde grup 1a ve grup 2a daki ratlara tam genel anestezi sağlanarak intrakardiyak kan örneği matriks metalloproteinaz tip 2 ve tip 9 ölçümü için alındı ve ratlar sakrifiye edildi. Kan örnekleri uygun şekilde biyokimya laboratuvarına gönderildi ve uygun şekilde saklandı. Sakrifiye edilen ratların cerrahi işlem yapılan taraf femurları patolojik değerlendirme için total olarak rezeke edildi. Alınan femur örnekleri formol solüsyonu içinde saklanarak histopatolojik değerlendirmeye gönderildi. Grup 1b ve 2 b deki ratlar 28. güne kadar aynı protokol ile takip edilerek grup 2b deki ratların doksisisiklin tedavisinin 28. gününde grup 1b ve 2 b deki tüm ratlara tam genel anestezi sağlanarak supin pozisyonunda intrakardiyak kan örneği matriks metalloproteinaz tip 2 ve tip 9 ölçümü için alındı ve ratlar sakrifiye edildi. Kan örnekleri uygun şekilde biyokimya laboratuvarına gönderildi. Sakrifiye edilen ratların cerrahi işlem yapılan taraf femurları patolojik değerlendirme için total olarak rezeke edildi. Alınan femur örnekleri formol solüsyonu içinde saklanarak histopatolojik değerlendirmeye gönderildi. (Genel anestezi için yapılacak olan tüm intramusküler enjeksiyonlar cerrahi işlem yapılmayacak tarafa yapıldı.)

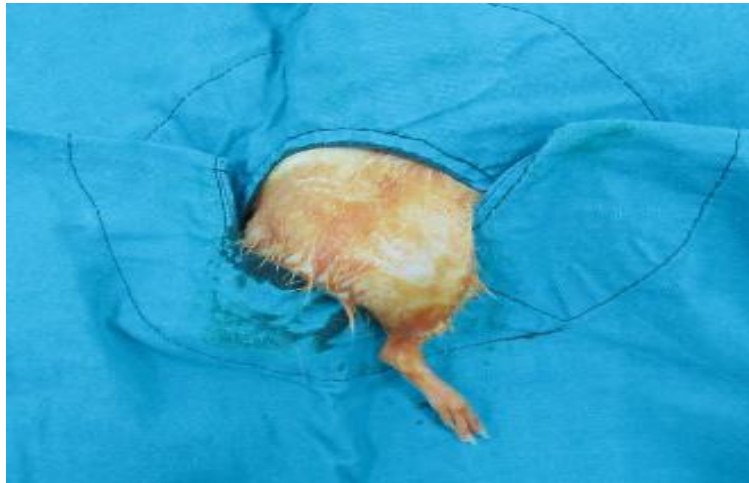
Tüm hayvanların preoperatif, postoperatif 14. günde ve 28. günde alınan kan örneklerileri alındıktan sonra 30 dk içerisinde santrifüje alındı. Dakikada 1000 devirden 15

dk santrifüj uygulandı, kanın üst kısmında biriken plazmalar ependorf tüplerine alındı ve tüpler numaralandırıldıktan sonra – 85 derece derin dondurucuda saklandı. Tüm deneklerin kan örneklerinde MMP 2, MMP 9 değerleri çalışıldı. Post operatif 14 . günde ve 28 . günde alınan femur örnekleri patolojik çalışma için patoloji birimince değerlendirildi.

ANESTEZİ VE CERRAHİ İŞLEMLER

Kan örneklerinin alınması öncesinde tüm deneklere 10 mg/kg dozunda xylazin hidroklorür (Rompun®, Bayer-İstanbul) ve 40 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer-İstanbul) cerrahi işlem yapılmayacak olan uyluğa kas içine uygulanarak anestezi sağlandı. İntramusküler anestezi sonrası 10 dk beklendi deneklerin refleksleri kontrol edildi tam genel anestezi sağlandı ratlar prone pozisyonunda alındı kuyrukları uygun ısıda suda bekletildikten sonra %10 povidon iyot çözeltisi ile steril edildi ve kuyruk veninden kan örnekleri alındı.

Kan örneklerinin alınmasından 1 gün sonra cerrahi işlem öncesinde tüm deneklere 10mg/kg dozunda xylazin hidroklorür (Rompun®, Bayer-İstanbul) ve 40 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer-İstanbul) cerrahi işlem yapılmayacak olan uyluğa kas içine uygulanarak anestezi sağlandı. İntramusküler (İM) anestezi sonrası 10 dk beklendi deneklerin refleksleri kontrol edildi tam genel anestezi sağlandı. Ratlar lateral dekübit pozisyonuna alındı im anestezi yapılmayan uyluklarının cildi tıraşlandıktan sonra %10 povidon iyot çözeltisi ile temizlezi. bunu takiben operasyon alanı steril örtülerle örtüldü (Şekil 1).

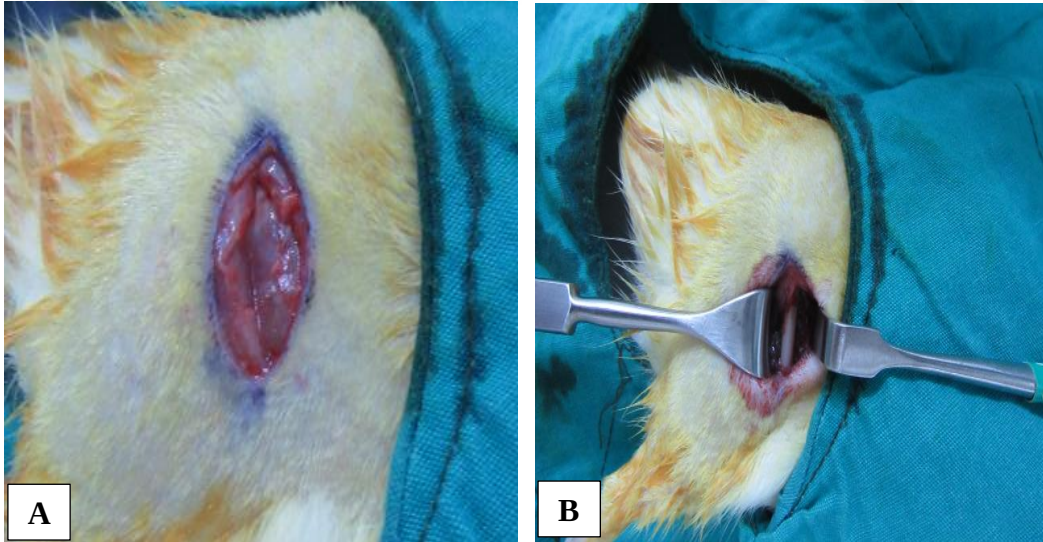


Şekil 1. Ratların lateral dekübit pozisyona alınarak ortamın sterilitésinin sağlanması

İşlemimize Şekil 2’de gösterilen steril cerrahi set kullanılarak uyluk lateralinden yapılan 2 cm lik insizyon sonrası lateral yaklaşım ile cilt cilt altı geçildi femur shaftları kas grupları uygun şekilde diseke edilerek ortaya kondu (Şekil 3).

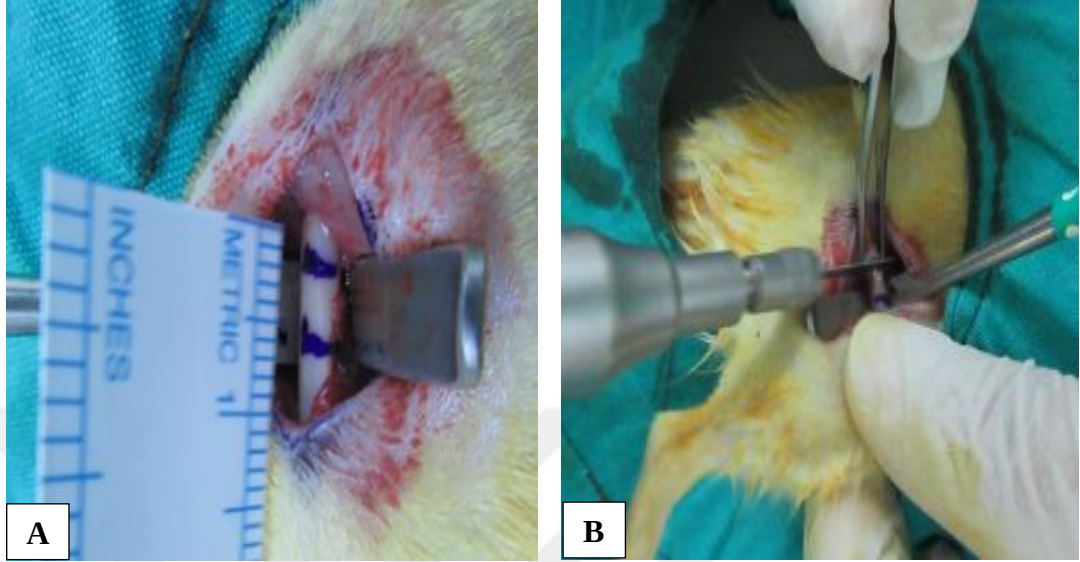


Şekil 2. İşlem boyunca kullanılan steril cerrahi set



Şekil 3. Femur disseksiyon aşamaları: A- Femur posterolateralinden yapılan insizyon sonrası lateral ve posterior kas gruplarının disseksiyonu, B- Femur diyafizer kısmının kas grupları geçildikten sonra periostu korunarak ortaya konması

Uygun şekilde disseke edilen femur üzerinde 5mm kemik segmenti işaretlendi ve kesici motor ile bu kemik segmenti rezeke edildi (Şekil 4).



Şekil 4. Femur kemik segmentinin rezeksiyonu: A- Kesilecek kısmın işaretlenmesi, B- Kesici motor ile rezeksiyon

Alınan kemik segment 10 dk boyunca serum fizyolojik içerisinde bekletildikten sonra uygun boyuttaki K telleri ile intramedüller çivi şeklinde yerleştirildi (Şekil 5).



