



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA 1. BÖLGE KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ GENEL
SEKRETERLİĞİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
ORTOPEDİ ve TRAVMATOLOJİ KLİNİĞİ

MASQUELET TEKNİĞE KONSANTRE GROWTH FAKTÖR
EKLENMESİNİN OLUŞAN MEMBRAN ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Orkun YILMAZ

TEZ DANIŞMANI

Op. Dr. Ahmet ÖZMERİÇ

ANKARA 2017

KABUL ONAY SAYFASI



T.C.
Sağlık Bakanlığı
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi
“Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Karar Defteri”

Toplantı No: 0035

01.12.2016

PROJENİN ADI (Varsa Kodu): Masquelet tekniği konsantre growth faktör eklenmesinin oluşan membran üzerine etkilerinin araştırılması.

SORUMLU ARAŞTIRMACI : Dr.Ahmet ÖZMERİÇ. Tez Çalışması

T.C.S.B.Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği

(Dr.Orkun Yılmaz, Dr.Ahmet Özmeriç, Doç.Dr.Kadir Bahadır Alemdaroğlu, Dr.Pınar Celepli, Dr.Sema Hücümenoğlu)

ARAŞTIRMAYI DESTEKLEYEN KURULUŞ(LAR): Desteklenmesi amacı ile henüz biryere gönderilmemiştir.

KARAR:

446.Çalışmanın Protokol, usul, yaklaşım ve yöntem yönünden “ETİK” değerlendirmesinde “UYGUN” “OLDUĞUNA”/“OLMADIĞINA” “OYBİRLİĞİ” / “OYÇOKLUĞU” ile karar verilmiş ve araştırma için belirlenen tüm hayvan, uygulama, tetkik ve girişimlerin bedellerinin araştırma grubunca karşılanması kaydı ile çalışmanın yapılmasına ve Hastanemiz arşiv bilgi ve belgelerinin ve Hayvan Deneyleri Laboratuvarı’nın kullanılmasına “İZİN” “VERİLMİŞTİR” / “VERİLMEMİŞTİR”.

Prof.Dr.Uğur KOÇER

Doç.Dr.Kemal KİSMET
(Raportör)

Doç.Dr.Nezih SUNGUR

Ahmet Zeki GÜLER
(Sivil Toplum Örgütü Üyesi)

Doç.Dr.Yalçın ARAL

Veteriner Hek. Cengiz YALÇIN
(Raportör ve Kurul Sereteri)

Gülcan BAŞEĞMEZ
(Sivil Üye)

TEŞEKKÜR

Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğinde ihtisas eğitimim süresince; iyiyi, doğruyu ve günceli bulmama yardımcı olan, bizleri devamlı araştırmaya özendiren, asistanı olarak çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Kadir Bahadır ALEMDAROĞLU'na, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, akademisyen ve cerrah olarak kendime örnek almaya çalıştığım, yanında asistanı olarak çalışmaktan onur duyduğum, yetişmemde büyük emeği olan değerli ağabeylerim Doç. Dr. Serkan İLTAR ve Doç. Dr. Veysel Ercan DİNÇEL'e ve Op. Dr. Özgür ŞAHİN'e, severek çalıştığım bu tez konusunu belirlememde ve bu tezi oluşturmamda bana çok yardımcı olan, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, tez danışmanım değerli ağabeyim Op. Dr. Ahmet ÖZMERİÇ'e, tez çalışmamın her aşamasında benden desteğini hiç bir şekilde esirgemeyen Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği'nden Prof. Dr. Sema HÜCÜMENOĞLU ve Uzm. Dr. Pınar CELEPLİ'ye, ve Gazi Üniversitesi Dekanı Prof. Dr. Nurdan ÖZMERİÇ KURTULUŞ'a, Gazi Üniversitesi Periodontoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Berrin ÜNSAL ve araştırma görevlisi Dr. Fatma SOYSAL'a, ihtisas sürem içerisinde emekli olan, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım çok değerli ağabeylerim Op. Dr. İlhami TELLİ ve Op. Dr. Talip KARA'ya, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum ve bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, kıymetli hocam Prof. Dr. Nevres Hürriyet AYDOĞAN'a, teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İhtisas sürem boyunca desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Cem Nuri AKTEKİN'e ve diğer uzman ağabeylerim Doç. Dr. Ertuğrul AKŞAHİN'e, Op. Dr. Abdurrahman SAKAOĞULLARI'na, Op. Dr. Murat PEPE'ye, Op. Dr. Onur KOCADAL'a ve Op. Dr. Kubilay Uğurcan CERİTOĞLU'na teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Her zaman birlik ve beraberlik içinde çalıştığımız arkadaşlarım, Op. Dr. Deniz GÜL, Op. Dr. Mehmet Yücens, Op. Dr. Emre GÜLTAÇ, Op. Dr. Alper ÖZTÜRK, Op. Dr. Ahmet Suphi DİKMEN, Dr. Oğuzhan TANOĞLU, Dr. Orkun YILMAZ, Dr. Gökhan ARICAN, Dr. M. Burak GÖKGÖZ, Dr. İ. Özay SUBAŞI, Dr. H. Çağlayan KAHRAMAN, Dr. Emre ATMACA ve Dr. H. Can TAŞKENT'e, beraber çalışmaktan zevk duyduğum hastanemiz klinikleri ve ameliyathanelerinde görevli doktor, hemşire, teknisyen ve diğer çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince sabrı ve fedakarlığıyla yanımda olan sevgili eşim Hale ÖNDER YILMAZ'a

Beni yetiştiren, hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canlarım annem Leyla YILMAZ ve babam Tayfur YILMAZ'a, can kardeşim Utku YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Orkun YILMAZ

ANKARA 2017



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kemik Doku	3
2.1.1 Kemik Hücreleri	4
2.1.1.1 Osteoblastlar.....	4
2.1.1.2 Osteositler	4
2.1.1.3 Osteoklastlar.....	4
2.1.2 Kemik Matriks	5
2.1.3 Periost ve Endosteum	5
2.2 Kemik Türleri	5
2.2.1 Lamellar Kemik	6
2.2.2 Woven (immatur) Kemik.....	8
2.3 Kemik Gelişimi (Osteogenezis)	8
2.3.1 İntramembranöz Kemikleşme.....	8
2.3.2 Endokondral Kemikleşme.....	9
2.4 Kırık İyileşmesi	10
2.4.1 Primer Kırık İyileşmesi.....	10
2.4.2 Sekonder Kırık İyileşmesi	11
2.4.2.1 İnflamasyon Fazı.....	12
2.4.2.2 Onarım (Yumuşak ve Sert Kallus) Fazı	13
2.4.2.3 Remodelling Fazı	15

2.5 Nonunion (Psödoartroz)	17
2.5.1 Nonunion Etyolojisi.....	17
2.5.1.1 İnstabilite.....	17
2.5.1.2 Yetersiz Vaskülerite	18
2.5.1.3 Zayıf Kemik Teması	18
2.5.1.4 Enfeksiyon	19
2.5.1.5 Sigara İçimi	19
2.5.1.6 İlaç Kullanımı	19
2.5.2 Nonunion Sınıflandırması.....	19
2.5.3 Nonunionun Değerlendirilmesi.....	20
2.5.3.1 Anamnez	21
2.5.3.2 Fizik Muayene.....	21
2.5.3.3 Radyoloji.....	21
2.5.3.3.1 Direkt Grafi	21
2.5.3.3.2 Bilgisayarlı Tomografi	22
2.5.3.3.3 Kemik Sintigrafisi	22
2.5.4 Nonunion Tedavisi.....	22
2.5.4.1 Cerrahi Dışı Tedavi.....	22
2.5.4.2 Cerrahi Tedavi.....	23
2.5.4.2.1 Kaynamama Tedavisinde Plak Vida Kullanımı	24
2.5.4.2.2 Kaynamama Tedavisinde İntramedüller Çivi Kullanımı	24
2.5.4.2.3 Kaynamama Tedavisinde Eksternal Fiksator Kullanımı	26
2.5.4.2.4 Kaynamama Tedavisinde Artroplasti	26
2.6 Segmenter Kemik Kaybı Olan Kaynamamaların Tedavisi	27
2.6.1 İlizarov Tekniği İle Kemik Defektlerinin Tedavisi	27
2.6.2 Masquelet Tekniği İle Kemik Defektlerinin Tedavisi	28
2.6.2.1 Tekniğin Prensipleri.....	28
2.6.2.2 Yabancı Cisim Reaksiyonu ile İndüklenmiş Membran Oluşması	29
2.6.2.3 Oluşan Membranın Histolojisi	30
2.7 Konsantre Growth Faktör (CGF)	31
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1 CGF nin Hazırlanması.....	36
3.2 Cerrahi Prosedür.....	38

3.3 Histopatolojik Değerlendirme	42
3.3.1 Elastik Fiber	42
3.4 İmmünohistokimyasal İnceleme.....	43
3.4.1 Proliferasyon.....	44
3.4.2 Vaskülarizasyon.....	44
3.4.3 İnflamasyon	44
3.4.4 STRO-1	44
3.5 İstatistiksel Yöntem.....	45
4. SONUÇLAR	46
4.1 Membran Kalınlığı	46
4.2 Elastik Fiber Oranı	48
4.3 Vaskülarizasyon	50
4.4 İnflamasyon	53
4.5 Proliferasyon	55
4.6 Kök hücre varlığı.....	57
5. TARTIŞMA	59
6. KAYNAKÇA.....	65

KISALTMALAR

M-CSF	: Makrofaj -Koloni- Stimulating Faktör
RANKL	: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör
IL	: İnterlökin
MSC	: Mezenkimal Stem Cell
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
TGF	: Transforming Growth Factor
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
NSAİD	: Non- Steroidal Antienflamatuar İlaç
PMMA	: Polimetilmetakrilat
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
IGF	: İnsulin-like Growth Factor
PRP	: Trombosit Zengin Plazma
PRF	: Trombosit zengin Fibrin
CGF	: Konsantre Growth Faktör
PPP	: Trombosit Fakir Plazma
PECAM-1	: Platelet Endotelyal Adezyon Molekülü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Uzun kemiklerin şematik yapısı.	7
Şekil 2. Endrokondral kemikleşme	10
Şekil 3. Primer kırık iyileşmesi.....	11
Şekil 4. Sekonder kırık iyileşmesi	16
Şekil 5. İlizarov tekniği ile kemik defektinin tedavisi	28
Şekil 6. PRP nin hazırlanışı	32



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar	3
Resim 2. Kemiğin yapısı.....	6
Resim 3. PRF nin hazırlanışı	33
Resim 4. CGF'nin hazırlanması.	37
Resim 5. CGF'nin hazırlanması devamı.....	38
Resim 6. Cerrahi işlem.	40
Resim 7. Cerrahi işlem devamı.....	41
Resim 8. Cerrahi işlem sonrası postop grafi.....	42
Resim 9. Membran kalınlığının değerlendirilmesi	46
Resim 10. Elastik Fiberlerin Değerlendirilmesi	48
Resim 11. Vaskülarizasyonun değerlendirilmesi	51
Resim 12. İnflamasyonun değerlendirilmesi.	53
Resim 13. Proliferasyonun değerlendirilmesi.....	55
Resim 14. Kök hücre varlığının değerlendirilmesi.....	57

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmadaki gruplar	36
Tablo 2. Çalışmada kullanılan antikorların isimleri, dilüsyonları ve ticari kaynakları	43
Tablo 3. Membran kalınlığının gruplara göre dağılımı	47
Tablo 4. Grupların membran kalınlığının p değerlerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 5. Elastik fiber oranının gruplara göre dağılımı	49
Tablo 6. Grupların elastik fiber oranlarının p değerlerinin karşılaştırılması.....	50
Tablo 7. CD31 + boyanan hücre sayılarının gruplara göre dağılımı.....	50
Tablo 8. Grupların CD31 + boyanan hücre sayılarının p değerlerinin karşılaştırılması	52
Tablo 9. MAC387 + boyanan hücre sayılarının gruplara göre dağılımı	53
Tablo 10. Grupların MAC387 + boyanan hücre sayılarının p değerlerinin karşılaştırılması.....	55
Tablo 11. Ki67 proliferasyon indeksinin gruplara göre dağılımı	56
Tablo 12. Grupların Ki67 proliferasyon indeksinin p değerlerinin karşılaştırılması	57
Tablo 13. STRO 1 + boyanan hücre sayılarının gruplara göre dağılımı	58
Tablo 14. Grupların STRO 1 + boyanan hücre sayılarının p değerlerinin karşılaştırılması	58

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Gruplara göre membran kalınlıkları	47
Grafik 2. Gruplara göre Elastik Fiber Oranı	49
Grafik 3. Gruplara göre CD31 + boyanan hücre sayısı	52
Grafik 4. Gruplara göre MAC387 + boyanan hücre sayısı	54
Grafik 5. Gruplara göre Ki67 + hücre oranı	56



ÖZET

Masquelet tekniği geniş kemik defektlerinin cerrahi tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Son yıllarda tanımlanan Konsantre Growth Faktör (CGF)' ün tıpta birçok alanda kullanımı mevcuttur. Literatürde Masquelet tekniğe CGF ekleyerek oluşan membranın kalitesini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık.

Bu deneysel çalışmamızda 3. ve 6. haftada kemik çimentosunun yabancı cisim reaksiyonu ile üzerinde oluşan membranın histokimyasal olarak kalınlığının , elastik fiberlerin oranının ve immünohistokimyasal olarak oluşan membranın vaskülarizasyon (CD31), inflamasyon (MAC387) ,proliferasyon (Kİ67) ve oluşan kök hücre (STRO-1) sayısının karşılaştırılması amaçlandı.

Toplam 24 tavşan randomize ve her grupta 6 şar tavşan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup I ve Grup III, sadece Masquelet teknik uygulanacak kontrol grupları, sırasıyla 3. ve 6. haftada sakrifiye edilmek üzere, Grup II ve Grup IV, tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak gruplar, sırasıyla 3. ve 6. haftada sakrifiye edilmek üzere düzenlendi. Tüm gruplarda çimentonun üzerinde oluşmuş membran zarar verilmeden eksize edildi. Bu membran histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak CD31, MAC387, Ki67 ve STRO-1 boyaları ile incelendi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Membranın kalınlığı karşılaştırıldığında Grup 4 te membran Grup 3 e göre daha kalın ölçüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,004$). *Membrandaki elastik fiber oranının* ise Grup 2 de Grup 1 e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışı mevcuttu ($p=0,037$). *Membranın vaskülarizasyonunun*, Grup 4 de Grup 3 e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışı mevcuttu ($p= 0,04$). *Membranın inflamasyonu*, Grup 2 de Grup 1 e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulundu ($p= 0,04$). Aynı şekilde Grup 4 te inflamasyon Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek izlendi ($p= 0,04$). *Membrandaki proliferasyon*, Grup 2 de Grup 1 e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulundu ($p= 0,05$). Aynı şekilde Grup 4 ün proliferasyon indeksi Grup 3 e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulundu ($p=0,06$). *Membrandaki kök hücre varlığı*, kök hücre nadir olarak görülmesine rağmen, 3. haftada Grup 2 de Grup 1 e göre kök hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı oranda fazla bulundu ($p=0,036$). 6. haftada ise her iki grupta kök hücre bulunamadı.

Sonuç olarak; Masquelet tekniğe CGF eklenmesi ile 3. haftada inflamasyonun, proliferasyonun, kök hücre varlığının ve elastik fiber oranının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu, 6. haftada ise inflamasyonun, vaskülarizasyonun, proliferasyonun ve membran kalınlığının kontrol grubuna göre CGF eklenen grupta istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında uzun kemiklerin geniş diyafiz defektlerinin cerrahi tedavisinde kullanılan Masquelet tekniğe CGF eklemesinin oluşan membrana histokimyasal ve immunohistokimyasal olumlu katkısından dolayı önerilebileceği görüşündeyiz.