Şekil 5. Kemik rezeksiyonu ve intramedüller çivi ile replantasyon aşamaları

Cilt 4-0 prolen ile sütüre edildi. Yara yeri pansumanı yapıldı. Hayvanlar bakım kafeslerine alındı. Cerrahi sonrası 1 hafta boyunca hayvanların günlük yara pansumanları

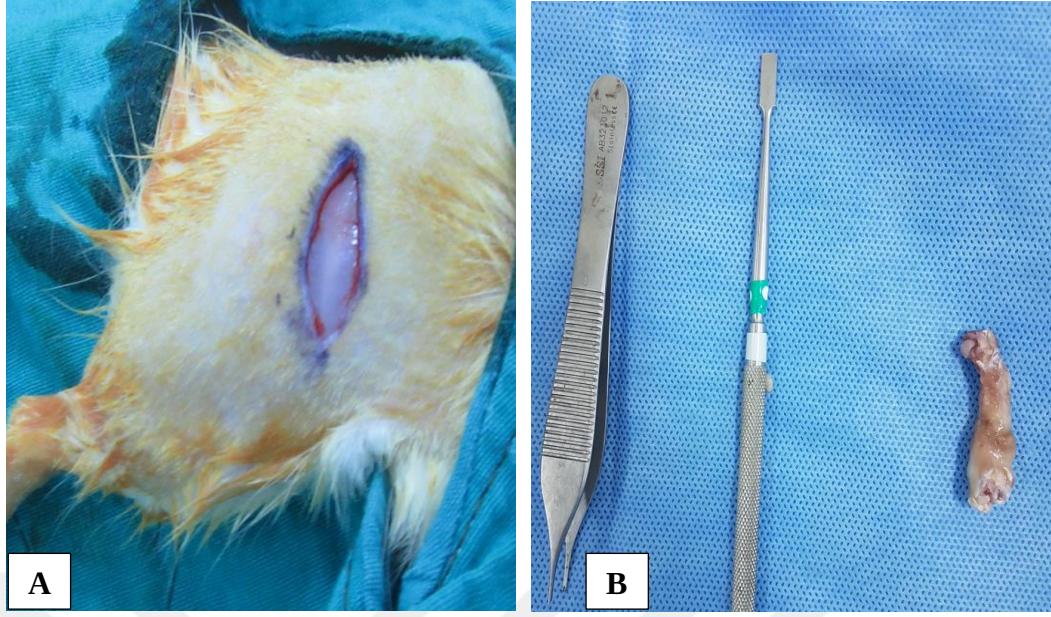
yapıldı. Postoperatif 1. günden itibaren deney grubundaki hayvanlara gavaj yöntemi ile 5mg/kg günden doksisisiklin grup 1b ye 14 gün boyunca verildi. Grup 2b ye 28 gün boyunca doksisisiklin tedavisi verildi.

Grup 1a ve 1b deki 9 ar adet rattan 2 şer adedi ex oldu. 14. gün grup 1a ve 1b deki 7 şer adet rat 10mg/kg dozunda xylazin hidroklorür (Rompun®, Bayer-İstanbul) ve 40 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer-İstanbul) cerrahi işlem yapılmayacak olan uyluğa intamusküler uygulanarak tam genel anestezi sağlandı. Anestezi sonrası 10 dk beklendi deneklerin refleksleri kontrol edildi tam genel anestezi altında oldukları görüldü. Ratlar ilk önce supin pozisyonundayken gövde ön yüzleri solüsyon ile steril edildi 5cc lik enjektör ile intrakardiyak kan alındıktan sonra ratların exitusu sağlandı (Şekil 6).



Şekil 6. Ratlardan supin pozisyonunda intrakardiyak kan alınması

Ratlar lateral dekübit pozisyonunda alındıktan sonra cerrahi yapılan uyluk %10 luk povidon iyot çözeltisi ile temizlendi takiben steril örtülerle örtüldü eski insizyon hattından yapılan yeni insizyon ile kas grupları disseke edilerek femur ortaya kondu femur proksimal ve distalindeki eklem yüzlerinden disseke edilerek total olarak rezeke edildi (Şekil 7).



Şekil 7. Doksisiklin tedavisinin 14 ve 28. günlerde yapılan tekrar rezeksiyon

A- Eski operasyon yerinden yapılan yeni insizyon

B- Femurun kalça ve diz eklemi seviyesinden total rezeksiyonu

Alınan örnekler patolojik inceleme için formol solüsyonu ile dolu kaplar numaralandırılarak saklandı.

Postoperatif 28. güne kadar grup 2a ve 2b deki ratlar daha önceki protokole göre takip edildi. Post operatif 2. günde grup 2a ve 2b deki 9 ar adet rattan 2 şer adedi ex oldu. 29. gün grup 1a ve 1b deki 7 şer adet rat 10mg/kg dozunda xylazin hidroklorür (Rompun®, Bayer-İstanbul) ve 40 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer-İstanbul) cerrahi işlem yapılmayacak olan uyluğa intamusküler uygulanarak tam genel anestezi sağlandı. Anestezi sonrası 10 dk beklendi deneklerin refleksleri kontrol edildi tam genel anestezi altında oldukları görüldü. Ratlar ilk önce supin pozisyonundayken gövde ön yüzleri solüsyon ile steril edildi 10cc lik enjektör ile intrakardiyak kan örnekleri alındı ve ratların exitusu sağlandı. Ratlar lateral dekübit pozisyonunda alındıktan sonra cerrahi yapılan uyluk %10 luk povidon iyot çözeltisi ile temizlendi takiben steril örtülerle örtüldü. eski insizyon hattından yapılan yeni insizyon ile kas grupları diseke edilerek femur ortaya kondu femur proksimal ve distalindeki eklem yüzlerinden diseke edilerek total olarak rezeke edildi .Alınan örnekler patolojik inceleme için formol solüsyonu ile dolu kaplar numaralandırılarak saklandı.

Preoperatif, post operatif 14. günde ve post operatif 28. günde alınan kan örneklerinin hepsi alındıktan sonra 30 dk içerisinde santrifüje alındı, 1000/dk devirde 15 dk

boyunca santrifüj uygulandı. Kanın üst kısmında biriken plazmalar ependorf tüplerine alındı ve -85 derecede derin dondurucuda saklandı. Post operatif 14. günde ve 28. günde alınan kemik doku örnekleri alındıkları anda formol solüsyonunda patolojik inceleme için saklandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Normal dağılım varsayımı Shapiro-Wilk testi ile kontrol edilmiştir. İki grup karşılaştırmalarında Student t testi kullanılmıştır. Nicel değişkenler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi 0.05 olarak belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler TURCOSA (Turcosa Analytics Ltd Co, Turkey, www.turcosa.com.tr) istatistik yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



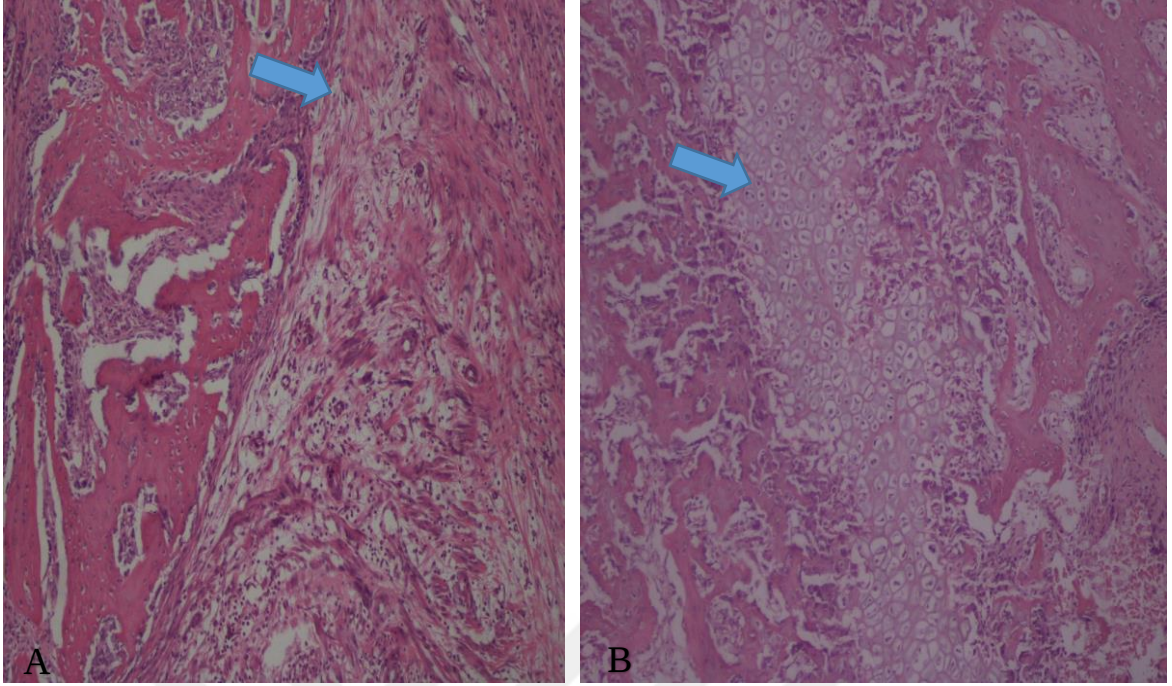
BULGULAR

MAKROSKOPİK İNCELEME BULGULARI

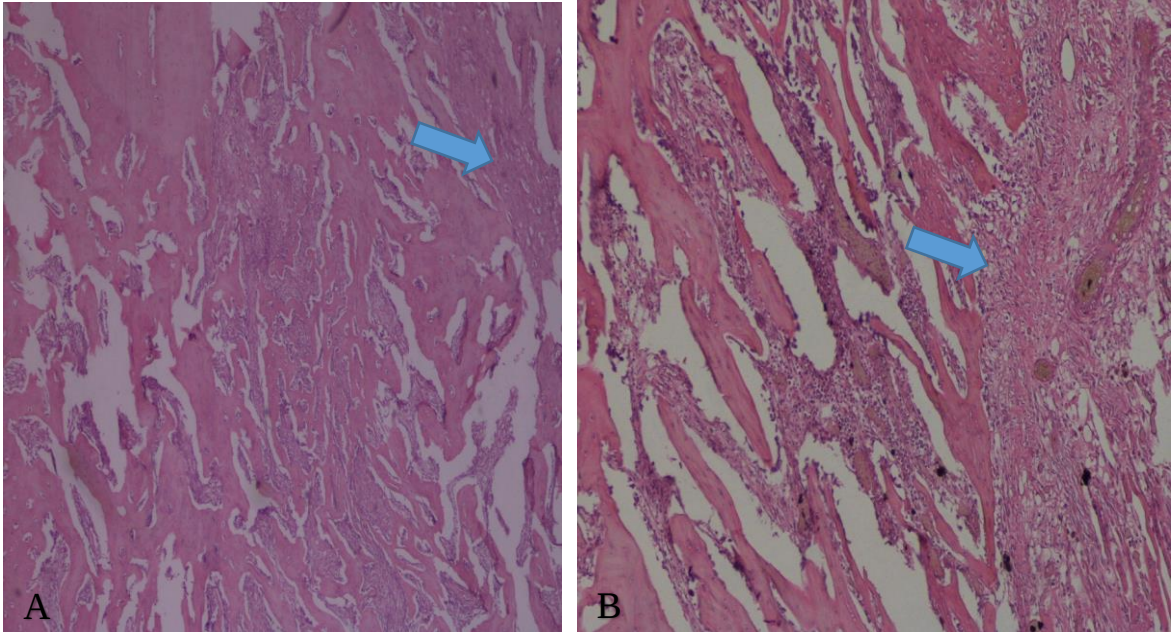
Ratların tüm femurları kemik grefti ile onarım yapıldıktan sonra 14. günde ve 28. günde total olarak rezeke edildi. Deney ve kontrol grubunda kemik dokusu tamamıyla korunmuştu. Doğal kemik dokusu rengi ve etraf dokuda gelişen fibrotik değişime ait görünüm mevcuttu. Deney grubunda kontrol grubuna göre kırık yapılan alanlarda daha kalın kallus dokusu mevcuttu.