SUMMARY

Masquelet technique is a method used in the surgical treatment of large bone defects. Concentrated Growth Factor (CGF), which has been described in recent years, is commonly used in medical practice. In the literature, we did not find any study that examine the quality of the membrane by adding CGF to the Masquelet technique.

In this experimental study, we aimed to compare the membrane produced by foreign body reaction on bone cement histopathologically thickness of the membrane, ratio of elastic fibers and immunohistochemically membrane vascularization (CD31), inflammation (MAC387), proliferation (Ki67), and presence of stem cell (STRO-1) at 3 and 6 weeks.

A total of 24 rabbit animals randomized and divided into 4 groups of 6 rabbits per group. Group I and Group III, only treated with Masquelet technique control groups, to be sacrificed at 3 and 6 weeks respectively, Group II and Group IV, treated with Masquelet technique + CGF prepared from the rabbit's blood groups, to be sacrificed at 3 and 6 weeks respectively. In all groups, the membrane formed on the cement was excised without any damage. This membrane was examined histopathologically and immunohistochemically with CD31, MAC387, Ki67 and STRO-1 staining. The obtained results are compared statistically.

When the *thickness of the membrane* was compared, Group 4 membrane was thicker than Group 3, and this difference was statistically significant ($p = 0.004$). There was a statistically significant increase in the *elastic fiber ratio in the membrane* in Group 2 compared to Group 1 ($p = 0.037$). There was a statistically significant increase in *vascularization of the membrane* compared to Group 3 in Group 4 ($p = 0.04$). The *inflammation of the membrane* was statistically significantly higher in Group 2 compared to Group 1 ($p = 0.04$). *Proliferation in the membrane* was statistically significantly higher in Group 2 compared to Group 1 ($p = 0.05$). Likewise, the proliferation index of Group 4 was statistically significantly higher than Group 3 ($p = 0.06$). *Presence of stem cell in the membrane*, although the stem cell was rarely seen, the number of stem cells was statistically significantly higher in

Group 2 compared to Group 1 ($p=0,036$). No stem cells were found in both groups at week 6.

As a result; The addition of CGF to the Masquelet technique demonstrated that the inflammation, proliferation, stem cell and ratio of elastic fibers at 3 weeks was significantly higher than treated with only Masquelet technique and, inflammation, vascularization, proliferation, and membrane thickness were found to be statistically significant in the CGF added group compared to the only Masquelet technique group at 6 weeks. These results suggest that adding CGF may be recommended because of the histochemical and immunohistochemical positive contribution of the membrane to the Masquelet technique used in the surgical treatment of large diaphyseal defects in the long bones.

1. GİRİŞ

Kemik defektleri travma, osteomyelit, konjenital hastalıklar, malign tümörlerin geniş eksizyonu sonrasında meydana gelebilir. Özellikle geniş kemik defektlerinin cerrahi tedavisinde sıklıkla güçlüklerle karşılaşmaktadır. Küçük defektler nonvaskülerize kansellöz kemik greftiyle tedavi edilirken, büyük defeklere başka tedavi protokolleri ilave etmek gerekebilir. Büyük defektlerde sık kullanılan tedaviler vaskülerize fibula grefti ve ilizarov distraksiyon osteogenezi tekniğidir [1, 2]. Otolog kemik greftlenmesi 5 cm den büyük defektlerde greftin rezorbsiyon riskinden dolayı tek başına tavsiye edilmemektedir [3]. Masquelet [4, 5], büyük kemik defektlerin cerrahi tedavisi için bir teknik tanımlamıştır. İki aşamalı olan bu tekniğin ilk aşamasında, kemik defekti polimetilmetakrilat(PMMA) kemik çimentosu ile doldurulur. Kemik çimentosu yabancı cisim reaksiyonu ile çimentonun üzerinde bir membran oluşturur. İkinci aşamada, 6-8 hafta sonra yeni bir cerrahi ile membrana zarar vermeden çimento çıkarılır ve defekt kansellöz kemik grefti ile doldurulur. Oluşan membran grefti rezorbsiyondan koruyarak kaynama sağlar.

Doku iyileşmesi intraselüler ve ekstraselüler birçok mediatör tarafından kontrol edilmektedir. Trombositler doku iyileşmesini stimüle eden PDGF, TGF- β 1, TGF- β 2, VEGF, IGF gibi mediatörleri yüksek miktarda ihtiva eder [6]. Trombosit, büyüme faktörleri, lökositler ve fibrin matriks içeren birçok konsantre trombosit tekniği geliştirilmiştir. PRP ilk jenerasyon konsantre trombosit elde etme yöntemidir. PRP doku iyileşmesini hızlandırmak için uzun zamandır kullanılmaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda PRP nin hücre proliferasyon ve diferansiyasyonuna olan etkileri çelişkili olarak bulunmuştur [7]. Bundan dolayı Choukroun ve arkadaşları trombositten zengin fibrin (PRF) olarak adlandırılan ikinci kuşak konsantre trombosit yöntemini ortaya koymuşlardır [8]. Bu yöntemde hastadan alınan venöz kan PRP nin aksine içinde antikoagülan bulunmayan bir tüpe alınır. Santrifüjün ardından tüpte en altta kırmızı kan hücreleri en üstte aselüler plazma ve bu iki katmanın arasında PRF pıhtısı olmak üzere 3 katman oluşur. PRP nin aksine PRF katı fibrin pıhtıdır ve yüksek miktarda trombosit, lökosit, büyüme faktörleri içeren matriks içerir. *Konsantre Growth Faktör (CGF)* 2006 yılında Sacco tarafından

tanımlanan konsantre trombosit yöntemidir. Oluşturulma mantığı PRF ile aynıdır. PRF den farkı, farklı hız ve dakikalarda santrifüj yapılmasıdır. PRF de kan 10 dk 3000 rpm de santrifüje edilirken, CGF de ise 30 saniye hızlanma, 2700 rpm(600g) de 2 dakika, 2400 rpm(400g) de 4 dakika, 2700 rpm (600g) 4 dakika, 3000 rpm(800g) de 3 dakika ve en sonunda 36 saniye yavaşlama ile santrifüje edilir. Farklı hız ve dakikada santrifüj daha yoğun ve daha büyük ve daha fazla büyüme faktörü içeren fibrin matriks elde edilmesini sağlar [9].

Güncel literatür araştırmamızda Masquelet tekniğe CGF ekleyerek oluşan membranın kalitesini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Biz bu çalışmamızda 3. ve 6. haftada kemik çimentosunun yabancı cisim reaksiyonu ile üzerinde oluşan membranın histopatolojik olarak kalınlığının , elastik fiber oranının ve immünohistokimyasal olarak oluşan membranın vaskülarizasyon (CD31), inflamasyon (MAC387), proliferasyon (Kİ67) ve oluşan kök hücre (STRO-1) sayısının karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

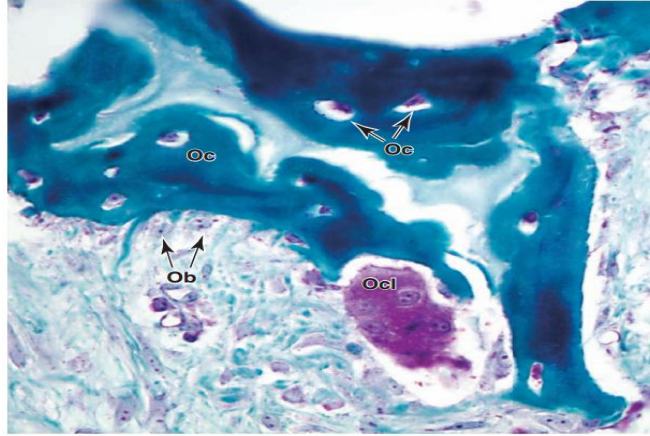
2.1 Kemik Doku

Yetişkin iskeletin ana yapısını oluşturan kemik dokusu yumuşak yapıları destekler, hayati önem taşıyan organları korur ve kan hücrelerini yapan kemik iliğini barındırır.

Kemik; hücreler arası kalsifiye olan kemik matriksi ve 3 tür hücreden oluşur. (Resim-1)

- **osteositler** matriks içinde laküna denen boşluklarda bulunur
- **osteoblastlar** matriksin organik kısmının sentezini yapar
- **osteoklastlar** kemik dokunun rezorpsiyonu ve remodelingden sorumludur.

Bütün kemiklerin iç ve dış yüzeyleri osteojenik hücreleri içeren iç yüzeyde endosteum, dış yüzeyde periosteum adını alan doku tabakaları ile örtülüdür.



Resim 1. Osteoblastlar (Ob) endosteum ve periosteum içindeki osteoprogenitör hücrelerden diferansiye olur, ardından tip 1 kollajen, proteoglikan gibi matriksin organik kısmını üretir. Matriks kalsifiye olduktan sonra inorganik matriksteki lakünalara sıkışan osteoblast, osteosite(Oc) diferansiye olur. Osteoklastlar (Ocl) ise remodeling esnasında kemiğin rezorpsiyonundan sorumludur.

2.1.1 Kemik Hücreleri

2.1.1.1 Osteoblastlar

Osteoblastlar kemik matriksin organik kısmının (Tip 1 kollajen, glikopeptidler, proteoglikanlar) üretiminden sorumludur. Kemik inorganik matriksin oluşabilmesi için osteoblast aktivitesi gereklidir.

Bazı osteoblastlar zamanla ürettikleri organik matriks ile kuşatılarak osteosit haline gelir. Bu işlem sırasında laküna denen boşluklar oluşur. Lakünaların içinde osteosit ve uzantıları ve az miktarda da nonkalsifiye matriks bulunur.

2.1.1.2 Osteositler

Osteoblastlardan türeyen osteositler kalsifiye matriks içinde laküna denen boşluklarda bulunur. Her laküna içinde 1 adet osteosit mevcuttur.

2.1.1.3 Osteoklastlar

Osteoklastlar büyük, hareketli, çok çekirdekli hücrelerdir. Kemik büyümesi ve remodeling esnasında gerekli kemik rezorpsiyonunda önemli role sahiptir. Osteoklast farklılaşması osteoblast tarafından üretilen iki polipeptid tarafından düzenlenmektedir. Bunlar makrofaj -koloni- stimulating faktör(M-CSF) ve RANKL dır. Osteoklastlar kemikte Howship lakünası adı verilen rezorpsiyon kavitelerinde yerleşirler.

Osteoklast aktivitesi lokal sitokinler ve hormonlar tarafından düzenlenir. Osteoklastların kalsitonin hormonu için reseptörleri vardır fakat parathormon(PTH) için reseptörleri mevcut değildir. Osteoblastlar PTH hormonu ile aktive olur ve M-CSF, RANKL ve diğer sitokinleri salgılayarak osteoklastları aktive ederler.

2.1.2 Kemik Matriks

İnorganik madde kemik matriksin kuru ağırlığının % 50 sini oluşturur. Kalsiyum hidroksiapatit en çok bulunan madde olmasına rağmen bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum iyonlarıda bulunur [10].

Matriksin organik kısmını Tip 1 kollajen, proteoglikan ve glikopeptidler oluşturur. Osteoblastların veziküllerinden salgılanan osteokalsin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin matriksin kasifikasyonunu düzenlediği düşünülmektedir [11].

2.1.3 Periost ve Endosteum

Kemiğin iç ve dış yüzeyleri periost ve endosteum diye adlandırılan, tabakalar halinde, kemik yapan hücreler ve bağ dokusuyla örtülüdür [10].

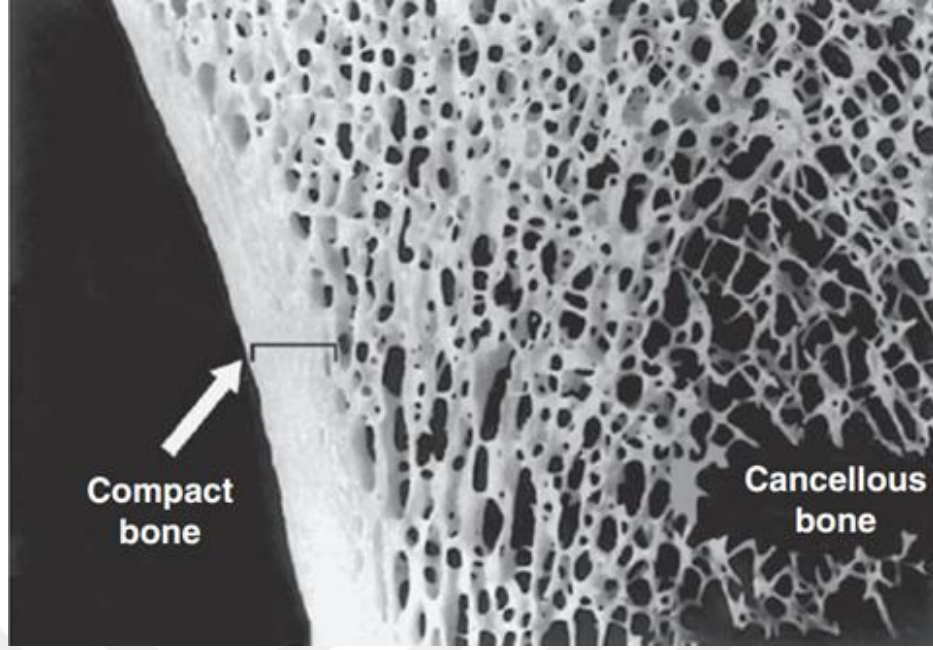
Periost kolajen lif ve fibroblastlardan oluşan dış tabakaya sahiptir. Periostun içteki, hücreden daha zengin tabakası, fibroblastlara benzeyen, bölünüp farklılaşarak osteoblastları meydana getirme potansiyeline sahip, osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır [10].

Endosteum kemik içindeki bütün boşlukları astarlar ve osteoprogenitör hücreler ve az miktardaki bağ dokusundan oluşur.

Periostun ve endosteumun, kemik dokunun beslenmesi, devamlı olarak yeni osteoblast sağlaması, kemik büyüme ve onarımı için önlem alması ana işlevleridir.

2.2 Kemik Türleri

Çıplak gözle kemik kesitlerine bakıldığında, boşluk içermeyen yoğun alanlar (kortikal kemik) ve çok sayıda birbirine açılan boşluklar (spongiöz kemik) olarak görülür (Resim 2). Ancak mikroskop altında, gerek kompakt kemik gerekse spongiöz kemiğin histolojik yapısı temelde aynıdır.



Resim 2. Kemiğin yapısı

Uzun kemiklerde, epifiz olarak adlandırılan küremsi uç kısımlar, ince bir tabaka kortikal kemik ile örtülü spongiöz kemikten oluşur. Diyafiz silindirik kısımdır, kemik iliği boşluğuna bakan iç yüzeylerince az miktarda süngerimsi kemik içeren, kortikal kemikten oluşur.

Mikroskopik olarak 2 tür kemik vardır: lamellar kemik ve lamellar kemikten daha immatür olan woven kemik.