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Kontrol ve deney gruplarından alınan kemik dokusu örnekleri ışık mikroskobu altında her bir örnekten rastgele farklı alanlar 40x objektifle incelendi. Hematoksilen- Eozin (HE) boyaması yapılan örneklerde kallus dokusu kalınlığı ve kallus dokusunun iyileşme alanına göre yüzdesi hesaplandı. Şekil 8 ve 9' da 14 ile 28. günde sakrifiye edilen ratların femur kemik incelemelerinde mikroskobik kallus görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 8. 14. günde alınan ve HE ile boyanmış kemik dokusunda yeni kallus görünümü
A- Kontrol grubu, B- Deney grubu (Mavi ok: Kallus oluşumu)



Şekil 9. 28. günde alınan ve HE ile boyanmış kemik dokusunda yeni kallus görünümü
A- Kontrol grubu, B- Deney grubu (Mavi ok: Kallus oluşumu)

Cerrahi sonrası hayatta kalan ratların 14 ve 28. Günlerde kallus kalınlıkları ölçüldü. 14. Günde sakrifiye edilen ratların kallus ölçümünde deney grubunda en düşük 2113 - en yüksek 4011 mikron (μ), kontrol grubunda en düşük 1627 – en yüksek 2430 μ - en düşük 1627 μ olarak ölçülmüştür. 28. günde alınan örneklerin kallus ölçümlerinde kalınlık deney grubunda minimum (min): 2431 μ , maksimum (max):4897 μ , kontrol grubunda ise min: 683 μ - max: 3613 μ olarak ölçülmüştür (Tablo 2.)

Tablo 2. Cerrahi sonrası hayatta kalan ratların ölçülen kallus kalınlıkları

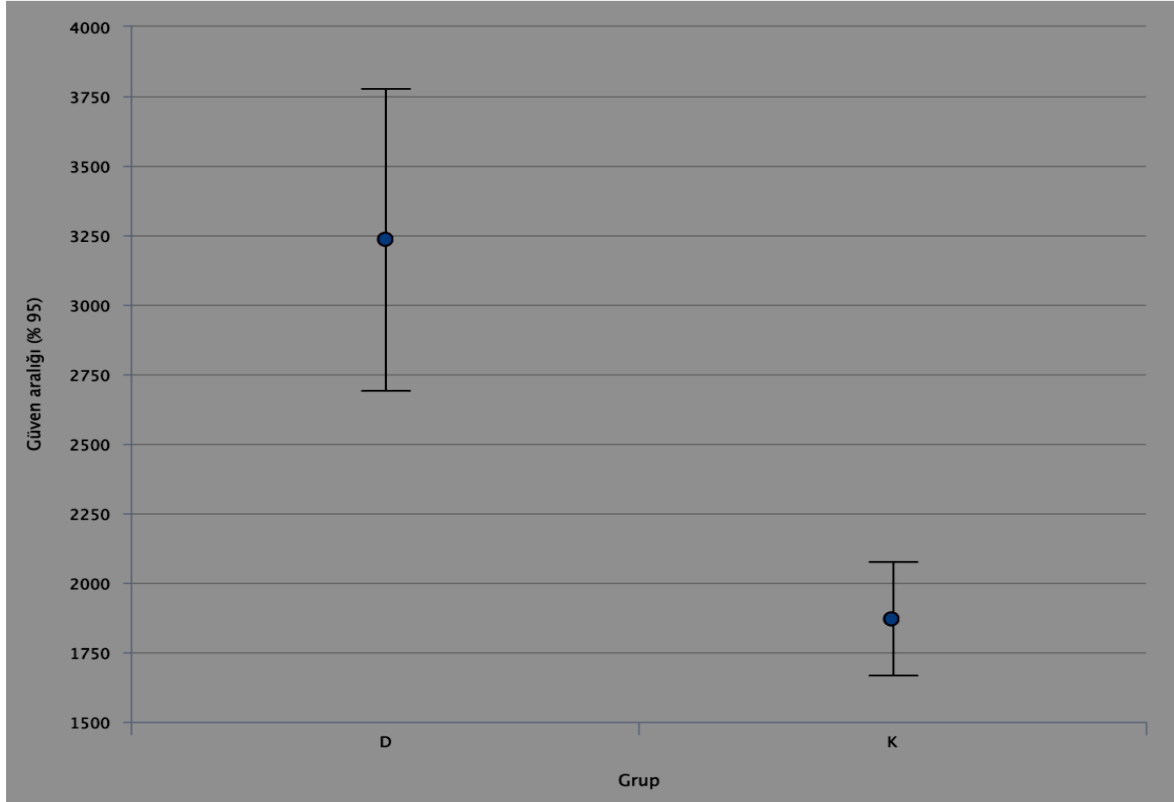
14. gün değerleri (μ)		28. gün değerleri (μ)	
Deney Grubu (n=7)	Kontrol Grubu (n=7)	Deney Grubu (n=7)	Kontrol Grubu (n=7)
3550	2010	4061	2480
2113	1680	4897	683
2782	1763	2431	3000
2629	1627	4540	2979
3559	2430	3750	3250
4002	1845	4677	3076
4011	1750	3950	3613

Ondördüncü günde sakrifiye edilen doksisisiklin verilen deney grubu ratların femur örneklerinde ortalama kallus kalınlığı 3235 ± 733 olarak ölçülürken kontrol grubunda bu rakam 1872 ± 275 olarak ölçülmüştür (Tablo 3). İki grup karşılaştırıldığında doksisisiklin alan grupta kallus kalınlığının belirgin bir şekilde daha fazla olduğu görülmüş olup $p < 0,001$ ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ve bu Şekil 10'da grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 3. 14. günde alınan femur örneklerinde kallus kalınlığının karşılaştırılması

	Ortalama (μ)	S. Sapma	S. Hata	Minumum (μ)	Maksimum (μ)	p değeri
Deney grubu	3235	733	277	2557	3913	0,001*
Kontrol grubu	1872	275	104	1618	2127	

* Student t testi, $p < 0,05$ anlamlılığında



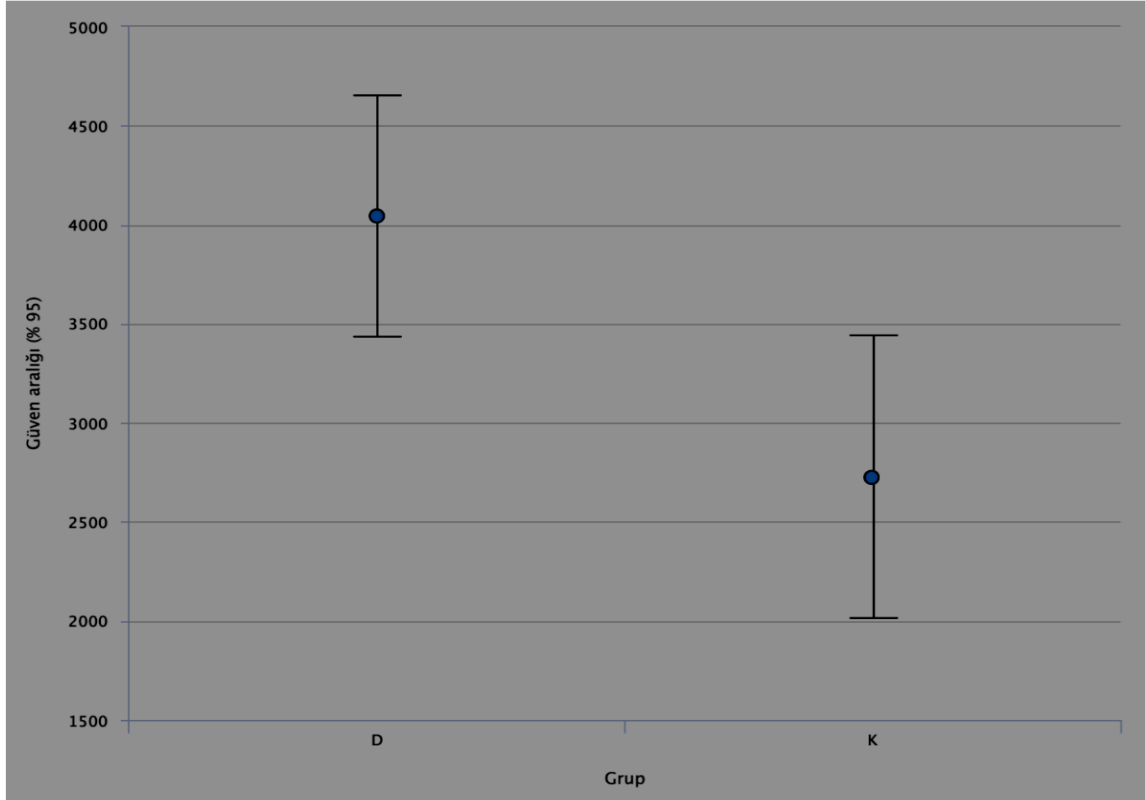
Şekil 10. Femur örneklerinde 14. günde ölçülen kallus kalınlığı karşılaştırılması

Benzer şekilde 28. günde kurban edilmiş ratların femur örneklerinin histopatolojik incelemesinde doksisiklin alan deney grubunda kallus kalınlığı 4044 ± 824 µ olarak ölçülürken bu miktarın kontrol grubunda 2726 ± 962 µ olduğu görüldü. 14. Gündeki deneklere benzer olarak doksisiklin verilen grupta kallus kalınlığının daha fazla olduğu ve yapılan analizde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulundu ($p:0,018$). Bu karşılaştırma Tablo 4'te belirtilmiş olup Şekil 11' de de istatistiksel grafik gösterilmiştir.