2.2.1 Lamellar Kemik

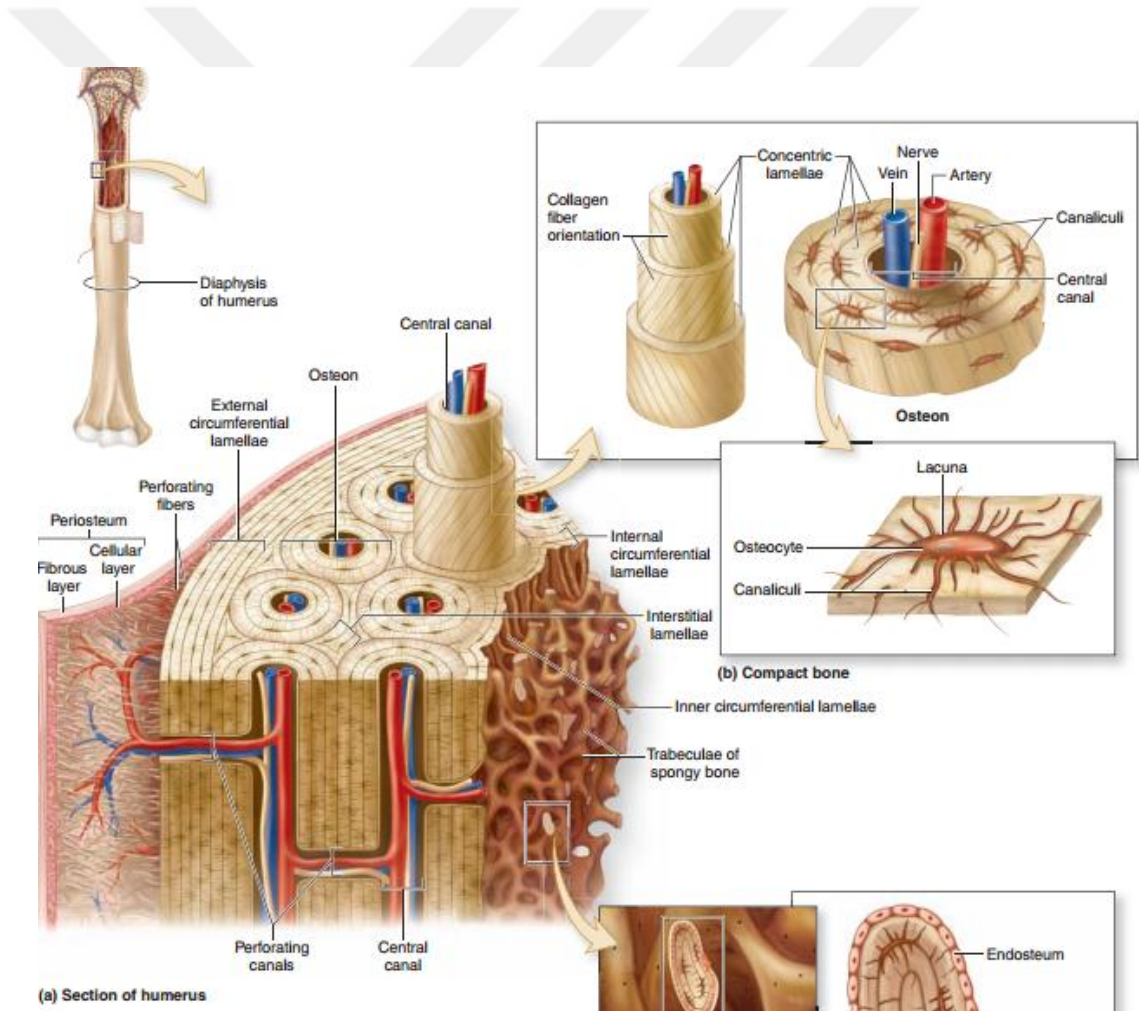
Çoğu erişkindeki kompakt (kortikal) kemik lamellar kemik olarak organize olmuştur. Lamellar kemik 3-7 μm kalınlıktaki kalsifiye olan lamella katmanlarından oluşmuştur. Tipik olarak lamellalar, santral kanal etrafında birbirlerine paralel olarak dizilirler.

Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanalın etrafını saran dairesel kemik kanalcıklarından oluşan tüm komplekse (karmaşık sisteme) Havers sistemi veya osteon adı verilir (Şekil 1).

Her Osteon uzun, bazen dallanan, diyafizin uzun eksenine paralel bir silindirdir. Etrafı 4-20 dairesel lamella ile sarılı merkezi kanaldan meydana gelir

(Şekil 1). Osteonlar birbirleriyle, periostla, kemik iliği kavitesiyle delici kanallar (Wolkman kanalları) yardımıyla bağlanır. Wolkman kanalları dairesel lameller içermez bunun yerine lamelleri deler. Kemik dokusu içinde bulunan tüm damar kanalları, önceden var olan kan damarlarının etrafında matriks oluşumu ile ortaya çıkarlar.

Kemik remodelingi bütün hayat boyunca devam eder ve kemik rezorpsiyon ve formasyonunu içeren bir süreçtir. Rezorpsiyon ve formasyon osteoklastlar ve osteoblastlar tarafından düzenlenir. Sağlıklı erişkinlerde yıllık kemik rezervinin % 5-10 unun bu şekilde döngüye girdiği düşünülmektedir.



Şekil 1. Uzun kemiklerin şematik yapısı.

2.2.2 Woven (İmmatur) Kemik

İmmatur kemik lamellar olmayan, tip 1 kollajen fiberlerinin karışık olarak dizildiği, embriyonik süreçte ve kemik iyileşmesi sürecinde ilk ortaya çıkan kemiktir. İmmatur kemik dokusu genelde geçicidir, yerini erişkinde lamaller kemiğe bırakır.

2.3 Kemik Gelişimi (Osteogenezis)

Kemik gelişimi ya da osteogenezis iki sürecin biri tarafından meydana gelir.

2.3.1 İntramembranöz Kemikleşme

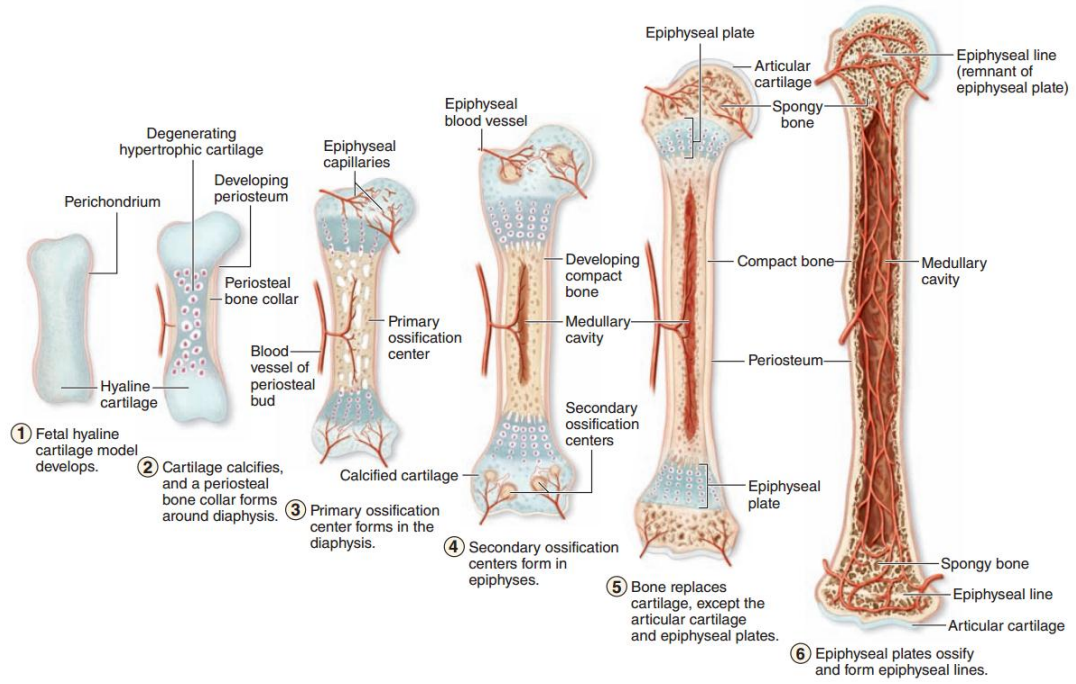
Osteoblastlar direkt olarak mezenkimden farklılaşır ve osteoid sentezine başlar. Daha çok yassı kemiklerde görülür [10].

Mezenkimal doku yoğunlaşması tabakasında kemik formasyonunun başladığı noktaya ossifikasyon merkezi adı verilir. Bu alanda mezenkimal hücreler osteoprogenitör hücrelere diferansiye olur. Bu progenitör hücreler proliferasyon olarak gelişmekte olan kapiller ağın etrafında osteoblastları oluşturur. Bu osteoblastlar daha önce tarif edildiği gibi kalsifiye olacak osteoid bileşenlerini salgılar ve bunu kalsifikasyon takip eder. Sonuçta bazı osteoblastlar kalsifiye matriks ile kuşatılarak osteosite farklılaşırlar. Gelişen bu kemik adacıkları kılcal kan damarları, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreleri içeren uzanan boşlukların duvarlarını oluşturur. Böyle birkaç grup kemikleşme merkezi hemen hemen aynı zamanda ortaya çıkar ve bunların duvarları kaynaştığında kemik süngerimsi yapısına kavuşur. Büyüyen kan damarları ve ek farklılaşmamış mezenkim hücreleri, kemik duvarları arasında kalan bağ dokusu içine girerek kemik iliği hücrelerini ortaya çıkarır [10].

2.3.2 Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşme meydana getirilecek kemiğin şeklini andıran küçük bir hiyalin kıkırdak model içinde meydana gelir (Şekil 2). Bu tür kemikleşme daha çok kısa ve uzun kemiklerin meydana getirilmelerinden sorumludur. Bir uzun kemiğin endokondral kemikleşme ile meydana gelişinde şu olaylar birbirini izler. Başlangıçta ilk kemik dokusu, kıkırdak modelinin diyafizini çevreleyen bir yaka olarak görülür. Bu kemik yaka, perikondriumda oluşan osteoblastların aktivitesi ile üretilir. Bu yaka altındaki kıkırdağa oksijen ve gerekli besinlerin geçmesini engelleyerek kıkırdakta dejeneratif değişikliklere yol açar. Böylece kondrositler alkalen fosfataz üretir. Kondrositlerin sitoplazmaları şişer ve kondrositler lakünalarını genişletmeye başlar. Bu değişiklikler matriksi dar trabeküller halinde sıkıştırır ve bu yapılarda kalsifikasyona neden olur. Kondrositlerin ölümü, kalsifiye edilmiş kıkırdak kalıntılarından oluşan gözenekli bir yapı oluşturur. Perikondriumdaki kan damarları bu kemik yakayı delerek bu bölgeye osteoprogenitör hücreleri taşır. Daha sonra osteoblastlar kalsifiye kıkırdak matrikin kalıntılarına yapışır ve immatur kemiği üretir [12].

İlk trimesterin erken zamanlarında kemiklerin diyafizindeki bu süreç, birçok kemikten başlayarak birincil ossifikasyon merkezini oluşturur. Sekonder ossifikasyon merkezleri daha sonra kıkırdak modelin epifizlerinde görülür ve aynen yukarıda anlatılan şekilde meydana gelir [12].



Şekil 2. Endrokondral kemikleşme

2.4 Kırık İyileşmesi

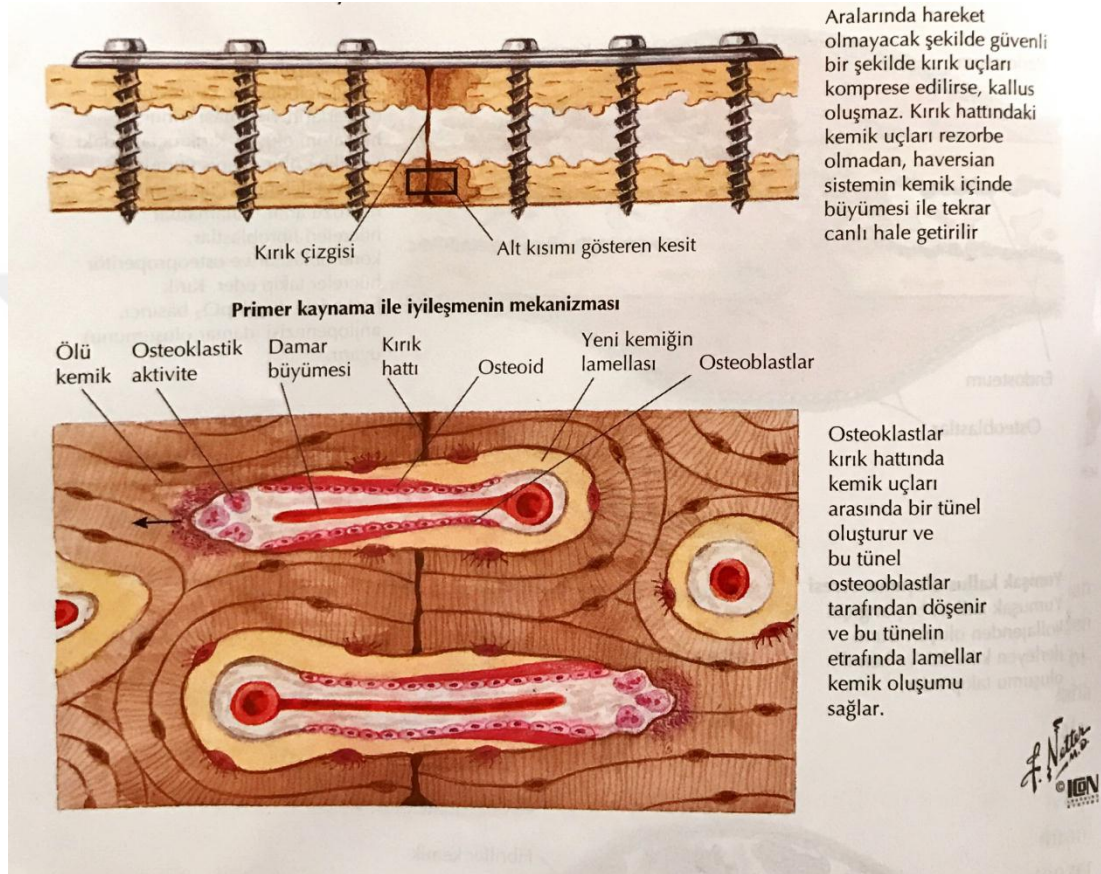
Kemikğin yapısal bütünlüğünün bozulmasına kırık denir. Akut kemik yaralanmaları, dokuların kuvvetini aşan kuvvetlerin iskelete uygulanmasından kaynaklanır. Kırık oluşumu, kemik ve çevresindeki kas, tendon, ligament, damar, sinir gibi yumuşak dokuları içeren kompleks bir doku zedelenmesine neden olur. Bir kırığın iyileşmesi vücudun tüm onarım süreçlerinin en dikkat çeken özelliklerinden biridir, çünkü kırılan kemik vücuttaki diğer dokular gibi skarla değil kemikğin kırılmadan önceki dokusuna benzer şekilde iyileşir [13].

Primer kırık iyileşmesi ve sekonder kırık iyileşmesi olmak üzere iki tip kırık iyileşmesi mevcuttur.

2.4.1 Primer Kırık İyileşmesi

Genellikle ayrılmamış veya rijit osteosentez uygulanan kırıklarda görülür [13]. Kemik uçları arasında temas olduğunda osteonların genişlemesiye direkt olarak

kırık hattında lamellar kemik oluşumu gözlenir. Osteoklastlar kırık hattını geçerek kırık hattını rezorbe eder osteoblastlar osteoklastları takip ederek yeni kemik oluşumunu başlatır. Yeni kemik matriksi sentezlenir. Matriks ile çevrilmiş osteositler ve yeni kan damarları oluşur. Böylelikle yeni haversiyan sistemi oluşturulur. Kallus oluşumu izlenmez (Şekil 3).



Şekil 3. Primer kırık iyileşmesi

2.4.2 Sekonder Kırık İyileşmesi

Sekonder kırık iyileşmesi, kırık iyileşmesinin en yaygın şeklidir ve hem endokondral hem de intramembranöz kemikleşme ile oluşur [14]. Anatomik redüksiyon ve rijit fiksasyon gerektirmez. Aksine mikro hareket ve yük verme ile arttırılır. Fakat fazla hareket ve fazla yük verme kaynamanın gecikmesi hatta kaynamama ile sonuçlanabilir [15]. Sekonder kırık iyileşmesi tipik olarak konservatif tedavi edilen kırıklarda, ya da cerrahi sonrası mikrohareketin olduğu intramedüller

çivileme, eksternal fiksator uygulanması yada köprü plaklama yapılan kırıklarda görülür [16, 17]. Kallus dokusu ile iyileşir. Kırık iyileşme aşamaları ile devam eder.