Tablo 4. 28. Günde alınan femur örneklerinde kallus kalınlığı incelenmesi

	Ortalama (µ)	S. Sapma	S. Hata	Minumum (µ)	Maksimum (µ)	p değeri
Deney grubu	4044	824	311	3282	4806	0,018*
Kontrol grubu	2726	962	364	1836	3616	

* Student t testi, $p < 0,05$ anlamlılığında



Şekil 11. Ratların cerrahi sonrası 28. gündeki kallus kalınlıklarının karşılaştırılması

Histopatolojik incelemede deneklerin kallus miktarının tüm alana oranı incelendiğinde 14. gününde alınan örneklerde kallus yüzdesi doksiklin verilen grupta 53.6 ± 8.5 , kontrol grubunda ise 31.4 ± 4.8 olduğu bulundu. Aynı inceleme 28. Günde kurban edilen rat femur örneklerinde yapıldığında deney grubunda 63.6 ± 6.6 , kontrol grubunda 51.4 ± 11.1 olarak hesaplandı. Tüm denek hayvanlarına ait kallus yüzdesi Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Cerrahi sonrası hayatta kalan deneklere ait kallus yüzdesi

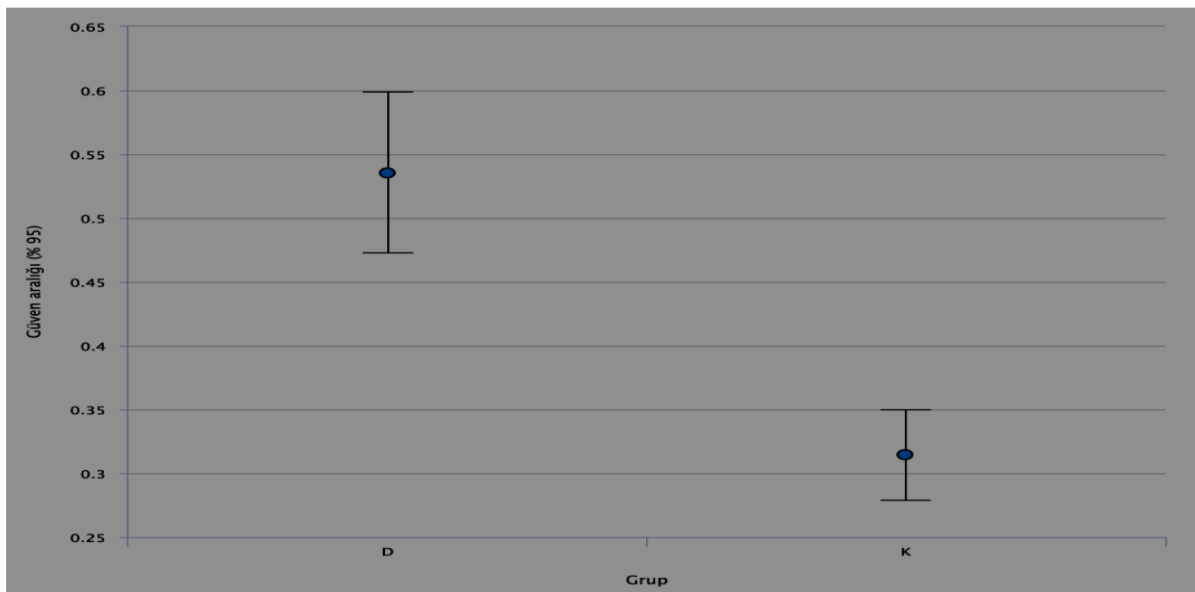
14. gün değerleri (%)		28. gün değerleri (%)	
Deney Grubu (n=7)	Kontrol Grubu (n=7)	Deney Grubu (n=7)	Kontrol Grubu (n=7)
40	30	70	40
60	30	70	45
65	40	60	60
50	30	70	40
60	25	55	70
50	35	60	55
50	30	60	50

Cerrahi işlem sonrası hayatta kalan deneklerin kallus yüzdeleri incelendiğinde doksisisiklin verilen grubun hem 14 hem de 28. günde alınan femur örneklerinde kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek olduğu görüldü. İstatistiksel olarak 14 ve 28. günlerde alınan örneklerin her ikisinde de anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p < 0,001$, $p:0,027$). 14. Günde alınan örneklerdeki istatistiksel anlamlılık derecesinin 28. Gündeki örneklere göre daha yüksek seviyede olduğu görüldü. Bu karşılaştırma sırasıyla Tablo 6 ile Şekil 12-13'te gösterilmiştir.

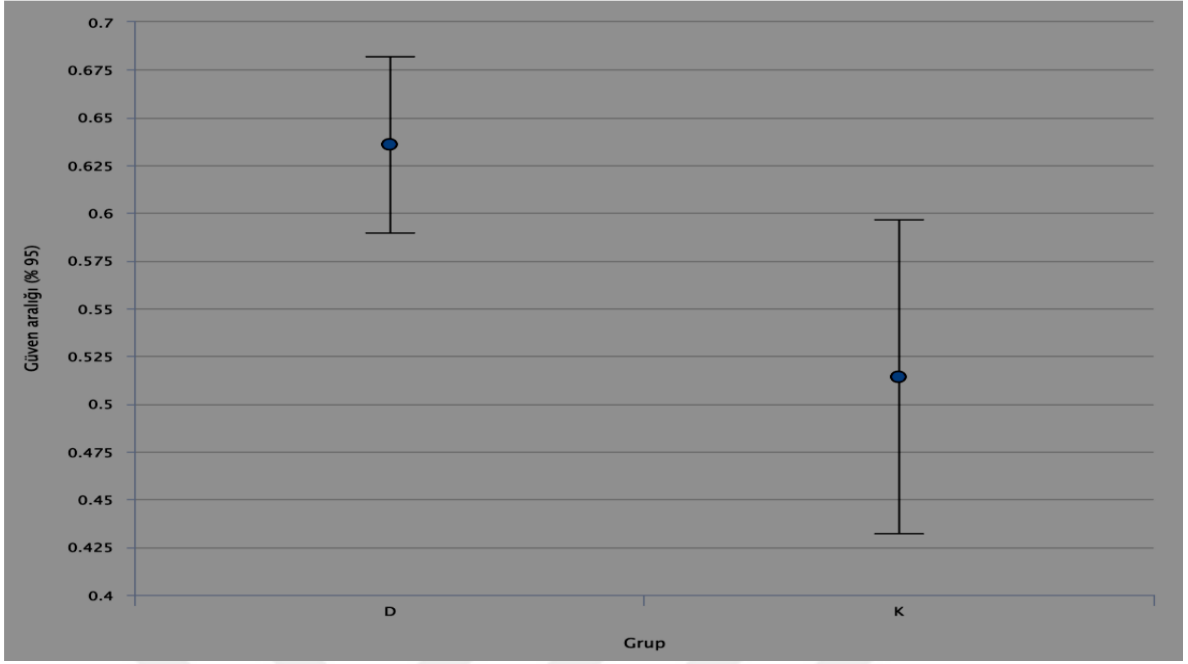
Tablo 6. Cerrahi sonrası hayatta kalan deneklerde kallus yüzdelerinin analizi

		Ortalama %	S. Sapma	S. Hata	Minumum %	Maksimum %	p değeri
14. Gün	Deney grubu	53,6	8,5	3,2	45,7	61,5	<0,001*
	Kontrol grubu	31,4	4,8	1,8	27	35,8	
28. Gün	Deney grubu	63,6	6,3	2,4	57,8	69,4	0,027*
	Kontrol grubu	51,4	11,1	4,2	41,2	61,7	

* Student t testi, $p < 0,05$ anlamlılığında



Şekil 12. Ratların cerrahi sonrası 14. günde kallus yüzdelerinin karşılaştırılması



Şekil 13. Ratların cerrahi sonrası 28. günde kallus yüzdelerinin karşılaştırılması

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Deney ve kontrol gruplarının operasyon öncesi kuyruk venlerinden, post operatif 14. günde ve 28. günde alınan kan santrifüj edilip serumları alındı ve uygun koşullarda saklandı. Serum örnekleri derin dondurucudan çıkarılıp biyokimyager eşliğinde 450 nm lik mikroplate okuyuculu Elisa okuyucuda double sandwich esasına dayanılarak değerlendirildi. BİONT® marka catalog numarası 0585RA rat matriks metalloproteinaz tip 9 ve tip 2 kiti ile çalışıldı. Alınan serum örneklerinde operasyon öncesi bazal matriks metalloproteinaz tip 2 ve tip 9, post operatif 14. gün ve 28. gün matriks metalloproteinaz tip 2 ve tip 9 değerleri incelendi.

Cerrahi öncesi ratlardan alınan kan örneğinde MMP-2 ve MMP-9 değerleri açısından doksisisiklin verilen grup ve kontrol grubu karşılaştırıldı ve iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü (sırasıyla p:0.502, p:0.889). Deneklere ait 14. Gün ve 28. Günde alınan kan örneklerinden çalışılan MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri Tablo 7’ de gösterilmiştir.