Kırık iyileşmesi birbiri içine girmiş 3 fazdan oluşur. Kırık iyileşmesi inflamasyon ile başlayıp tamir ve remodelizasyon ile devam eden bir süreçtir.

2.4.2.1 İnflamasyon Fazı

Kırık yaratan travma sadece kemik hücrelerine, kan damarlarına ve kemik matrisine zarar vermekle kalmaz aynı zamanda çevresel yumuşak dokuları da (periost ve kas dahil) zedelemektedir. Bir hematoma, medüller kanal içerisinde, kırık uçları arasında ve yükselen periostun altında birikir. Kan damarlarında meydana gelen hasar kollateral vasküler yapılar oluşana kadar kırık bölgesindeki osteositlerin beslenmesini bozar. Kemik iliği ve periost gibi etraf çevre dokuların ciddi zedelenmesi sonucu ortaya çıkan nekrotik dokular da bu sürece katkıda bulunur. Kırık hematoma kan kaynaklı inflamatuvar hücrelere, antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlere ev sahipliği yapar [18]. Trombositlerden ve ölü hücrelerden salınan inflamatuvar mediatörler kan damarlarını genişletip plazmayı ekstraselüler alana sızdırır ve taze bir kırık bölgesinde görülen akut ödeme sonuçlanır. İnflamatuvar hücreler bu bölgeye göç eder. PML hücreler ilk göç eden hücrelerdir. Bu hücreleri makrofajlar ve lenfositler takip eder. Bu hücreler ayrıca anjiyogenezi stimüle eden sitokinleri salgılar [19]. Başlangıçtaki proinflamatuvar yanıtı TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11, IL-18 in salgılanması başlatır [20]. TNF- α konsantrasyonunun 24 saatte tepe noktasına ulaştığı travmadan 72 saat sonra travma öncesi değerlerine döndüğü gösterilmiştir [20]. Bu zaman zarfında TNF- α makrofaj ve diğer inflamatuvar hücrelerden salgılanır, sekonder inflamatuvar sinyalleri düzenlenlemede rolü olduğu ve kırık kaynaması için gerekli hücrelere kemotaktik ajan gibi davrandığı düşünülmektedir [21]. TNF- α nın ayrıca in vitro olarak mezenkimal stem cell (MSC)lerin osteojenik farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir [22]. Bu etkilere, hem osteoblastlar hem de osteoklastlar üzerinde eksprese edilen iki reseptör TNFR1 ve TNFR2'nin aktivasyonu aracılık etmektedir. Ayrıca TNFR1 her zaman kemikte eksprese edilirken, TNFR2 sadece yaralanmadan sonra eksprese edilir. Bundan dolayı TNFR2 nin kemik rejenerasyonunda daha

spesifik bir role sahip olduğu düşünülmektedir [21, 23]. IL-1 ve IL-6 kırık iyileşmesi için en önemli sitokinlerdir. IL-1 ekspresyonu TNF- α ya benzer. İnflamasyonun akut evresinde makrofajlar tarafından üretilir ve osteoblastlarda IL-6 üretilmesini indükler, primer kırıkta kalus üretimini teşvik eder ve ayrıca IL-1RI ve IL-1RII reseptörleri aracılığıyla yaralı bölgede anjiyogenezi teşvik eder [21, 24, 25]. IL-6 ise sadece akut fazda üretilir. VEGF üretimini sağlayarak anjiyogenezi stimüle eder ve ayrıca osteoblast ve osteoklastların farklılaşmasına yardımcı olur [26].

Kırık iyileşmesi için mezenkimal kök hücrelerin (MSC) proliferasyonuna ve osteojenik hücrelere diferansiasyona olması gerekir. MSC lerin nereden geldiği tam olarak anlaşılamamıştır. Şu anki çoğu çalışmaya göre bu MSC lerin etraftaki yumuşak doku ve kemik iliğinden geldiği yönündedir fakat yapılan bazı çalışmalara göre kan dolaşımındaki MSC lerin hasarlı bölgeye gelmesinin kırık iyileşmesi için çok önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir [27, 28]. MSC lerin kırık bölgeye göçünü düzenleyen moleküllerin ise BMP 2 ve BMP 7 olduğu düşünülmektedir [29].

2.4.2.2 Onarım (Yumuşak ve Sert Kallus) Fazı

Sekonder kırık iyileşmesi hem intramembranöz hemde endokondral kemikleşmeyi içermesine rağmen sonradan mineralize olup rezorpsiyona uğrayacak ve yeni kemik oluşturacak yumuşak kallus formasyonu bu süreçte anahtar rol oynar. Primer hematoma oluşuktan sonra, fibrin bakımından zengin bir granülasyon dokusu oluşur [30]. Bu dokuda, kırık uçları arasında ve periost alanlarının dışında endokondral kemikleşme meydana gelir. Bu bölgeler aynı zamanda mekanik olarak daha az stabildir ve kırıkta dokusu yumuşak kallus oluşturarak kırığa istikrarlı bir yapı kazandırır [31]. Hayvan modellerinde (sıçan, tavşan, fare) yumuşak kallus oluşumunun travma sonrası 7-9 günde pik yaptığı gösterilmiştir [32]. Aynı anda subperiostal olarak kırığın distal ve proksimal sonlanma noktalarında sonradan sert kallusa dönüşecek olan intramembranöz kemikleşme başlar. En sonunda bu sert kallusun nihai olarak köprülenmesi sonucunda kırıkta yük taşınmasını sağlayan yarı katı yapı oluşur[14].

Bu kallus dokularının oluşumu, çevresel yumuşak dokulardan, korteks, periost ve kemik iliği çevresindeki MSC'lerin alınması ve uzak hematopoetik alanlardan kök hücrelerin sistemik dolaşım ile kırık bölgesine gelmesine bağlıdır. Kırık bölgesine gelen MSC ler kondrosit ve osteoblastlara farklılaşırlar. Bu süreçte transforming growth factor-beta (TGF- β) ailesi önemli role sahiptir. TGF- β 2 ve - β 3 ün kondrogenesis ve endokondral kemikleşme için ayrıca BMP-5 ve 6 nında intramembranöz kemikleşme için MSC leri uyardığı düşünülmektedir [33, 34]. Bu iyileşme sürecinde BMP 2 ninde kritik role sahip olduğu düşünülmektedir. BMP 2 nin inaktive edildiği farelerde kırık kaynaması için gerekli kallusunun oluşmadığı gösterilmiştir [35].

Kırıkların iyileşmesi için bir kan temini gerekir ve başarılı kemik onarımı için revaskülarizasyon şarttır [36]. Endokondral kırık iyileşmesinde kondrositlerin apoptozu ve kırıkta degradasyonu için kırık bölgesinde yeni kan damarlarının oluşması şarttır [37]. Vaskülarizasyon süreci vasküler endotelial growth faktör(VEGF) bağımlı yol ve anjiopoetin bağımlı yol olmak üzere iki moleküler yol ile düzenlenir. Anjiopoetin bağımlı yol iyileşmenin erken evresinde etkilidir. Periosttaki mevcut damarlardan kırık içine damarlanmayı başlattığı düşünülmektedir. VEGF yolunun vasküler rejenerasyonun ana düzenleyicisi olarak düşünülmektedir [36]. Osteoblastlarda ve hipertrofik kondrositlerde yüksek düzeyde VEGF salınımı olduğu bundan dolayı vaskülerize kemik dokuda kan damarlarının invazyonunun, avasküler kırıkta matriksin dönüşümünün arttığı gösterilmiştir [36]. VEGF hem vaskülogenezi (endotelial mezenkimal hücrelerin vasküler pleksus içine agregasyonu ve proliferasyonu) hem de anjiyogenezi (önceden oluşan damarların genişletilmesi) destekler [38]. Bundan dolayı VEGF kırık hattında hem neoanjiyogenezi hem de revaskülarizasyon için hayati rol oynamaktadır

Kemik iyileşme sürecinde primer yumuşak kartilaginöz kallusun rezorbe edilip yerini sert kemik kallusa bırakması gerekir. Kırık iyileşmesinin bu aşamasında embriyolojik kemik gelişimi ile hücresel proliferasyon ve diferansiyasyonun (hücresel hacim ve matriks birikiminin artışı) kombinasyonu görülür [39].

Kırık kallusunda kondrositler proliferatör olup hipertrofik hale gelirler ve ekstraselüler matriks kalsifiye olur. Esas olarak makrofaj koloni stimüle edici faktör(M-CSF), receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL),osteoprotegerin

(OPG) ve TNF- α tarafından yönetilen kaskat bu mineralize kırıkdağın rezorpsiyonunu başlatır [20, 40]. Bu süreçte M-CSF, RANKL, OPG nin woven(immatür) kemik oluşumu için kemik hücrelerinin birikimi ve osteoklast aktivasyonunu düzenlediği düşünülmektedir. TNF- α nin ise osteojenik MSC lerin birikimini sağladığı ama daha önemlisi kondrosit apoptozisini başlattığı düşünülmektedir [20]. Kalsifikasyon mekanizması hipoksik kırık alanında mitokondriler tarafından üretilen kalsiyum içeren granüller tarafından sağlanır. Kırık kallusundaki kondrositlerin sitoplazmalarında biriken kalsiyum granülleri ekstraselüler matrikse taşınır. Burda fosfat ile birleşen kalsiyum başlangıç mineral deposunu oluşturur. Bu kalsiyum ve fosfat deposu apetit kristalleri için bir nidus görevi görür [41]. Sert kallus formasyonunun pikine, hayvan modellerinde 14. günde ulaşıldığı bildirilmiştir [32]. Sert kallus dokusu oluşumu ilerledikçe ve kalsifiye kırıkdağ yerini immatür(woven) kemiğe bıraktıkça kallus daha katı ve mekanik olarak da daha sert hale gelir [14].

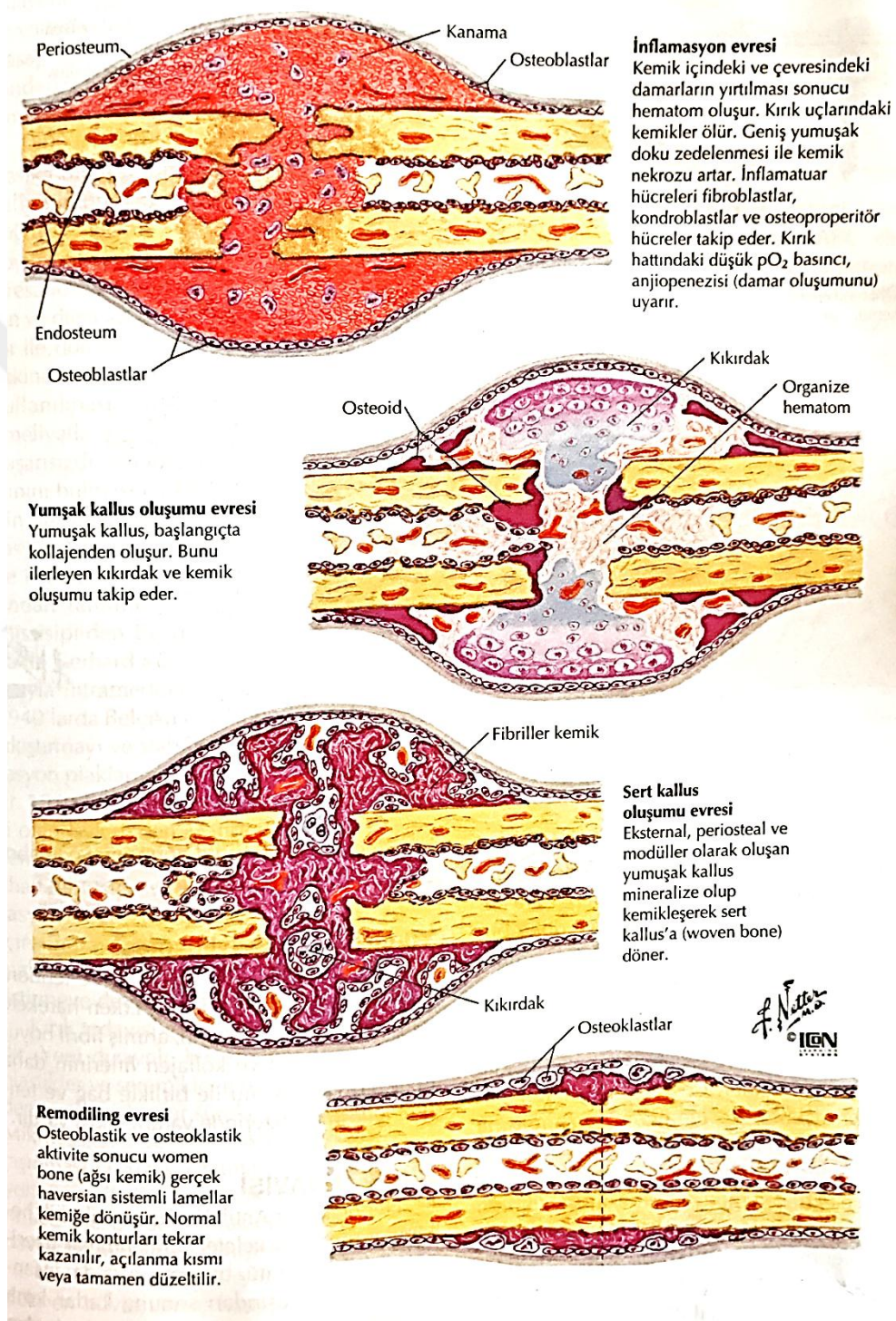
2.4.2.3 Remodelling Fazı

Sert kallus, biyomekanik stabilite sağlayan sağlam bir yapıya sahip olmasına rağmen, normal kemiğin biyomekanik özelliklerini tam olarak sağlayamamaktadır. Bunu başarmak için kırık iyileşme kaskadı ikinci rezorptif fazı başlatır. Bu süreçte sert kallus, santral medüller kanallı lamellar kemiğe dönüşür [20]. IL-1 ve TNF- α bu süreci düzenleyen sitokinlerdir [37].

Yeniden şekillendirme işlemi, osteoklastlar tarafından sert kallus resorpsiyonu ve osteoblastlar tarafından lamellar kemik yapımı ile gerçekleştirilir. Bu süreçte dış kallus lamellar kemik yapısına dönüşürken iç kallus kemiklerin diyafizinin karakteristik medüller kavitesini oluşturur. Remodelling fazı, hayvan ve insan modellerinde 3-4 hafta gibi erken bir tarihte başlasada, yeniden şekillenmenin tam olarak rejenere edilmiş bir kemik yapısı elde etmek için tamamlanması yıllar alabilir [42].

Kemik remodelizasyonunun başarılı olabilmesi için yeterli kan temini ve mekanik stabilite çok önemlidir. Her iki durumun sağlanamadığı durumlarda bu

süreç atrofik (fibroz) nonunion ile sonuçlanır. Yeterli vasküleritenin sağlanıp unstabil fiksasyonun yapıldığı durumlarda iyileşme süreci bir kartilaginöz kallus oluşturacak şekilde ilerler fakat sonuçta hipertrofik nonunion veya psödoartroz ile sonuçlanır [15].