Tablo 7. Cerrahi sonrası 14 ve 28. Günde alınan MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri

	14. gün değerleri (ng/ml)		28. gün değerleri (ng/ml)	
	Deney Grubu (n=7)	Kontrol Grubu (n=7)	Deney Grubu (n=7)	Kontrol Grubu (n=7)
MMP-2*	2,722	2,91	2,596	3,061
	3,677	3,713	2,625	2,724
	2,542	3,464	2,47	2,609
	2,72	3,143	3,564	4,122
	2,191	3,343	1,275	3,638
	2,837	3,39	1,536	2,679
	2,203	2,78	1,604	2,694
MMP-9**	0,641	0,741	0,586	0,615
	0,542	0,574	0,476	0,496
	0,704	0,801	0,498	0,543
	0,554	0,633	0,577	0,607
	0,603	0,636	0,381	0,388
	0,672	0,684	0,52	0,636
	0,639	0,636	0,569	0,617

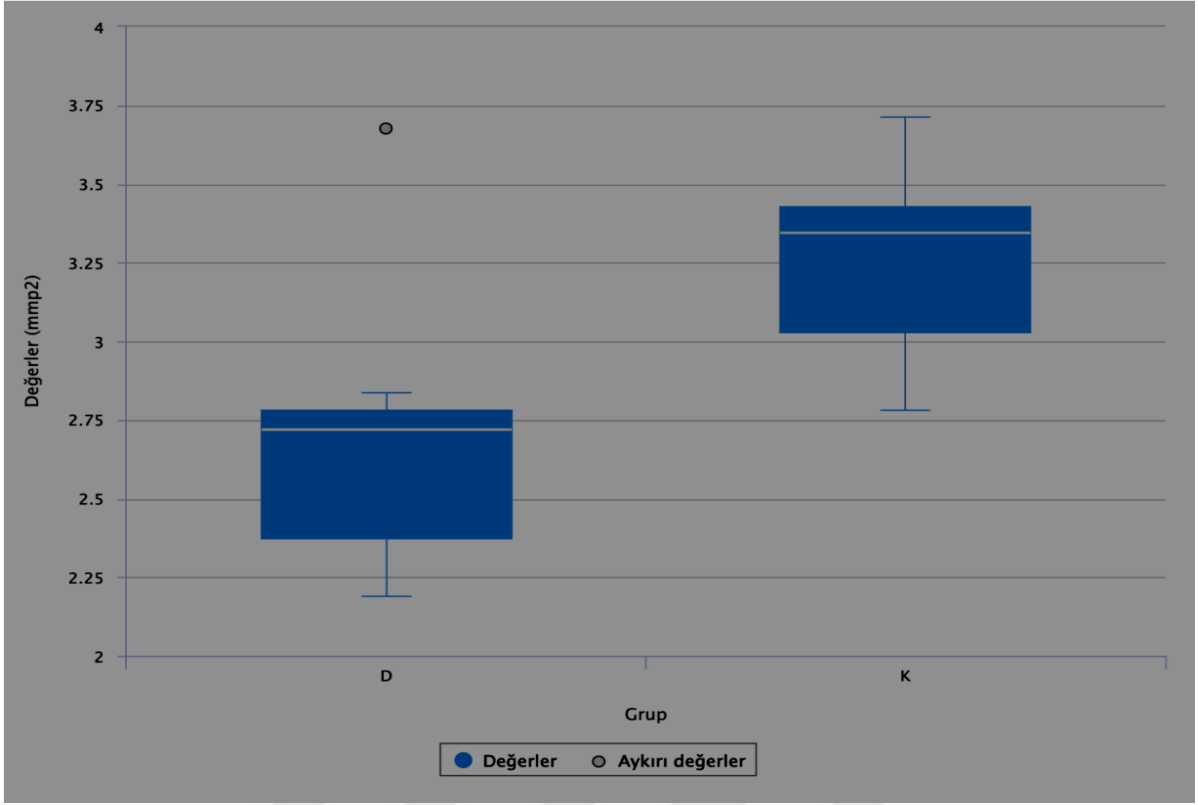
*Metalloproteinaz-2, ** Metalloproteinaz-9

Deneysel femur fraktürü sonrası hayatta kalan ratlarda 14. gün ve 28. günde çalışılan MMP-2 seviyeleri açısından doksisisiklin alan grup ve kontrol grubu karşılaştırıldı. 14. günde sakrifiye edilen doksisisiklin verilen grupta MMP-2 seviyesi $2,69 \pm 0,50$ ng/ml iken kontrol grubunda $3,25 \pm 0,33$ ng/ml olarak ölçüldü. Yapılan istatistiksel çalışmada $p:0,031$ sonucu bulunarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Aynı karşılaştıma 28. gününde çalışılan MMP-2 seviyesine göre yapıldığında ise; deney grubunda MMP-2 seviyesi $2,24 \pm 0,81$ ng/ml, kontrol grubunda $3,08 \pm 0,59$ ng/dl olarak ölçüldü. P değeri 0,046 olduğu görülen analizde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (Tablo 8). Aralarındaki istatistiksel analiz Şekil 14 ve 15’ te boksör grafi ile gösterilmiştir.

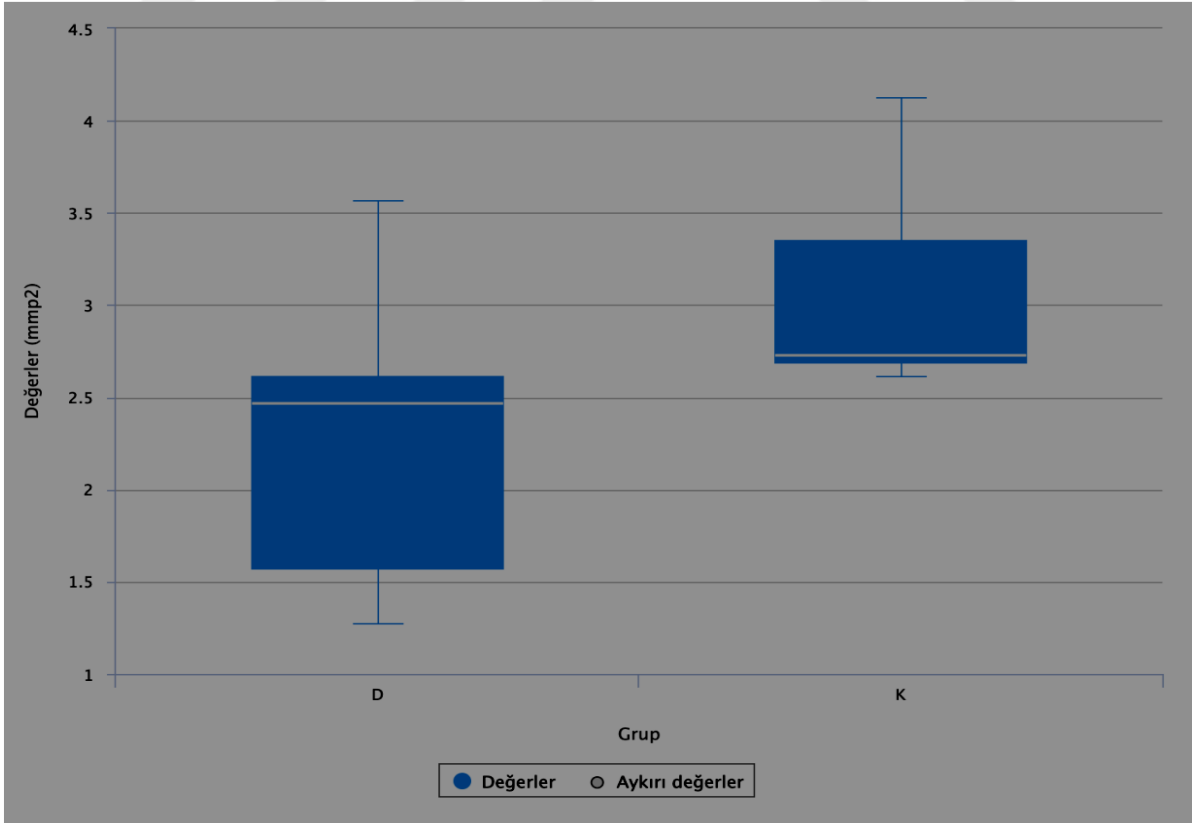
Tablo 8. Cerrahi işlem sonrası hayatta kalan ratların 14. ve 28. günde MMP-2 seviyeleri karşılaştırılması

	Deney Grubu (n=7)	Kontrol Grubu (n=7)	p
14. gün değerleri	$2,69 \pm 0,50$ (2,24-3,16)	$3,25 \pm 0,33$ (2,95-3,55)	0,031*
28.gün değerleri	$2,24 \pm 0,81$ (1,49-2,99)	$3,08 \pm 0,59$ (2,53-3,62)	0,046*

* Student t test, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 14. Ratların cerrahi sonrası 14. gündeki MMP-2 seviyelerinin karşılaştırılması



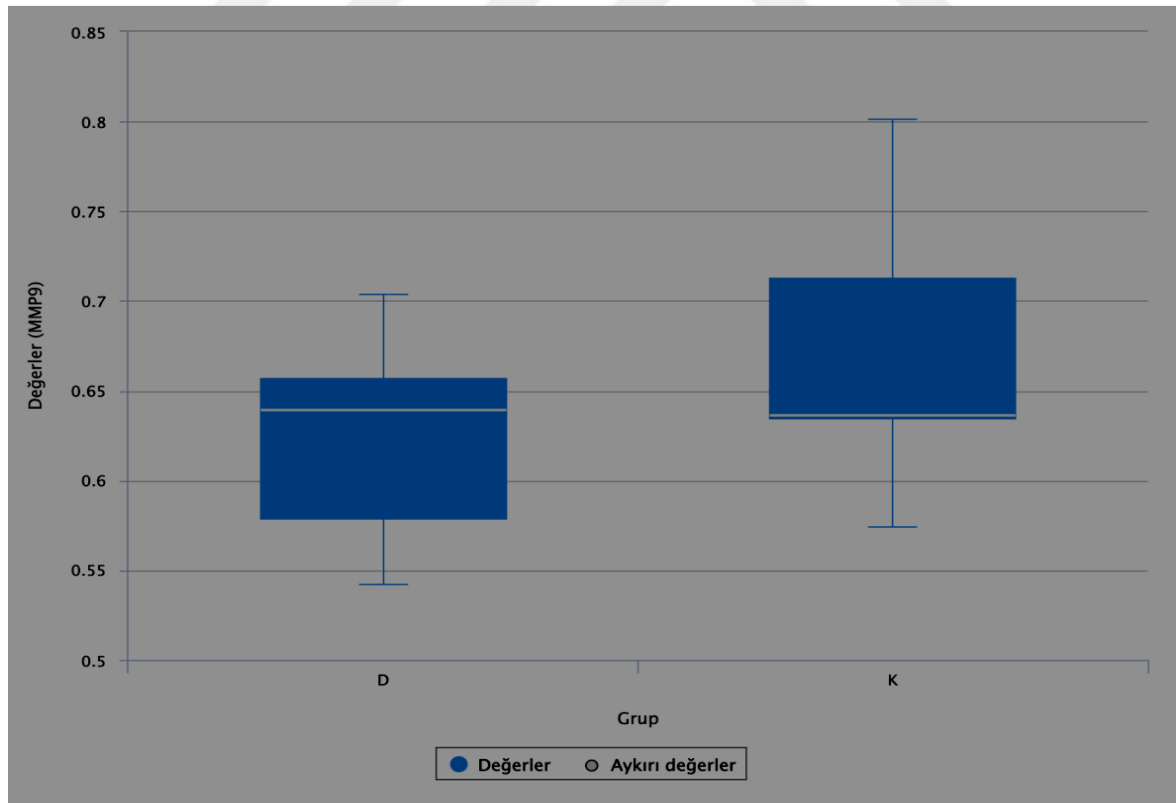
Şekil 15. Ratların cerrahi sonrası 28. gündeki MMP-2 seviyeleri karşılaştırılması

Uygulanan cerrahi işlem sonrası hayatta kalan ratlardan 14. günde sakrifiye edilen deney grubundaki ratlarda çalışılan MM-9 seviyeleri $0,622 \pm 0,06$ ng/ml, kontrol grubunda ise $0,677 \pm 0,08$ ng/ml olarak ölçüldü. Yapılan analizde p değeri 0,198 olarak hesaplandı ve aralarında istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Tablo 9). 28. günde sakrifiye edilen doksisisiklin verilen grupta MMP-9 değeri $0,515 \pm 0,07$ ng/ml olarak ölçülürken kontrol grubunda ortalama MMP-9 seviyesinin $0,557 \pm 0,09$ ng/ml olduğu ve p:0,353 sonucu ile aralarında istatistiksel bi fark olmadığı görüldü (Şekil 15-16).