Şekil 4. Sekonder kırık iyileşmesi

2.5 Nonunion (Psödoartroz)

Nonunion kırıklar travma vakalarının küçük bir yüzdesini oluştursa da ortopedik cerrahlar için tedavisi ciddi bir sorun yaratmaktadır. Kırıklarda nonunion segmenter kemik kaybıyla gelen açık kırıklarda görüleceği gibi düşük enerjili bir kırığı takiben kırık kaynaması evrelerindeki bir problemde de kaynaklanabilir. Bütün kırıkların % 90-95 i sorunsuz iyileşir [43]. Nonunionlar, biyolojik kırık onarımının yerel biyolojiyi ve kemik hasarının mekaniğini aşmadığı vakaların küçük bir yüzdesidir.

Kırık iyileşmesi basit ama kompleks bir biyolojik süreçtir. Vücuttaki çoğu doku skar ile iyileşirken kemik kendisine benzer bir dokuyla iyileşir. Basitçe nonunion kırığın beklenen sürede kaynamamasıdır. Daha genel anlamda nonunion müdahale olmadan kırık iyileşmesinin devam etmeyeceği durumdur [44, 45]. Bu tanım göreceli olup ortopedistler arası değişkenlikle sonuçlanır.

Litaratürde nonunion için çok fazla tanım mevcuttur. Bundan dolayı FDA nonunionu kırığın en az 9 aylık olup 3 aydır kırık iyileşmesinde bir ilerleme olmaması durumu olarak tarif eder [46].

2.5.1 Nonunion Etyolojisi

İyi bir kemik iyileşmesi için mekanik stabilite, yeterli kan akımı, kırık uçları arasında temas gereklidir. Bunlardan birinin veya birkaçının sağlanamaması nonunion ile sonuçlanır. Yaralanmanın ciddiyeti ve fiksasyonun yeterli sağlanamaması da bu gereklilikleri negatif etkiler.

2.5.1.1 İnstabilite

Mekanik instabilite kırık bölgesindeki aşırı hareket olarak tanımlanabilir. Mekanik instabilite yaratacak durumlar yetersiz fiksasyon, kırık bölgesinde distraksiyon, kırıkta defekt olması, yetersiz kemik kalitesini içermektedir. Yeterli bir

kan kaynağı varsa, kırık alanındaki aşırı hareket, bol miktarda kallus oluşumu, kırık hattının genişlemesi, fibrokartilajın mineralize edilememesi ve nihai olarak kaynamada başarısız olmaya neden olur.

2.5.1.2 Yetersiz Vaskülerite

Ciddi yaralanma veya cerrahi diseksiyon nedeniyle kırık yüzeyindeki kan akımı bozulabilir. Geniş yumuşak doku yaralanmasının nonunion riskini arttırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur [47-49]. Açık kırıklar ve yüksek enerjili kapalı kırıklar yumuşak dokuda sıyrılmaya, periosteal ve endosteal dolaşımın zedelenmesine sebep olur.

Vaskülerite cerrahi işlem sırasında çok fazla yumuşak doku ve periost sıyırılması sonucunda da bozulabilir. Sebep ne olursa olsun yetersiz vaskülerite kırık uçlarında nekroza sebep olur. Bu nekrotik yüzeyler kırık kaynamasını inhibe edip nonuniona yol açar.

2.5.1.3 Zayıf Kemik Teması

Kırık uçlarının temasının az olması, yumuşak doku interpozisyonu, kırık fragmanların malpozisyonu veya malaligmanı, kemik kaybı ya da kemik uçları arasındaki distraksiyona bağlı olabilir. Sebebi ne olursa olsun zayıf kemik teması stabiliteyi zayıflatarak kırık alanında defekte neden olur. Kırıkta nonunion gelişme riski kırıktaki defekt miktarı arttıkça yükselir. Osteoblastik atlama mesafesi olarak adlandırılan doğrudan osteonal iyileşme yoluyla kortikal defektlerin köprülenmesi için eşik değeri tavşanlarda yaklaşık 1 mm'dir [50]. Daha büyük kortikal defektlerde iyileşebilir fakat bu durumda süreç daha yavaş ve immatür(woven) kemik oluşumu ile olur. Kritik defekt kırık uçları arasındaki köprüleşmenin müdahalesiz gerçekleşemeyeceği mesafeyi temsil eder. Bu tavşanlarda 15 mm dir.

2.5.1.4 Enfeksiyon

Kırık bölgesinde enfeksiyon nonunion riskini arttırır [49]. Kemik veya çevresindeki yumuşak dokuların enfeksiyonu, enfekte olmayan kırıkların kaynamasında başarısızlığa neden olan aynı lokal çevreyi oluşturabilir. Ayrıca enfekte kemikteki implantların kaybı kırık bölgesinde mekanik instabilitenin azalmasına sebep olur.

2.5.1.5 Sigara İçimi

Sigara içimi, kırık iyileşmesini olumsuz şekilde etkiler. Nikotin kemikte vasküler büyümeyi ve revaskülerizasyonu engeller [51, 52]. Ayrıca osteoblast fonksiyonunu bozar [53, 54]. Schmitz ve arkadaşları 146 tip 1 açık tibia kırığında yaptıkları çalışmada sigara içenlerde kaynamanın anlamlı derecede geciktiğini bildirmişlerdir [55].

2.5.1.6 İlaç Kullanımı

NSAİD lerin kırık iyileşmesi üzerine olan etkileri tartışmalıdır. Bazı hayvan çalışmalarında NSAİD lerin kırık kaynamasına negatif yönde etkileri bildirilmesine rağmen [56-58], NSAİD lerin kırık kaynamasını etkilemediği yönünde çalışmalar da mevcuttur [59, 60].

Kırık iyileşmesini negatif yönde etkileyen diğer ilaçlar fenitoin [46], siprofloksasin [61], steroidler, antikoagülanlar olarak sayılabilir.

2.5.2 Nonunion Sınıflandırması

Kaynamama septik ve aseptik olmak üzere iki gruba ayrılır. Septik kaynamamada altta yatan bir enfeksiyöz süreç varken aseptik kaynamamada

enfeksiyon yoktur. Hem septik hem de aseptik nonunionlar atrofik, oligotrofik, hipertrofik ve hatta belirgin psödoartroz olarak sınıflandırılabilir.

Avasküler olarak da adlandırılan atrofik nonunionda kırık iyileşme cevabı zayıftır. Radyolojik olarak hiç kallus dokusunun oluşmaması ile karakterizedir. Kırık iyileşmesi yanıtındaki bu eksiklik yaralanmaya (açık kırık vb.), cerrahi tedaviye (çok fazla yumuşak doku sıyrılması) veya hasta ile ilgili sorunlara (diyabet, sigara kullanımı vb.) bağlı olabilir [62]. Atrofik kaynamamaların tedavisinde kırık bölgesinde biyolojik yanıtı uyarmak amaçlanır.

Hipervasküler olarak da adlandırılan hipertrofik nonunion da ise anormal iyileşme yanıtı mevcuttur. Genellikle iyileşme yanıtı ve kanlanma yeterlidir [63, 64]. Sorun kaynamayı sağlayacak stabilitenin sağlanamamasıdır. Kırık hattındaki fibrokırdak doku mekanik faktörler nedeniyle mineralize olamaz [62]. Bu durumda röntgende aşırı kallus dokusu izlenir. Hipertrofik nonunion tedavisinde yeterli stabilizasyonun sağlanması amaçlanır.

Oligotrofik nonunion atrofik ve hipertrofik kaynama arasında kalan durumu tanımlar.

Psödoartrozda aşırı ve sürekli hareket nedeniyle hipertrofik kaynamama yanında gerçek ekleme benzer şekilde sinoviyal sıvı içeren bir boşluk görülebilir.

2.5.3 Nonunionun Değerlendirilmesi

Kaynamama ile gelen her hasta ayrı değerlendirilmelidir. Değerlendirme süreci belki de hastanın tedavi yolundaki en kritik adımdır. Cerrahin kaynamamayı nasıl tedavi edeceği hakkında öneri sahibi olmasını sağlar. Bu değerlendirmenin amacı kaynamamanın etyolojisini ortaya çıkarmak ve kaynamamanın tedavisi için bir yol oluşturmaktır.

2.5.3.1 Anamnez

Değerlendirme ilk kırığın ne zaman olduğu ve kırık mekanizmasının öğrenilmesiyle başlar. Yaralanma öncesi medikal problemler ve ek yaralanmalar kayıt altına alınır. Hastalar kaynamamaya bağlı ağrı ve fonksiyon kısıtlılığı hakkında sorgulanır. Hastanın bu kırık için geçirdiği önceki cerrahiler hangi tedavilerin uygulandığı hastaya sorulur. Daha önceki ameliyat prosedürleri bilgisi, doğru tedavi planını tasarlamak için kritik önem taşır. Ayrıca anamnezde önceki yara yeri enfeksiyonları varsa yara yeri kültürleri sorgulanmalıdır.

Hastanın genel sağlığı ve beslenme durumu sorgulanmalıdır. Malnutrisyon ve kaşeksinin kırık kaynamasını engellediği bildirilmiştir [65]. Nonunionla gelen obez hastalarda da kemiğe ulaşmak için gereken yağ dokusu fazla olduğu için cerrahi sırasında tam bir mekanik stabilizasyon yapmak zordur [66].

2.5.3.2 Fizik Muayene

Anamnezden sonra detaylı bir fizik muayene yapılmalıdır. Kırık bölgesine aktif drenajın olup olmadığı ve ekstremitedeki deformasyon not edilir. Kırık hattı elle muayene edilerek kırık hattında hareket olup olmadığı ve bu işlem esnasında ağrı olup olmadığı belirlenir. Kırık seviyesinin alt ve üstündeki eklem muayene edilerek ROM ları ve varsa kısıtlılıkları not edilir.

2.5.3.3 Radyoloji

2.5.3.3.1 Direkt Grafi

Direkt grafiler akut kırıkların tanısında sık olarak kullanılsa da kırık kaynamasının değerlendirilmesinde direkt grafilerin kullanımı net değildir. Direkt grafiler kullanılarak kaynamama tanısı genellikle kaynamanın olmadığı gösterilerek konulur.

Düz grafilere ile kırık kaynaması kırık hattı boyunca köprüleşen kallusun varlığı ile gösterilir. Primer kırık iyileşmesiyle iyileşen rijit fiksasyonun yapıldığı kırıklarda kallus görülmez.

2.5.3.3.2 Bilgisayarlı Tomografi

Günümüzde BT cihazlarıyla her düzlemde yüksek kaliteli görüntü elde etmek mümkündür. Böylelikle kemik köprüleşmedeki yetersizlik değerlendirilebilir. Tibiadaki kaynamamaların tespitinde BT nin yüksek duyarlılığı(%100) sahip olduğu gösterilmiştir [67]. Fakat BT nin en önemli dezavantajı düşük özgülüğüdür [67]. Bir çalışmada kemik çevresinin %25 inden az köprüleşme olan hastalar kaynama açısından yüksek riskli bulunurken(%37.5) bu oran %25 inden fazla köprüleşmesi olan hastalarda sadece %9.7 dir [68].

2.5.3.3.3 Kemik Sintigrafisi

Kaynamamaların büyük çoğunluğu kemik sintigrafisinde normal iyileşme süreci devam eden kırıklarda olduğu gibi yoğun tutulum gösterir [69].

2.5.4 Nonunion Tedavisi

2.5.4.1 Cerrahi Dışı Tedavi

Cerrahi dışı tedaviler direkt ve indirekt girişimler olarak ikiye ayrılır. İndirekt girişimlere hasta sigara içiyorsa sigaraya ara verilmesi, hastanın beslenmesinin düzenlenmesi, endokrin veya metabolik bir bozukluğu varsa bunların tedavi edilmesi örnek olarak verilebilir.

Direkt girişimlere örnek olarak elektrik stimülasyonu, ultrason, hastanın kırık üzerine yük vermesi gösterilebilir. Yük vermenin mekanik yüklenme ile osteoblastik

aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir [70]. Elektrik stimülasyonunun etki mekanizması kırık bölgede elektrik potansiyelini değiştirmesi olarak bildirilmiştir [71, 72]. Düşük yoğunlukta ultrasonun kırıklarda kaynama hızını arttırdığı gösterilmiştir [73, 74].

Cerrahi dışı tedaviler için nonunion bölgesindeki dizilim bozuklukları kontrendikasyon oluşturur, çünkü kaynamama iyileştiğinde dizilim bozukluğu nedeniyle kalacak deformite hastada fonksiyonel kısıtlılığa neden olacaktır.

2.5.4.2 Cerrahi Tedavi

Kaynamamanın cerrahi tedavisinde seçilen yöntemden bağımsız olarak bazı genel ilkeler vardır. Tıbbi uygulamaların çoğunda olduğu gibi uygun tedavi planlaması için ilk ve en önemli basamak doğru tanının konulmasıdır. Tam bir tanı için kaynamama atrofik, oligotrofik, hipertrofik ve psödoartroz oluşuna göre sınıflandırılmalı, septik veya aseptik olduğu belirlenmeli ve eşlik eden deformite tespit edilmelidir.

Hipertrofik kaynamamalarda biyolojik kaynama kapasitesi mevcut iken, mekanik stabilite yetersizliği nedeniyle kaynama sağlanamaz. Bu nedenle hipertrofik kaynamamalarda tedavi mekanik stabilitenin artırılması yönünde olacaktır. Hipertrofik kaynamamalarda biyolojik iyileşme potansiyeli olduğundan, kaynamama bölgesinin debridmanı ve kemik greftlenmesi zorunlu değildir.

Psödoartrozlar, canlı ve atrofik kaynamamalar, cansız kabul edilmesine rağmen her ikisinde de kaynamama bölgesinin debride edilmesi gerekir. Atrofik kaynamama tedavisinin temel ilkesi, ölü kemik uçlarını temizleyerek kanayan sağlıklı kemiği ortaya çıkarmaktır. Her iki kaynamama tipinde de kemik greftlenmesine ihtiyaç duyulur.

Kaynamama tedavisinde bir diğer önemli genel kural da enfeksiyon kontrolü ve tercihen ortadan kaldırılmasıdır. Enfeksiyon olmadığında ciddi ve kompleks kaynamamalar iyi bir şekilde tedavi edebilirken, enfeksiyon varlığında basit kaynamamalar bile tedaviye dirençli hale gelir. Eğer hastada enfeksiyon varlığı

varsa nonunion tedavisinden önce enfeksiyon tedavisi yapılmalıdır. Bölgedeki implantların çıkarılması ve sağlıklı bir çevre elde edene kadar seri debridmanlarda nekrotik yumuşak dokular ve kemiğin uzaklaştırılması ilk adım olmalıdır. Enfeksiyonla mücadeleye yardımcı olacak stabilizasyonun sağlanması için eksternal fiksatörler tercih edilebilir. Ancak antibiyotik kaplı İM çiviler kullanılabilecek seçenekler arasında yer almaktadır [75, 76]. Enfeksiyon tedavisi etkene özgü parenteral antibiyotikle 6 hafta devam eder. Enfeksiyonun kontrol altına alındığı klinik ve laboratuvar verileri ile doğrulandığında kaynamama tedavisinin son aşaması uygulanabilir. Eksternal fiksasyondan internal fiksasyona geçerken 2 aşamalı tedavi uygulanır. Eksternal fiksatör çıkarılır pin diplerinin iyileşmesini sağlamak için hasta atele alınır ve bir müddet beklenir. Pin dipleri kapandıktan sonra hastanın nihai tedavisi uygulanır

2.5.4.2.1 Kaynamama Tedavisinde Plak Vida Kullanımı

Plak ve vidalar ile nonunion tedavisi çoğu anatomik bölgede, ayrıca segmenter kaybın olduğu uzun kemiklerin diyafizyal bölge kırıklarında kullanılabilir.

Kaynamama tedavisinde plakların kullanımı, genellikle uygulamanın göreceli invazif olması ve çoğunlukla daha önceden etkilenmiş yumuşak dokunun bir daha diseke edilmesi nedeniyle kısıtlanır. Yumuşak doku problemi olmayan, yumuşak dokunun plak örtünmesini sağlayacağı durumlarda plaklar her tip kaynamamada kullanılabilir.