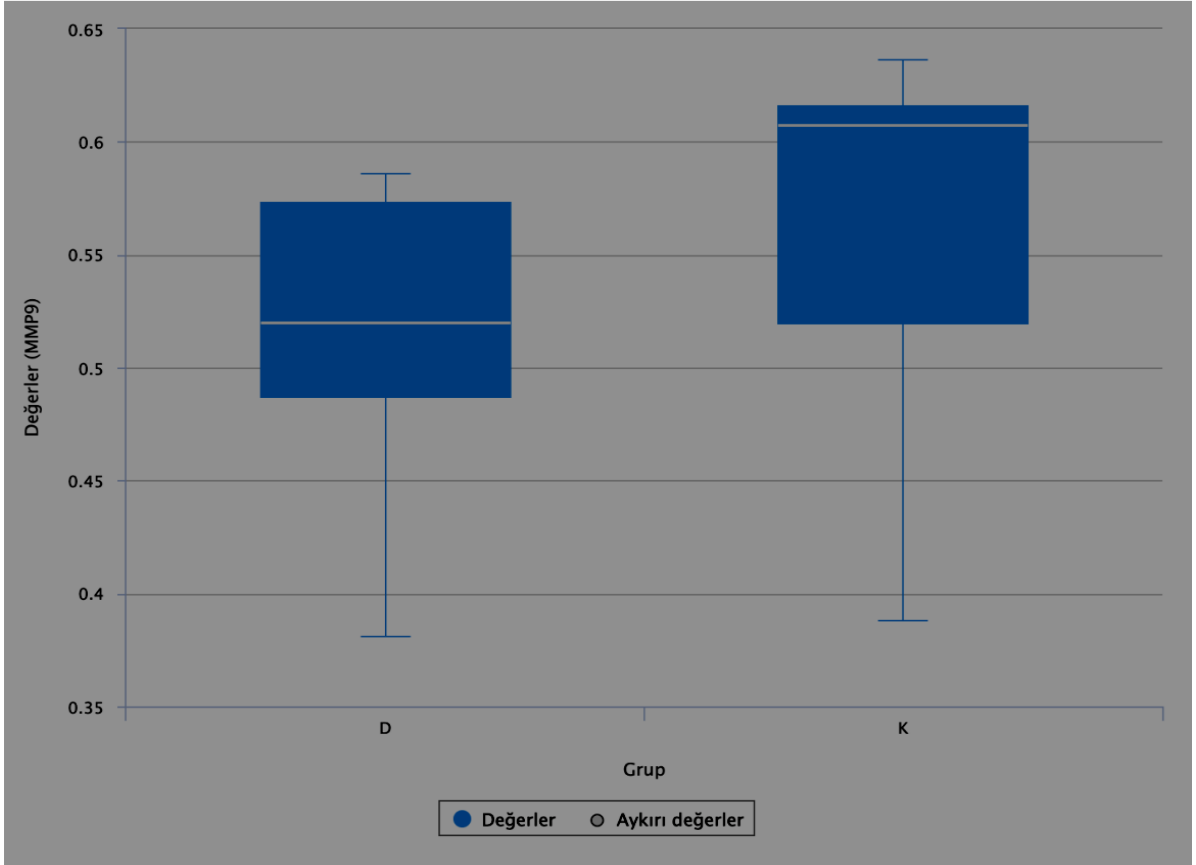
Tablo 9. Cerrahi işlem sonrası hayatta kalan ratların 14. ve 28. gündeki MMP-9 seviyeleri karşılaştırılması

	Deney Grubu (n=7)	Kontrol Grubu (n=7)	p*
14. gün değerleri	$0,622 \pm 0,06$ (0,57-0,68)	$0,677 \pm 0,08$ (0,60-0,74)	0,198
28.gün değerleri	$0,515 \pm 0,07$ (0,45-0,58)	$0,557 \pm 0,09$ (0,48-0,64)	0,353

* Student t test, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 15. Ratların cerrahi sonrası 14. gündeki MMP-9 seviyeleri karşılaştırılması



Şekil 16. Ratların cerrahi sonrası 28. gündeki MMP-9 seviyeleri karşılaştırılması

TARTIŞMA

Kemik doku osteoblast, osteosit ve osteoklastlardan oluşan ve özelleşmiş yapıya sahip olan bir dokudur. Vücutta hayati organları çevreleyen, kemik iliğini barındıran, elektrolit seviyelerinin düzenlemesi sağlayan, hareket sisteminin temelini oluşturan önemli görevleri bulunmaktadır.

Kemik defektleri çeşitli sebeplere bağlı olarak meydana gelmektedir. Ateşli silah yaralanmaları, trafik kazaları, kemik tümörleri veya kistleri, osteomyelit nedeniyle gelişen nekroze kemik alanları edinsel sebepler arasındadır. Bunun yanı sıra dudak, damak yarıkları, maksillofasiyal yarıklar gibi konjenital kemik defekti nedenleri bulunmaktadır. Rekonstrüksiyon cerrahisinde kemik defektlerinin onarımı geçmişten günümüze kadar problem olmaya devam etmektedir. Kemik kaybı olan alanlara onarım için kemik grefti uygulanmaktadır. Kemik greftlemesi amacıyla çeşitli materyaller denenmişse de otojen kemik greftleri rekonstrüksiyon için halen altın standarttır. Otojen kemik greftlerinin de sonuçlarının etkili olduğu bilinmekle beraber donör saha komplikasyonlarının görülmesi, hastanede kalış ve iyileşme sürecinin uzaması nedeniyle kullanımlarıyla ilgili çekinceler vardır.

Otojen kemik greftlerinin kullanımlarındaki kısıtlılıklar olması bunların yerine geçecek biyoimplantların kullanımlarına neden olmuştur. Kemik yerine kullanılacak olan ideal materyellerin toksik, antijenik, irritan, karsinojenik etkileri olmamalı ayrıca fibröz dokunun defekt bölgesini doldurmasına engel olması gerekmektedir. Otojen kemik greftlerinin iyileşmesi kemik kırıklarının iyileşmesine benzerlik göstermektedir. Kullanılacak olan otojen kemik grefti tipi, alıcı sahanın kanlanması, onarım zamanı gibi sebepler greftin rezorbsiyon ve iyileşme durumunu etkiler. Otojen kemik greftlerinde yeni

kemik oluşumu alıcı alanın kan akımına bağlıdır. Yeterli bir vaskularizasyona, greftleme yapılan anatomik alana, greftin yapısına, içerdiği canlı hücre sayısına, büyüme faktörlerine, greftin içerdiği immünojenik faktörlere ve greft allojenik ise hazırlanış yöntemine bağlı olarak değişebilmektedir. Kortikal ve kansellöz kemik greftleri arasında revaskularizasyon farkı vardır. Otojen kansellöz kemik greftlerinde 7.günde kan damarları grefte ilerler (50). Kortikal kemik greftlerinde bu süre daha uzundur. Otojen kortikal kemik greftlerinde vasküler penetrasyon osteoklastik aktiviteye bağlı olarak gelişir. Kortikal ve kanselloz otojen kemik greftleri arasındaki histolojik olarak en belirgin farklılık revaskularizasyondadır. Kanselloz kemik greftleri kortikal kemik greftlerine göre daha iyi revaskularize olur. Genellikle otojen kanselloz kemik greftinde 6-7. günlerde kan damarları grefte ilerler (51). Kortikal kemik greftlerinde ise bu sürede revaskularizasyon başlamaz. Kortikal kemik yapısından dolayı vasküler penetrasyon, volkmann ve haversiyan kanallarında osteoklastik aktivitenin olmasına bağlıdır. Kortikal kemiklerin tam revaskularizasyonları aylar gerektirebilir. Kanselloz kemik greftleri daha erken bir sürede tamamen yeni kemik ile yer değiştirirken, kortikal kemik greftlerinde aynı sürede hala nekrotik ve canlı kemik yan yana görülebilir .

Shahabooui ve arkadaşlarının çalışmasına göre doksisisiklinin rat maksilla alveoler alanında yeni kemik oluşumuna belirgin katkısı olduğu gösterilmiştir aynı şekilde Lucateli ve arkadaşlarının otojen kemik grefti ve doksisisiklin lokal uygulamasında kritik boyuttaki kemik defektlerinde doksisisiklinin yeni kemik oluşuma etkisi olumlu yönde görülmüştür çalışmamızda da doksisisiklinin kemik grefti ile rekonstrüksiyon yapılan rat femurlarında osteokondüktif etkiye olan katkısı ile kemik kırıklarında olan iyileşmeye etkisi değerlendirilmiştir. 14. günde ve 28. günde doksisisiklin ile tedavi uygulanan rat femurlarında kontrol gruplarına göre yeni kemik oluşumunda anlamlı artış olmuştur (52).