2.5.4.2.2 Kaynamama Tedavisinde İntramedüller Çivi Kullanımı

İntamedüller çivi kaynamama tedavisinde 3 farklı şekilde kullanılır. Bunlar öncesinde çivi yapılmamış kaynamamalarda çivileme, önceden çivi yapılmış ve kaynaması olmayan hastalarda çivi değişimi veya dinamizasyondur. Bu uygulamalardan hangisi yapılacak olursa olsun çivi tedavisi en çok uzun kemiklerin diyafizleri için uygundur. Metafizyel kaynamamalarda çivi kullanımı hakkında farklı

sonuçlar bildirilmiştir ve en iyi sonuçlar distal femur ve distal tibia kaynamamalarının intramedüller çivilenmesi ile elde edilmiştir [77, 78].

Uzun kemiklerin diyafiz kırıklarında altın standart İM ivileme olduğu için kaynamamada çivi değişimi primer İM ivilemeden daha sıktır. Primer İM ivileme daha çok konservatif tedavi uygulanıp kaynamanın sağlanamadığı tibia ve humerus şaft kırıklarında kullanılır.

ivi değişimi eski ivinın yeni ve daha büyük boy bir oymalı çivi ile değiştirilmesidir. Femur ve tibia kaynamamalarında çivi değişimi sonrası kaynama oranları %50 ile %90 arasında değişmektedir [79-81]. ivi değiştirilmesinin nedeni kilitleme vidası kullanılmaması veya kırılmasına bağlı rotasyonel instabilite veya küçük çivi kullanımına bağlı stabilite eksikliğidir. ivi değişimindeki oyma işlemi ile bir miktar lokal kemik grefti birikir bu greftin iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir [82]. Ama büyük miktardaki defektlerin bu şekilde dolmayacağı unutulmamalıdır. Kırık bölgesine açık greftleme yapılacaksa İM ivileme çok tavsiye edilmemektedir. ivi değişimi kemik diziliminin uygun olduğu durumlarda tercih edilmelidir. Yeni yerleştirilecek çivi eski ivinın yolundan gideceği için açısal dizilim bozuklukları yeni çivi ile de devam edecektir.

Kaynamama için İM ivileme tekniği akut kırıklarda kullanılan teknikle aynıdır. Fakat ivi değişimi için yapılacak oyma işleminin öncekinden ne kadar büyük olacağı konusunda halen tartışmalar devam etmektedir. Eski alışmalar en az 2 mm fazla oyma yapılmasını önerirken yeni çalışmalar 1 mm fazla oymanın da yeteceği yönündedir [83]. ivi değişiminde amaç kaynama için gerekli mekanik direnci sağlayacak kadar büyük ivinın yerleştirilmesidir.

Dinamizasyon ivinın bir ucundaki kilitleme vidalarının çıkarılarak y k verme ile aksiyel kısalmanın sağlanmasıdır. Dinamizasyonla kırık hattındaki defekt küçültülerek kaynama sağlanmaya çalışılır. Kaynamama ve gecikmiş kaynama olgularının %50 sinde dinamizasyon ile kaynama sağlandığı bildirilmiştir [84-86]

2.5.4.2.3 Kaynamama Tedavisinde Eksternal Fiksator Kullanımı

Kırıkların tedavisinde çok farklı ekstrenal fiksator tipleri kullanılmasına rağmen ince tellerin kullanıldığı sirküler fiksatorler ve ilizarov tekniği kaynamamaların eksternal fiksasyon ile tedavisinin ana parçalarıdır. İnce tellerin kullanıldığı fiksatorler el, ayak hatta klavikula gibi uzun kemiklerin kaynamamalarında kullanılabilir [87-89]. İlizarov tekniğinin diğer avantajları bu yöntemin daha az yumuşak doku hasarına neden olması ve varolan deformitelerin yavaş yavaş düzeltilmesine imkan vermesidir

Kaynamamaların sirküler fiksatorle tedavisinde pin diplerine dikkat edilmelidir. Ekleme komşu pin diplerinin enfeksiyonu septik artritis riski taşır. Bundan dolayı pin dibi bakımı hastaya iyi bir şekilde anlatılmalıdır. İlizarov ile kaynamama tedavisinin bir diğer avantajı da hastanın erken yük verebilmesidir. Yumuşak doku defektleri iyileştikten sonra hasta tolere edebildiği kadar yük verebilir.

2.5.4.2.4 Kaynamama Tedavisinde Artroplasti

Kaynamama tedavisinde artroplasti veya hemiarthroplastinin kullanımı sınırlıdır. Eğer doğru hasta seçilirse artroplasti hızlı ve fonksiyonel düzelme sağlar. Artroplasti yapabilmek için kaynamama eklem bölgesinde olmalı ve kemik kesilerinin kaynamama bölgesini de içermesi gerekir. Yaşlılarda kaynamamaya eşlik eden artritis bulguları varsa artroplasti iyi bir seçenektir. Genç hastalarda protezin belli bir ömrü olmasından dolayı kaynamamalarda artroplastiden daha çok osteosentez önerilir.

Artroplasti için en uygun kaynamama bölgeleri distal femur ve distal humerustur [90-92]. Her iki bölge de önemli yumuşak doku bağlantılarının olmaması bunun nedenidir. Femur ve humerusun distal uçlarının aksine proksimal uçlarına birçok kas ve tendon yapıştığı için femur ve humerus proksimal uç kaynamamalarında artroplasti çok uygun bir seçenek olarak görülmemektedir. Aktif enfeksiyon varlığı artroplasti için kontraendikasyon oluşturur. Artroplasti seçeneği

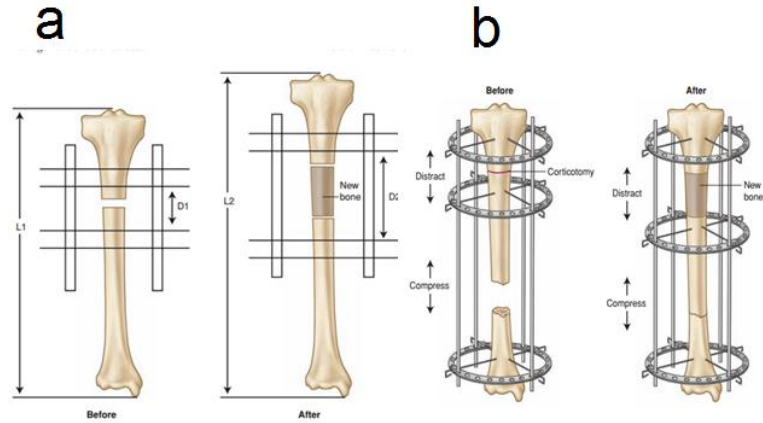
enfekte kaynamamalarda enfeksiyon agresif bir şekilde tedavi edildikten sonra uygulanmalıdır.

2.6 Segmenter Kemik Kaybı Olan Kaynamamaların Tedavisi

Travmaya bağlı kemik kaybının olduğu segmenter defektler kaynamama ile karşımıza çıkabilir. Etiyolojisine bakılmaksızın, bu durum hasta ve cerrah için çok zorlu problemlerdir. Segmenter defektlerin tedavisinde otojen kemik greftlenmesi, serbest vaskülarize fibula grefti gibi birçok cerrahi seçenek tanımlanmıştır. Bu durumun çok nadir görünmesi ve hastadan hastaya farklılık göstermesinden dolayı altın standart tedavinin ne olduğu konusunda görüş birliğine varılamamıştır. Bundan dolayı tedavideki kararlar cerrahın kişisel deneyim ve becerisine kalmıştır.

2.6.1 İlizarov Tekniği ile Kemik Defektlerinin Tedavisi

Segmenter defekti olmayan kaynamamaların ilizarov ile tedavisinde kaynamama bölgesinde basit kompresyon veya distraksiyon ya da bu ikisinin kombinasyonu kullanılır. (Şekil 5-a) Kemik defekti olduğunda ise distraksiyon bölgesine kortikotomi yapılır ve kemik distrakte edilirken, defektin olduğu bölgeye ise kompresyon yapılır. (şekil 5-b) Bu metod son 20 yıldır tibia defektli hastaların tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır[93, 94]



Şekil 5. İlizarov tekniği ile kemik defektinin tedavisi

2.6.2 Masquelet Tekniği ile Kemik Defektlerinin Tedavisi

Uzun kemiklerin geniş diyafiz defeklerinin rekonstrüksiyonu genellikle kemik kaybının etiyolojisi ne olursa olsun ekstremitte kurtarma için en büyük zorluktur. En sık ve en yaygın kullanılan metodlar vaskülerize fibula grefti ve ilizarov ile distraksiyon osteogenezi işlemidir. Kemik otogreftleri defekt 4-5 cm nin üzerinde olduğu zaman önerilmez. Çünkü diyafizel defekt 5 cm nin üzerine çıktığı zaman greft iyi kanlanan bir kas dokusu zarfı içinde dahi olsa rezorpsiyona uğrar ve kaynama gerçekleşmez [3, 95]. Masquelet indüklenmiş membran ve kansellöz otogreftlerin kombine edildiği bir prosedür önermiştir [4]. Masquelet ilk olarak bu tekniği 1986 da 25 cm uzunluğunda diyafizel kemik kaybının rekonstrüksiyonunu vaskülerize kemik grefti ihtiyacı olmadan yaparken tanımlamıştır [5]. Hatta bu tekniğin defekt alanı enfekte olsa veya radyoterapiye maruz kalsa dahi otogrefti koruyacak membranı oluşturduğu bildirilmiştir [5, 96].

2.6.2.1 Tekniğin Prensipleri

Rekonstrüksiyon iki farklı cerrahi aşama gerektirir. İlk aşamada radikal debridman sonrası defekt polimetilmetakrilat (PMMA) çimento spacer ile doldurulur.

Spacer dokuda yabancı cisim reaksiyonu oluşturur ve spacerin üzerini yabancı cisim reaksiyonuna bağlı bir membran kaplar. 6-8 hafta sonra ikinci aşamada spacerin üzerini kaplayan membrana zarar vermeden spacer çıkarılır ve kaviteye iliak kanattan alınan otolog kemik grefti uygulanır. İliak greftin yeterli olmadığı zaman kansellöz kemik grefti 3 e 1 oranla karıştırılarak da kullanılabilir [97]. İlk aşamada çimento uygulanırken ikinci aşamada membranın zarar görmeden kaldırılabilmesi için sadece defekte değil etraf kemik dokuya da sürülmesi gerekir. Ayrıca greftin sınırlandırılabilmesi için ikinci aşamada greft uygulandıktan sonra membranın ve etraf yumuşak dokunun sıkıca dikilmesi gerekir [97].

Spacerın ilk rolü mekaniktir. Defektin içerisine fibroz doku invazyonunu önler. Hatta spacer yabancı cisim gibi davranır ve greftleme için uygun lokal şartları oluşturur. İkinci rolü ise biyolojiktir. Kemik greftini revaskülarize edecek ve rezorpsiyonunu önleyecek membranın indüksiyonunu sağlar [4, 5, 96]. Klauke ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada koyunların femurunda 3 cmlik bir defekt oluşturulup defekt PMMA spacer ile doldurulmuş 1 ay sonra spacer çıkarılıp 1. Grupta membran korunup defekt kemik grefti ile doldurulmuş 2. Grupta membran eksize edilip defekt kemik grefti ile doldurulmuş, 3. Grupta membran korunup defekt boş bırakılmış, 4. grupta membran eksize edilip defekt boş bırakılmıştır. Takiplerde beklendiği gibi 3. ve 4. gruplarda kaynama olmazken 1.grupta tamamen kaynama olmuş ve 2.grupta kemik greftinin rezorbe olduğu izlenmiştir [98].

2.6.2.2 Yabancı Cisim Reaksiyonu ile İndüklenmiş Membran Oluşması

Yumuşak doku iyileşmesinin bir parçası olan granülasyon dokusu formasyonu yabancı cisim reaksiyonunda da izlenir [99]. Yabancı cisim reaksiyonu, yabancı materyalin vaskülarize yumuşak dokuda meydana getirdiği yaralanma ile başlar. Bu yaralanma doku rejenerasyonuna ve granülasyon dokusunun yoğun fibrozis, kemik veya diğer mezenkimal dokuya matürasyonuna neden olabilen bir akut inflamasyon fazını başlatır. Uygun olmayan durumlarda ise kronik inflamasyon gelişir ve doku matürasyon sürecini etkiler. İnflamatuvar reaksiyonun derecesi, kalitesi ve süresi, doku ortamının optimizasyonu (tüm ölü doku ve enfeksiyonun debridmanı, yeterli vaskülarizasyon) ile değiştirilebilir. Granülasyon dokusunun

oluşumundaki hem akut hem de geçici inflamatuvar süreçler, makrofajların varlığı, makrofajların ve fibroblastların infiltrasyonu ile karakterizedir. Kapiller damar oluşumu ve neovaskülarizasyon, olgunlaşan granülasyon dokusunun temel özelliklerinden biridir. Granülasyon başlangıçta hematomdan ve hücre dışı matriks bileşenlerinden oluşan bir doku öncüsüdür ve zamanla neovaskülerize fibröz bağ dokusu membranına dönüşür. Aynı şekilde yabancı cisim reaksiyonunda da granülasyon dokusu yabancı materyali sarar daha sonra inflamatuvar reaksiyonun sonunda bu granülasyon dokusu matür fibröz kapsüle dönüşür [100].

2.6.2.3 Oluşan Membranın Histolojisi

Masquelet ve arkadaşları oluşan membranı 1-2 mm kalınlıkta kemik iyileşmesi için uygun bir çevre sağlayan histolojik özellikleri olarak da sinovyal dokuya benzeyen bir yapı olarak tanımlamıştır. Ayrıca zengin bir vaskülerize yapıya sahip olduğunu ve kemik defekt içine yumuşak doku invazyonunu inhibe ederek otolog kemik greftlerini rezorpsiyondan koruyabileceğini bildirmişlerdir [5]. Pelissier ve arkadaşları tavşan modelinde PMMA çimento spaceri ektopik olarak subkutan dokuya implante ederek büyüme faktörlerini (BMP-2, TGF β 1, VEGF) salgılayan osteojenik ve vasküler / anjiyojenik özelliklere sahip membranın oluştuğunu ve bu membranın osteoblast diferansiasyonunun arttığını tarif etmişlerdir [96]. Viateau ve arkadaşları yaptığı çalışmada membranda CBFA1 + hücrelerin bulunduğunu bundan dolayı membranın osteoprogenitör hücrelere sahip olduğunu bildirmişlerdir [101]. Henrich ve arkadaşları PMMA spaceri ektopik subkutan dokuya değil de farelerin femurunda oluşturdukları defekte implante ederek oluşan membranı hem subkutan dokuda oluşan membranla hem de periostla karşılaştırmışlar ve bu membranın subkutan dokuda oluşan membranla aynı fakat yapısının, kan damarlarının lokasyonunun, ve kalınlığının periosttan çok farklı olduğunu bildirmişlerdir [102].

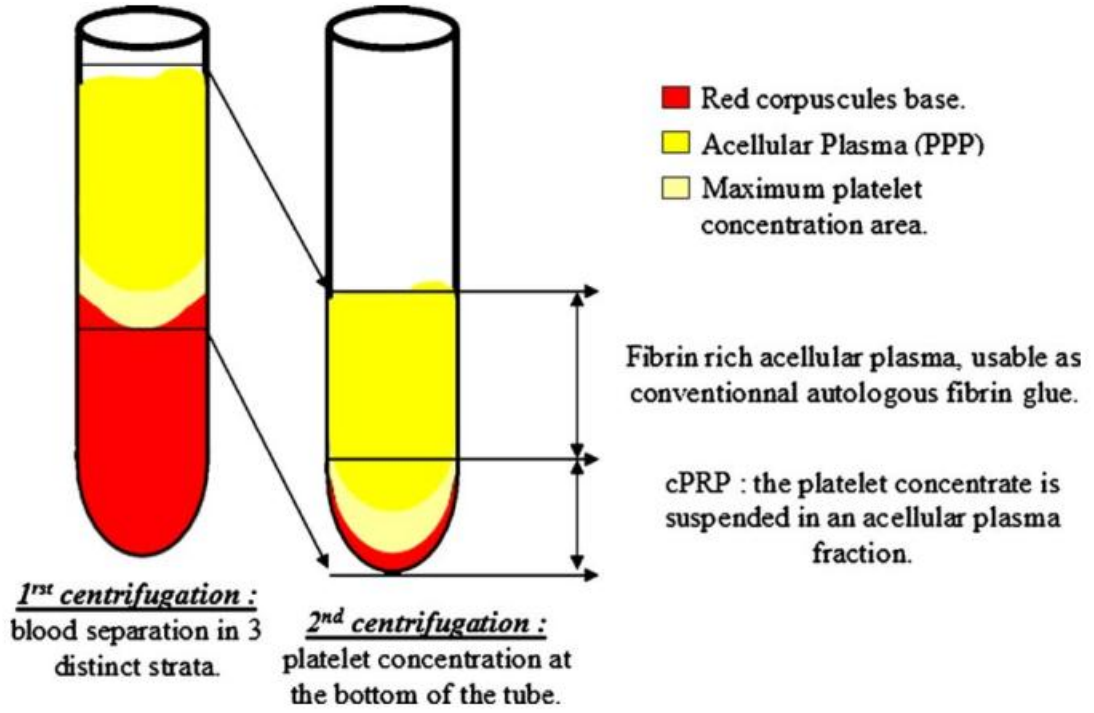
2.7 Konsantre Growth Faktör (CGF)

Yara iyileşme süreci birçok intraselüler ve ekstraselüler medyatör tarafından yönetilir. Klinikte kemik ve yumuşak dokuların iyileşmesini hızlandırmak için trombosit konsantrasyonları kullanılmaktadır.

Trombositler yüksek miktarda platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) ve β 2 (TGF- β 2), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and insulin-like growth factor (IGF) gibi büyüme faktörlerini ihtiva eder. Bu büyüme faktörleri hücre proliferasyonunu, matriks remodelingini, anjiyogenezi stimüle ederler [6].

Son zamanlarda, trombosit, büyüme faktörleri, lökosit ve fibrin matriks elde etmek için trombosit konsantrasyonunu kullanan sayısız teknik geliştirilmiştir [103, 104].

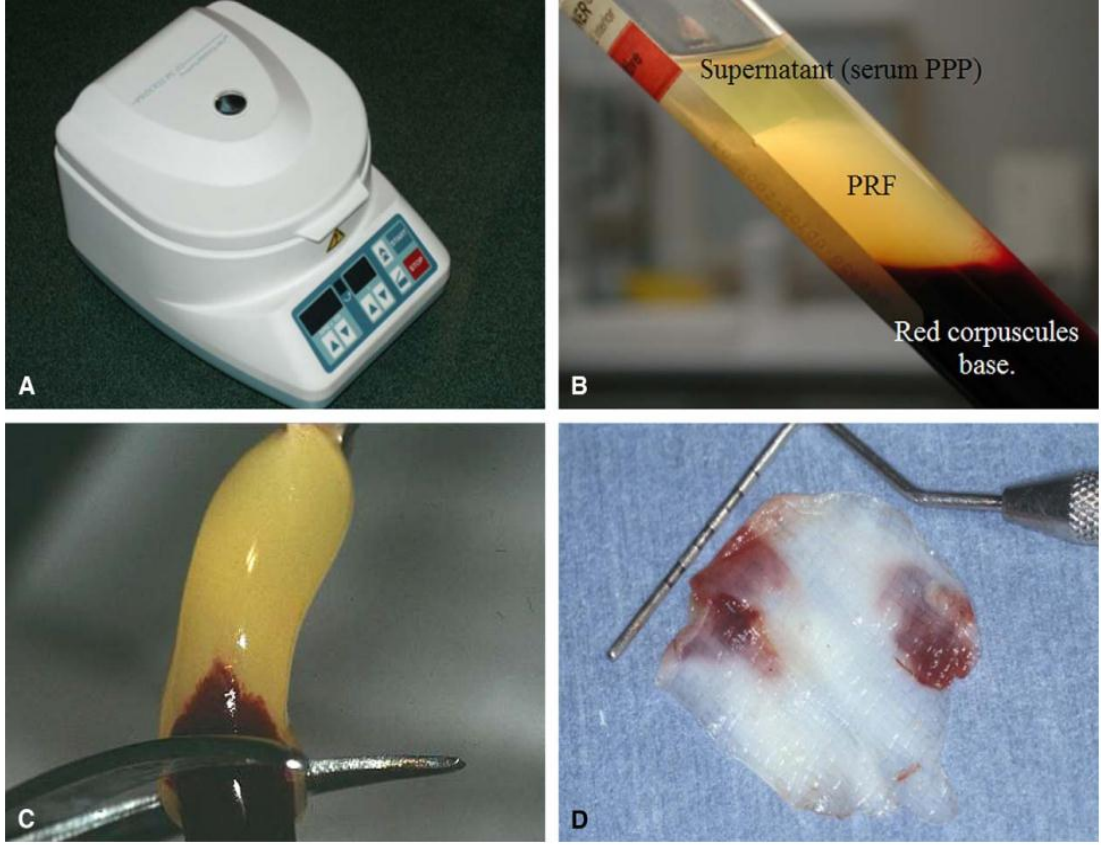
İlk jenerasyon trombosit konsantrasyonu trombosit zengin plazma (PRP)dir. PRP uzun zamandır doku iyileşmesini hızlandırmak için kullanılmaktadır. PRP için kan antikoagülanlı bir tüpe alınır ve santrifüje edilir. Santrifüj sonrası tüpte 3 farklı katman oluşur en üstte aselüler plazma (PPP) en altta kırmızı kan hücreleri ve bunların arasında trombositten zengin alan bulunur. Bir enjektör yardımıyla PPP, trombositten zengin alan ve kırmızı kan hücreleri katmanının üst yüzeyi aspire edilerek antikoagülansız bir tüpe aktarılır ve tekrar santrifüj edilir. Santrifüj sonrası dipte kalan katman PRP olarak adlandırılır (şekil 6). PRP uygulanırken elde edilen PRP ye fibrin polimerizasyonu ve α granüllerin degranülasyonu için sıgır trombini ve kalsiyum klorid eklenir.



Şekil 6. PRP nin hazırlanışı

PRP uzun zamandır doku iyileşmesi için kullanılmasına rağmen bazı eksiklikleri mevcuttur. PRP nin fibrin polimerizasyonu ve sitokin salınımı kullanılan trombin ve kalsiyum kloride bağlıdır ve ayrıca fibrin polimerizasyonu ve sitokin salınımı bir anda olduğu için PRP nin uzun dönem etkileri tartışmalıdır [104]. PRP nin hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonu üzerine etkilerinin çelişkili olduğunu bildiren yayınlarda mevcuttur [7].

Choukroun 2006 yılında trombosit zengin fibrin (PRF) adı verilen yeni bir protokol yayınlamıştır [104]. Bu protokole hastanın venöz kanı PRP den farklı olarak antikoagülansız tüpe alınır. Alınan kan hemen 10 dk 3000 rpm de santrifüje edilir. Santrifüj sonrası tüpte en üstte PPP ortada plateletten zengin fibrin (PRF) en altta kırmızı kan hücreleri olmak üzere 3 katman oluşur (Resim 3). Bu fibrin matriksin hücrelerin migrasyonunu, proliferasyonunu, osteoblastik diferansiyasyonunu desteklediği, anjiyogenezi indüklediği, özellikle kemik iyileşmesinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir [105, 106].



Resim 3. PRF nin hazırlanışı

PRF nin oluşum mekanizması şu şekildedir. Antikoagülsüz tüpte santrifüjle fibrinojen fibrine dönüşmeden orta hatta konsantre hale gelir. Tüple temas eden trombositler pıhtılaşma kaskatını başlatır ve konsantre fibrinojen tüpün ortasında fibrin pıhtıya dönüşür. Trombositler büyük miktarda bu fibrin pıhtı içinde hapsolür. Bu prosedürün en önemli noktası pıhtılaşma kaskatı başlamadan bir an önce santrifüj işleminin başlatılmasıdır. Bundan dolayı hastadan alınan kan hemen santrifüj edilmelidir.

PRP de trombosit degranülasyonu için sığır trombini ve kalsiyum kloride ihtiyaç varken PRF de santrifüj esnasında tüpün duvarlarına çarpan trombositler degranüle olur. Ayrıca PRP de hızlı fibrin polimerizasyon ve degranülasyon olurken PRF de bu işlem yavaştır [107]. Yavaş fibrin polimerizasyon trombositlerden salgılanan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin PRF tabakasındaki glikozaminoglikanlar tarafından yakalanmasını sağlar. Bunun sonucu olarak da PRF de diğer trombosit konsantrelerinin aksine yavaş ve devamlı bir sitokin ve büyüme faktörleri salınımı meydana gelir [107].

Konstantre growth faktör(CGF) 2006 yılında Sacco tarafından geliştirilmiştir. Oluşturulma mantığı PRF ile aynıdır. Hastadan alınan kan antikoagülansız tüpe konulur. CGF de PRF den farklı olarak santrifüj işlemi özel bir santrifüj cihazı ile (MEDIFUGE™ , Silfradentsrl, S. Sofia, Italy) farklı rpm ve farklı dakikalarda yapılmasıdır. Bu santrifüj cihazında kan 30 saniye hızlanma, 2700 rpm(600g) de 2 dakika, 2400 rpm(400g) de 4 dakika, 2700 rpm (600g) 4 dakika, 3000 rpm(800g) de 3 dakika ve en sonunda 36 saniye yavaşlama ile santrifüje edilir. Farklı hızlarda santrifüj daha geniş, daha yoğun ve içerik olarak daha fazla büyüme faktörü içeren bir fibrin matriks oluşturur [9]. Kemik iyileşmesini hızlandırma amacıyla CGF in kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur [108, 109]. Ayrıca CGF nin kemik iyileşmesine etkisini araştıran in vitro çalışmalar da yapılmıştır [110, 111].

Masquelet tekniğe CGF ekleyerek oluşan membranın kalitesini inceleyen herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışmamızda 3. ve 6. haftada hayvanlar sakrifiye edilip alınan örneklerde mikroskopik olarak oluşan membranın kalınlığına, histokimyasal olarak elastik fiberlerin oranına ve immünohistokimyasal olarak oluşan membranın vaskülarizasyon (CD31), inflamasyon (MAC387) ,proliferasyon (Ki67) ve oluşan mezenkimal kök hücre (MSCs; STRO-1+) sayısının karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma deneysel bir çalışma olup Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden 01.12.2016 tarihinde,2016-0035 sayılı Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınarak yapılmıştır

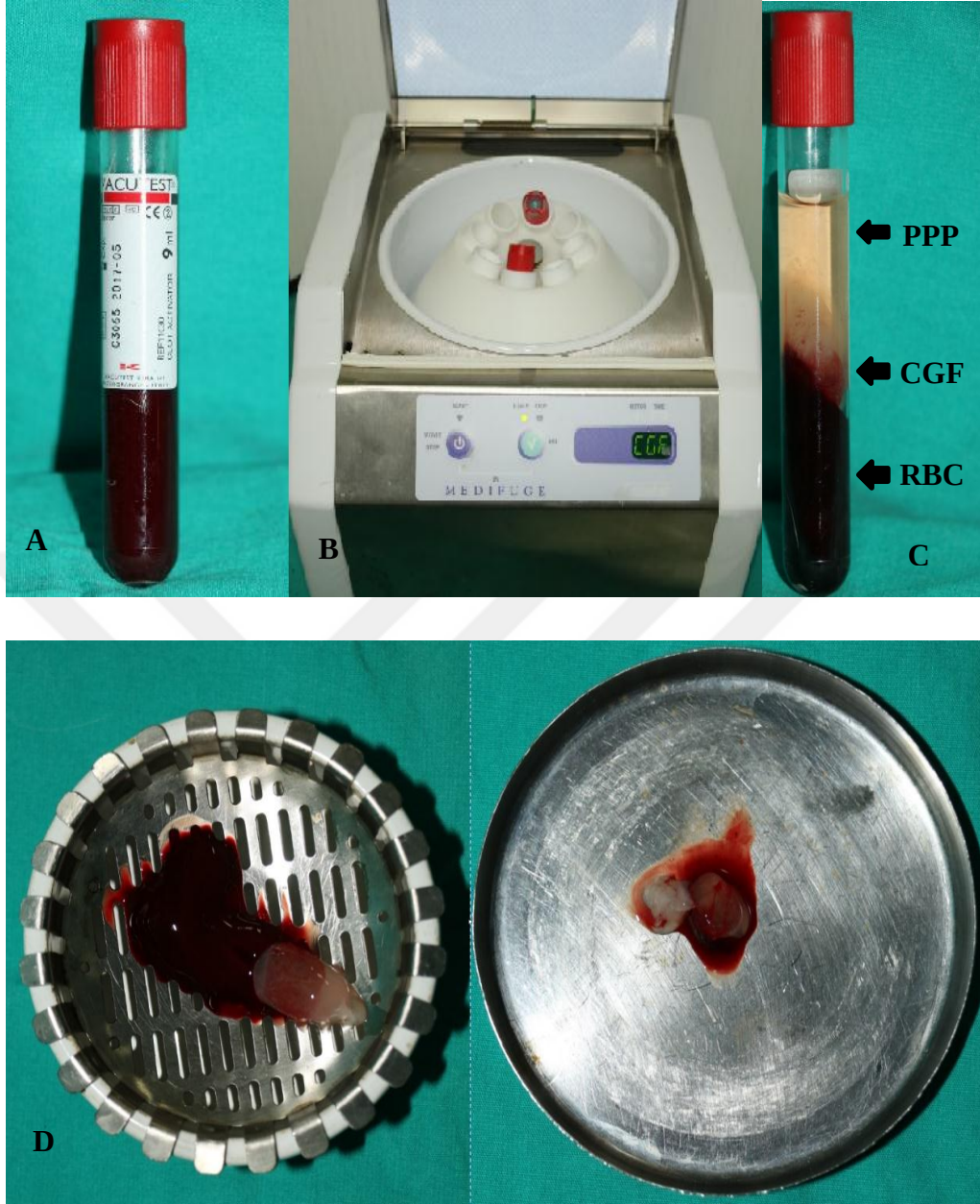
Yeni Zelanda cinsi ağırlıkları 3500-4000 g. arasında değişen her grupta 6 şar adet olmak üzere toplam 24 erkek tavşan çalışmaya alındı. Hayvanlar randomize ve her grupta 6 şar tavşan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup I 3. hafta sakrifiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak grup, Grup II 3. hafta sakrifiye edilmek üzere tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup, Grup III 6. hafta sakrifiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak grup, Grup IV 6. hafta sakrifiye edilmek üzere tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup (Tablo 1) olacak şekilde düzenlendi. Her bir kafeste bir tavşan olacak şekilde tavşanlar ayarlandı. Çalışma süresince tavşanlara limitsiz olacak şekilde musluk suyu ve standart kemirgen yemi verildi. Hayvanlar 22 santigrad derece (°C) sıcaklıkta, 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta kalacak şekilde takip edildiler. Anestezi amacıyla Ketamin (Alfamine %10 enjektele-ALFASAN) 35 mg/kg ve Ksilazine Hidroklorid (Ksilazol-PROVET) 8 mg/kg dozlarında karıştırılarak intramüsküler enjeksiyon ile uygulandı. Bu preparatlar gluteal kaslara uygun dozlarda uygulandığında yaklaşık 60- 75 dakikalık anestezi süresi sağladı.