Hücre matriks etkileşimleri, ekstrasellülmatriks bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler tarafından düzenlenir. Proteolitik enzimler matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin denetlenmesi, hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümünde temel rol oynar. Matriks metalloproteinazlar bu enzim sistemleri içerisinde önemli bir yer tutar. Endopeptidaz ailesine üye olan matriks metalloproteinazlar çinko ve kalsiyum bağımlıdır. İlk tespit edildiklerinde tümör büyümesine katkıda bulunduğu düşünülmüştür fakat daha sonra vücutta yapım ve yıkımla devam eden çoğu fizyolojik, patolojik süreçte doğal olarak bulundukları ortaya konmuştur. MMP lerin etkinliklerinin denetimlerinin kaybolması sonucu artrit, kanser , fibrozis, anevrizma gibi

patolojiler ortaya çıkmaktadır. Özellikle MMP-2 ve MMP-9'un kemik oluşumunda, kırık yeniden düzenlenmesinde etkinlikleri ortaya konmuştur. MMP 2'si olmayan farelerde belirgin bir anomali gelişmezken, MMP-2'si mutasyona uğramış insanlarda otozomal resesif bir genetik hastalık olan multisentrik osteolizis ortaya çıkar.

Xuefeng Zheng ve arkadaşlarının overiektomili ratlarda osteoporoz ile MMP-2 ve MMP-9 ilişkisini gösterdikleri çalışmada MMP-2 ve MMP-9 salınımlarının önemli ölçüde arttığı ve osteoporozun ilerlediği gösterilmiştir (53). Çalışmamızda MMP-2 seviyeleri doksisisiklin ile tedavi edilen gruplarda kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüş gösterdiğini bununda yeni kemik oluşumunu desteklediğini gösterdik. Bunun yanı sıra Kensaku Masuhara ve arkadaşlarının kalça osteoartritinde MMP-9 ve MMP-2 serum seviyelerinin artışı gösterdiği çalışmada göz önüne alırsak çalışmamızdaki doksisisiklin tedavisi alan gruplardaki MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinde yine anlamlı bir düşüş vardır (54).

Mei Lua ve arkadaşlarının kemik greft rezorbsiyonu ile MMP-9 ilişkisini ortaya koydukları çalışmada MMP 9 seviyelerinin artış gösterdiği ortaya konmuştur (55). Çalışmamızda MMP-9 seviyelerinde 14. Gün ve 28 .günde bazal seviyelerine göre bir miktar artmış olmakla birlikte deney gruplarında kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu tespit edildi. MMP-9 seviyelerindeki bazal miktara göre olan artışın kemik fraktüründe ve greft uygulamasında görülen doğal artışa bağlı olduğu düşünüldü. Deney grubundaki MMP-9 seviyelerinin kontrol gruplarına göre daha düşük olması doksisisiklinin etkinliğini ortaya koymakla beraber doksisisiklin dozundan MMP-2 gibi etkilenmemiş olması ve bazal seviyeye göre yüksek tespit edilmesi kemik remodelling döneminde MMP-9 un daha etkin olduğu sonucunu düşündürdü. Daha etkin MMP-9 inhibisyonu için uygulanacak doksisisiklinin dozunun daha yüksek olması gerektiğini gösterdi.

Doksisisiklin tetrasiklin grubunda yer alan bir antibiyotiktir. Tetrasiklinlerin yapılan çalışmalarda birçok hücresel fonksiyonu etkileyen pluripotent ilaçlar olduğu gösterilmiştir. Doksisisiklinin ve diğer tetrasiklin türevlerinin MMP inhibisyonu yaptıkları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. MMP inhibisyonu ile dokuya lökosit ve makrofaj akımını azalttığı, kollojenazlar üzerine baskısı ile yara iyileşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ekstrasellüler matriks degradasyonunda asıl rolü MMP'lerin oynadığı düşünülmektedir çoğu biyolojik ve patolojik süreçlerde bu sayede metalloproteinaz etkisi çok yüksektir. Bu biyolojik ve patolojik süreçlerde MMP inhibisyonu endojen olarak makroglobulin ve TIMP'lar tarafından kontrol edilmektedir. Endojen inhibitörlerin yanı sıra

tgf, retinoid, heparin, kortikosteroidler, tetrasiklinler, katesin gibi ekzojen inhibitörler de bulunmaktadır. Bunlardan tetrasiklinlerin nötrofiller üzerinden reperfüzyon hasarında engellediği gösterilmiştir. Literatürde doksisiklinin yara iyileşmesi, kemik rezorbsiyonu, aterom plaklarının oluşması üzerine etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Doksisiklin jel formları veya perkütanöz uygulamalarıyla anevrizmal kemik kistlerinin tedavi edilebileceği ortaya konmuştur (56, 57).

Çalışmamızda doksisiklinin kemik grefti ile rekonstrüksiyon yapılan rat femurlarında osteokondüktif etkiye olan katkısı ile kemik kırıklarında olan iyileşmeye etkisi değerlendirilmiştir. Rat femur shaftlarından alınan segmenter kemik aynı defekt yerine kemik grefti şeklinde intramedüller çivi ile yerleştirildikten bir gün sonra ratlara gavaj yöntemi ile doksisiklin 5mg/kg günden 14 ve 28 gün boyunca uygulanmış kontrol ve deney gruplarında 14.gündeki ve 28 .gündeki rat MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri ile rat femurlarındaki iyileşme karşılaştırılmıştır. Doksisiklin ve kontrol grupları karşılaştırıldığında histopatolojik olarak 14. ve 28 . gündeki kemik grefti ve kemik kırık hatlarındaki iyileşmesinin doksisiklin gruplarında daha iyi olduğunu saptandı. MMP-2 seviyelerinin 14. Günde ve 28. Günde deney gruplarında daha anlamlı şekilde düştüğü MMP-9 seviyelerininde 14. Gün ve 28 .günde bazal seviyelerine göre bir miktar artmış olmakla birlikte deney gruplarında kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu tespit edildi.

Rekonstrüksiyon amacıyla veya estetik amaçla uygulanan kemik greftlerinin kırık iyileşmesindeki ileri dönemdeki sonuçların daha iyi olmasının sekonder ameliyatları azaltmak, hastaların hastanede kalış sürelerini kısaltmak için maliyeti düşük ve kullanımı kolay olan doksisiklinin faydalı olabileceğini düşünmekteyiz. İnsan ömrü ile rat ömrü karşılaştırıldığında 2 haftalık rat ömrünün 1 yıllık insan ömrüne karşılık gelmesinden dolayı klinik olarak insanda uygun dozda tedavi süresini belirlemek yeni amacımız olacaktır.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Estetik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen çalışmada Wistar Albino tipi ratlarda deneysel olarak doksisisiklin kullanımı ile kemik greftlerinin segmenter kemik defektlerinin iyileşmesine etkisi araştırıldı.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında aşağıdaki sonuçlara varıldı :

- 1- Doksisisiklin kemik grefti uygulamalarında kemik defekti alanının iyileşmesini anlamlı olarak arttırdı
- 2- Antibiyoterapi amaçlı kullanılan doksisisiklinin MMP inhibisyonu etkisi deneyimizde biyokimyasal olarak kanıtlandı
- 3- Kemik defektlerinin onarımında birçok yöntem olmakla beraber otojen kemik greftlerinin kullanımı ile yapılan onarımlarda iyileşme oranlarının doksisisiklin ile artmış olması gelecekte doz ayarlaması ile daha başarılı sonuçlar elde edilebileceğini gösterdi

Subantimikrobiyal dozlarda doksisisiklin kullanımı ile kemik greftlerinin kemik defektlerinin iyileşmesine katkısının arttırılabileceği güvenli ,kolay kullanılabilir,maliyeti ucuz bir tedavi yöntemi olabileceği görüşündeyiz

ÖZET

Günümüzde plastik cerrahide kemik greftleri kullanımı çeşitli sebeplere bağlı olarak yapılmaktadır. Kemik defektlerine kemik grefti uygulamaları rekonstrüksiyon cerrahisinde önemli bir yer tutmaktadır. Otojen kemik grefti kullanımı altın standart uygulama olmakla beraber otojen kaynakların kısıtlılığı sekonder operasyon ihtiyacı olması durumunda klinik olarak sıkıntılar yaşanmaktadır. Ayrıca otojen kemik grefti donör alanında gelişebilecek komplikasyonlarda kullanımlarını belli oranda kısıtlamaktadır. Kullanılacak olan otojen kemik greftinin kemik defektinin iyileşmesi üzerine etkisini arttırabilmek bu sebeplerde dolayı oldukça önemlidir.

Çalışmamızda 36 adet wistar albino tipi rat 9 lu gruplara ayrılarak kullanıldı. İlk iki grup kontrol grubu, son iki grup deney grubu olarak belirlendi. Tüm gruplardaki ratların operasyon öncesi tam anestezi altında kuyruk venlerinden bazal matriks metalloproteinaz tip 2 ve tip 9 seviyelerinin ölçümü için kan örnekleri alındı. Kan alımında bir gün sonra tüm ratlar tam anestezi altındayken femur diafizer kısımlarından segmenter kemik rezeksiyonu yapılarak aynı kemik segment eski yerine kemik grefti şeklinde intramedüller çivi kullanılarak yerleştirildi.

Deney gruplarına 28 gün boyunca doksisisiklin 5mg /kg günden olacak şekilde gavaj yöntemi ile verildi. Bu dönem boyunca kontrol gruplarına 28 gün boyunca hiçbir tedavi uygulanmadı. 14. günde kontrol ve deney gruplarının ilk gruplarından intrakardiyak kan alınarak santrifüje edildi sonrasında serum örnekleri alındı. Kemik grefti ile onarım yapılan femurları patolojik inceleme amaçlı rezeke edildi. Diğer kontrol ve deney grubuna 28. günde aynı operasyon patolojik inceleme için ve kan alımı serum örnekleme için yapıldı. 14. gündeki matriks metalloproteinaz tip 2 serum seviyelerinin deney gruplarında kontrol gruplarına göre doksisisiklin etkisi ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Matriks metalloproteinaz tip 9 serum seviyelerinin deney gruplarında kontrol gruplarına

göre azaldığı fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. 14. günde deney gruplarının kemik greftlerinin yerleştirildiği alanda kemik kallus kalınlığı ve kallus yüzdesinin greft alanına oranının kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü. 28. gündeki matriks metalloproteinaz tip 2 serum seviyelerinin deney gruplarında kontrol gruplarına göre doksisisiklin etkisi ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Matriks metalloproteinaz tip 9 serum seviyelerinin deney gruplarında kontrol gruplarına göre azaldığı fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. 28. günde deney gruplarının kemik greftlerinin yerleştirildiği alanda kemik kallus kalınlığı ve kallus yüzdesinin greft alanına oranının kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü. Bu veriler ile değerlendirildiğinde doksisisiklinin otojen kemik grefti kullanılarak yapılan kemik defekti onarımında defekt alanında kemik iyileşmesini önemli oranda arttırdığını gösterdik. Doksisisiklinin subantimikrobiyal dozlarda matriks metalloproteinaz inhibisyonu sağlayarak kemik greftinin kemik defektinde olan iyileşmesini arttırmakta ve bunun ileriki dönemlerde plastik cerrahide yeni bir kullanım alanı oluşturmaya zemin hazırlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Doksisisiklin, matriks metalloproteinaz, kemik grefti

THE EFFECT OF DOXYCYCLINE ON HEALING OF BONE GRAFTS

SUMMARY

Today, the use of bone grafts in plastic surgery is done for various reasons. Bone grafting of bone defects has an important role in reconstruction surgery. The use of autogenous bone grafting is the gold Standard. Clinical problems may occur if secondary surgery is needed because of the autogenous resources are limited. In addition, bone graft donor area complications limited the using of the autogenous bone. It is important to increase the effect of autogenous bone graft on healing of bone defect because of the these reasons.

In this study, 36 wistar albino rats were divided into four groups. The first two groups were the control group and the last two groups were experimental group. Blood samples were taken from the tail veins for the measurement of basal matrix metalloproteinase type 2 and type 9 levels under full anesthesia of rats in all groups. One day after blood samples were taken, segmental bone resection was performed on the femoral diaphyseal sections while all rats were under full anesthesia and the same bone segment was replaced with intramedullary nail like a bone graft.

Doxycycline was given to the experimental groups by gavage method for 5 mg/kg/day for 28 days. During this period, no treatment was given to the control groups for 28 days. On the 14th day, intracardiac blood was taken from the first groups of the control and experimental groups and centrifuged. After that serum samples were taken. Femurs repaired with bone graft were resected for pathological examination. On the 28th day, the same operation was performed for pathological examination and blood collection serum sampling for the other control and experimental groups. Matrix metalloproteinase type 2 serum levels

on the 14th day were significantly decreased in the experimental groups with the effect of doxycycline compared to the control groups. Matrix metalloproteinase type 9 serum levels were decreased in the experimental groups compared to the control groups, but this was not statistically significant.

On the 14th day, the ratio of bone callus thickness and callus percentage to the graft area in the area where the bone grafts of the experimental groups were placed was significantly higher than the control groups.

Matrix metalloproteinase type 2 serum levels on the 28th day were significantly decreased in the experimental groups with the effect of doxycycline compared to the control groups. Matrix metalloproteinase type 9 serum levels decreased in experimental groups compared to control groups but this was not statistically significant. On the 28th day, the ratio of bone callus thickness and callus percentage to the graft area in the area where the bone grafts of the experimental groups were placed was significantly higher than the control groups. When evaluated with these data, we demonstrated that doxycycline significantly improves bone healing in the defect area in bone defect repair using autogenous bone graft. Subantimicrobial doses of doxycycline provide matrix metalloproteinase inhibition, which increases bone graft healing in bone defect and provides a new field of use in plastic surgery in the future.

Key Words: Doxycycline, matrix metalloproteinase, bone graft

KAYNAKLAR

1. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel histoloji. 7. baskı. İstanbul: Barış Kitap Evi; 1993:8-141
2. Tam C, Harrison J, Reed R, Cruickshank B. Bone apposition rate as an index of bone metabolism. *Metabolism*. 1978;27 :143-50.
3. Aarden EM, Nijweide PJ, Van Der Plas A, Alblas MJ, Mackie EJ, Horton MA, et al. Adhesive properties of isolated chick osteocytes in vitro. *Bone*. 1996;18 :305-13.
4. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology: Elsevier Health Sciences; 2006.
5. Brookes M, Harrison R. The vascularization of the rabbit femur and tibiofibula. *Journal of anatomy*. 1957;91(Pt 1):61.
6. Abraham L, Kierszenbaum M. Histology and Cell Biology. An introduction to Pathology: Mosby Inc.; 2002. 130-56 p.
7. Bancroft J, Layton C, Suvana S. Bancroft's theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. 2013;7th edn:322-5.
8. Vinay K, Abbas AK, Fauston N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Saunders, El Sevier, China. 2005;8:1274-82.
9. Junqueira LC, Mescher AL. Junqueira's basic histology: text & atlas/Anthony L. Mescher: New York [etc.]: McGraw-Hill Medical; 2013.

10. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*. 2004;35(5):1003-12.
11. Asaumi K, Nakanishi T, Asahara H, Inoue H, Takigawa M. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing. *Bone*. 2000;26(6):625-33.
12. Akay M. Genel Histoloji. 5. Baskı. Palme Yayınevi, Ankara. 2001:126-82.
13. Ross M, Pawlina W. Histology, A text and atlas, with correlated cell and molecular biology: Lippincott Williams & Wilkins; 2017.
14. Junqueira LC CJ. Temel Histoloji (Çev. Y.Aytekin, S.Solakoğlu). İstanbul: 1993:8-142
15. Bloom W FD. A Textbook of Histology. Bloom W FD, editor. New York, NY, 1994: Chapman & Hall; 1994.
16. Pazzaglia UE, Congiu T, Raspanti M, Ranchetti F, Quacci D. Anatomy of the intracortical canal system: scanning electron microscopy study in rabbit femur. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2009;467(9):2446-56.
17. LA K. Histoloji ve hücre biyolojisi. Çeviri: R Demir) Ankara: Palme Yayıncılık. 2006:95-129.
18. Bronner F, Farach-Carson MC, Roach HI. Bone and development: Springer Science & Business Media; 2010.
19. Weinstein SL, Buckwalter JA. Turek's orthopaedics: principles and their application: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
20. Ege R. Travmatoloji: kırıklar-eklem yaralanmaları: Yayl. y.; 1989.
21. Miloro M. Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery. 2 ed: PMPH-USA; 2004.

22. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *JBJS*. 2002;84(3):454-64.
23. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics*. 2002;25(5):S601-S9.
24. Yashavantha Kumar C, Nalini K, Jagdish Menon DKP, Banerji B. Calcium sulfate as bone graft substitute in the treatment of osseous bone defects, a prospective study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2013;7(12):2926.
25. Rosenberg E, Rose LF. Biologic and clinical considerations for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. *Dental clinics of North America*. 1998;42(3):467-90.
26. Bauer TW, Togawa D. Bone graft substitutes: towards a more perfect union. *Orthopedics*. 2003;26(9):925-6.
27. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *JBJS*. 2001;83(2):S98-103.
28. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Annals of periodontology*. 2003;8(1):227-65.
29. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials—from space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40(8):706-18.
30. Mulliken JB, Kaban LB, Glowacki J. Induced osteogenesis—the biological principle and clinical applications. *Journal of Surgical Research*. 1984;37(6):487-96.
31. Kale A, Di PC. Osteoinductive agents. Basic science and clinical applications. *American journal of orthopedics (Belle Mead, NJ)*. 1995;24(10):752-61.

32. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2000;371(8):10-27.
33. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ journal of surgery*. 2001;71(6):354-61.
34. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurgical focus*. 2001;10(4):1-4.
35. Probst A, Spiegel H-U. Cellular mechanisms of bone repair. *Journal of Investigative Surgery*. 1997;10(3):77-86.
36. REEL B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2006;26(5):527-37.
37. Tüzün Y GM, Oğuz O, Aksungur VL. *Dermatoloji Cilt 1 3. Baskı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.
38. Nagase H, Woessner J. Minireview. Matrix Metalloproteinases *J Biol Chem*. 1999;274(21):491-21.
39. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003;92(8):827-39.
40. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circulation research*. 2001;89(3):201-10.
41. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circulation research*. 1995;77(5):863-8.
42. Golub L, Ramamurthy N, McNamara T, Gomes B, Wolff M, Casino A, et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity: a new mechanism in the treatment of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*. 1984;19(6):651-5.

43. Ryan ME, Usman A, Ramamurthy N, Golub LM, Greenwald RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Current medicinal chemistry*. 2001;8(3):305-16.
44. Golub L, Lee H-M, Ryan M, Giannobile W, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Advances in dental research*. 1998;12(1):12-26.
45. Greenwald R, Golub L, Lavietes B, Ramamurthy N, Gruber B, Laskin R, et al. Tetracyclines inhibit human synovial collagenase in vivo and in vitro. *The Journal of rheumatology*. 1987;14(1):28-32.
46. Seftor RE, Seftor EA, De Larco JE, Kleiner DE, Leferson J, Stetler-Stevenson WG, et al. Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. *Clinical & experimental metastasis*. 1998;16(3):217-25.
47. Fife R, Sledge Jr G. Effects of doxycycline on cancer cells in vitro and in vivo. *Advances in dental research*. 1998;12(1):94-6.
48. Selzer MG, Zhu B, Block NL, Lokeshwar BL. CMT-3, a Chemically Modified Tetracycline, Inhibits Bony Metastases and Delays the Development of Paraplegia in a Rat Model of Prostate Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;878(1):678-82.
49. Tessone A, Feinberg MS, Barbash IM, Reich R, Holbova R, Richmann M, et al. Effect of matrix metalloproteinase inhibition by doxycycline on myocardial healing and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovascular drugs and therapy*. 2005;19(6):383-90.
50. Ray RD. Vascularization of bone grafts and implants. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007). 1972;87:43-8.
51. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 1983(174):28-42.

52. Shahabooei M, Razavi SM, Minaiyan M, Birang R, Behfarnia P, Yaghini J, et al. A histomorphometric study of the effect of doxycycline and erythromycin on bone formation in dental alveolar socket of rat. *Advanced biomedical research*. 2015;4.
53. Zheng X, Zhang Y, Guo S, Zhang W, Wang J, Lin Y. Dynamic expression of matrix metalloproteinases 2, 9 and 13 in ovariectomy-induced osteoporosis rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;16(3):1807-13.
54. Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;46(10):2625-31.
55. Lu M, Rabie A. Matrix metalloproteinase-9 regulates graft bone resorption. *The Angle orthodontist*. 2006;76(4):598-604.
56. Woon JT, Hoon D, Graydon A, Flint M, Doyle AJ. Aneurysmal bone cyst treated with percutaneous doxycycline: is a single treatment sufficient? *Skeletal radiology*. 2019;48(5):765-71.
57. Lyons KW, Borsinger TM, Pearson AM. Percutaneous Doxycycline Foam Injections: Novel Treatment Method for Vertebral Aneurysmal Bone Cysts. *World neurosurgery*. 2019;125:3-5.

EKLER