Tablo 1. Çalışmadaki gruplar

<i>Deney ve kontrol grupları</i>	<i>Açıklama</i>	<i>Grup başına hayvan adedi</i>
Grup I	3. Hafta sakrifiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak grup	6
Grup II	3. Hafta sakrifiye edilmek üzere tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup	6
Grup III	6. Hafta sakrifiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak grup	6
Grup IV	6. Hafta sakrifiye edilmek üzere tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup	6
Toplam		24

3.1 CGF nin Hazırlanması

Sacco' nun tariflediği gibi tavşanların kulaklarından alınan 9 ml venöz kan antikoagülansız tüpe(Vacutest® Kima, Arzergrande, Italy) konuldu (Resim 4-A). Bu tüpler hemen özel bir santrifüj cihazında (MEDIFUGE™ , Silfradentsrl, S. Sofia, Italy) 30 saniye hızlanma, 2700 rpm(600g) de 2 dakika, 2400 rpm(400g) de 4 dakika, 2700 rpm (600g) 4 dakika, 3000 rpm(800g) de 3 dakika ve en sonunda 36 saniye yavaşlama ile santrifüje edildi (Resim 4-B). Santrifüj sonrasında tüp içerisinde en üst katmanda trombosit fakir plazma (PPP), orta katmanda trombositlerin ve konsantre growth faktörlerin tuzaklandığı fibrin zengin jel (CGF) ve en alt katmanda kırmızı kan hücrelerinin(RBC) olduğu 3 katman oluştu (Resim 4-C). En üstteki PPP enjektör yardımıyla çekildi ve birbirine yapışık olan CGF jel katmanı ve RBC katmanı tüpten çıkarıldı. Ardından CGF jel katmanı makas yardımıyla RBC katmanından ayrıldı (Resim 4-D). Daha sonra CGF jel presleme maşası ile deneyde kullanılmak üzere CGF membranı haline getirildi (Resim 5).



Resim 4. CGF'nin Hazırlanması. 9 ml venöz kan antikoagülsüz tüpe(Vacutest® Kima, Arzergrande, Italy) konuldu (A). Bu tüpler hemen özel bir santrifüj cihazında (MEDIFUGE™, Silfradentsrl, S. Sofia, Italy) santrifüje edildi (B). Santrifüj sonrasında tüp içerisinde en üst katmanda trombosit fakir plazma(PPP), orta katmanda trombositlerin ve konsantre growth faktörlerin tuzaklandığı fibrin zengin jel(CGF) ve en alt katmanda kırmızı kan hücrelerinin(RBC) olduğu 3 katman oluştu (C). En üstteki PPP enjektör yardımıyla çekildi ve birbirine yapışık olan CGF jel katmanı ve RBC katmanı tüpten çıkarıldı. Ardından CGF jel katmanı makas yardımıyla RBC katmanından ayrıldı (D).



Resim 5. CGF'nin jel presleme maşası ile deneyde kullanılmak üzere CGF membranı haline getirilmesi.

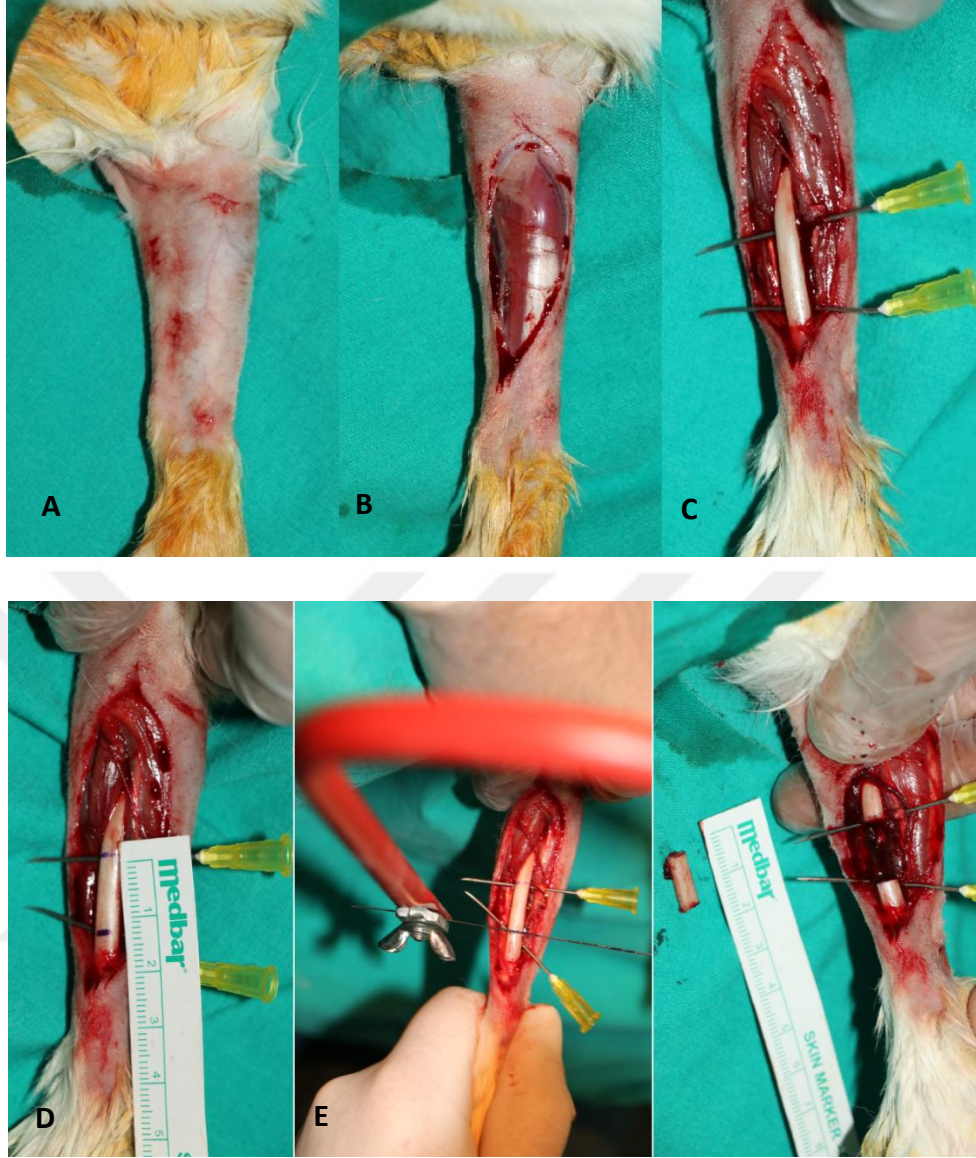
3.2 Cerrahi Prosedür

Anestezi sağlandıktan sonra tavşanlar supin pozisyonda yatırıldı ve sağ taraf ön bacakları traşlandı ve yıkandı. Polivinil İodür (Batticon, ADEKA) solüsyonu ile boyanıp cerrahi sterilite sağlandı. Ardından cerrahi saha steril şekilde örtüldü (Resim 6-A). Sağ ön bacak anteriordan radius üzerinden 5 cm lik insizyonla girildi (Resim 6-B). Kaslar ve periost sıyrılarak radiusa ulaşıldı. İki adet sarı enjektör ucu interosseöz mesafeden gönderilerek radius hem yumuşak dokudan hem de ulnadan ayrıldı (Resim 6-C). Tavşan radius diyafizinde kritik boyutta kemik defekti yapmak için distal işareti radiokarpal eklemin 3 cm proksimalinde olacak şekilde 15 mm'lik radius diyafizi işaretlendi (Resim 6-D). Ardından işaretli yerler 4 numara kıl testeresi (İZELTAŞ, İzmir, Türkiye) ile kesildi ve aradaki kemik çıkarılarak tavşan radiusunda kritik boyutta kemik defekti oluşturuldu (Resim 6-E).

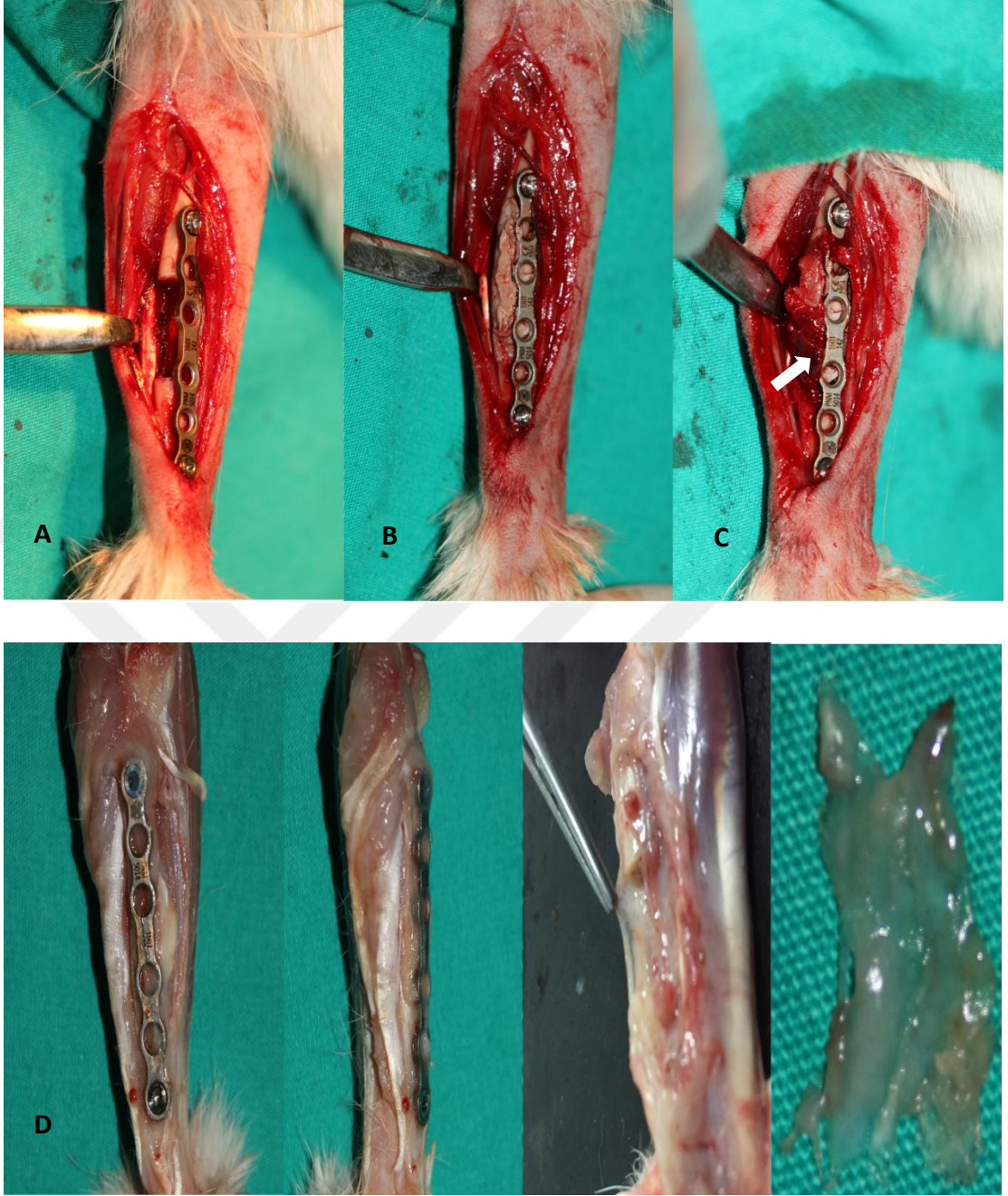
Daha sonra radiusun proksimali ve distali defekt korunarak 15 mm lik 6 delikli mini plak ve 2 adet vida(bir adet proksimale bir adet distale olacak şekilde)(Normmed, Ankara, Türkiye) yardımıyla fikse edildi (Resim 7-A). Defekt antibiyotiksiz PMMA kemik çimentosu (BIOMET, Warsaw, Indiana, USA) ile dolduruldu (Resim 7-B). Serum fizyolojik ile cerrahi saha yıkandıktan sonra Grup II ve Grup IV e hazırlanan CGF membran çimento üzerine örtülürken (Resim 7-C) Grup I ve Grup III e başka bir işlem yapılmadı. Ardından Kaslar 4-0 vikril sutur ile

Çimento ve plak tamamen kapanacak şekilde, cilt ise 5-0 prolene ile sütüre edilerek cerrahi sonlandırıldı. Tüm hayvanlara preop ve postop 48 saat olacak şekilde antibiyotik profilaksisi(55.000 IU/kg, kristalize Penisilin G potasyum) uygulandı. Postoperatif dönemde tavşanlar normal kafes aktivitelerine bırakıldı ve günlük olarak izlendi. n bacağı hareketsiz tutmak için herhangi bir tespit aracı kullanılmadı. 1. , 3. ve 5. gün pansumanları yapıldı. Grup I ve Grup II 3. hafta Grup III ve Grup IV 6. hafta intrakardiyak 3 cc tiopental sodyum verilerek sakrifiye edildi. Ardından eski insizyon üzerinden girilerek cilt, ciltaltı ve kaslar aralandı. Çimentonun üzerinde oluşmuş membran zarar verilmeden eksize edildi (Resim 7-D) ve patolojik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edildi.





Resim 6. Cerrahi saha steril şekilde örtüldü (A). Sağ ön bacak anteriordan radius üzerinden 5 cm lik insizyonla girildi (B). Kaslar ve periost sıyrılarak radiusa ulaşıldı. İki adet sarı enjektör ucu interosseöz mesafeden gönderilerek radius hem yumuşak dokudan hem de ulnadan ayrıldı (C). Tavşan radius diyafizinde kritik boyutta kemik defekti yapmak için distal işareti radiokarpal eklemin 3 cm proksimalinde olacak şekilde 15 milimetrelik radius diyafizi işaretlendi (D). Ardından işaretli yerler 4 numara kıl testeresi ile kesildi ve aradaki kemik çıkarılarak tavşan radiusunda kritik boyutta kemik defekti oluşturuldu (E).



Resim 7. Radius proksimali ve distali defekt korunarak 15 mm lik 6 delikli mini plak ve 2 adet vida(bir adet proksimale bir adet distale olacak şekilde) yardımıyla fikse edildi (A). Defekt antibiyotiksiz PMMA kemik çimentosu ile dolduruldu (B). Grup II ve Grup IV e hazırlanan CGF membran çimento üzerine örtüldü (Beyaz ok örtülen membranı göstermektedir.)(C). 3. ve 6. haftalarda çimentonun üzerinde oluşmuş membran zarar verilmeden eksize edildi (D).



Resim 8. Cerrahi işlem sonrası postop grafi

3.3 Histopatolojik Değerlendirme

Tavşanlara ait yaklaşık 2x0,5 cm boyutlarında membran doku örnekleri 1 gün boyunca %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde fiksasyonu takiben dokular etanol dehidrasyonu (sırasıyla %50, %75, %96 ve %100) ve ksilen şeffaflandırma aşamalarından sonra parafine gömülmüştür. Parafin gömülü dokulardan 4 mikronluk kesitler alınarak doku kesitleri Hematoksilen&Eozin (H&E) ve Elastik von gieson(EVG) ile boyanarak incelenmiştir. Histopatolojik inceleme OLYMPUS marka, BX51TF model x4, x10, x20, x40' lık objektiflerde değerlendirilmiştir. H&E boyalı kesitlerde membranın kalınlık ölçümü, EVG boyalı kesitlerde elastik lif varlığı değerlendirilmiştir.

3.3.1 Elastik Fiber

Elastik fiberler ekstraselüler matriksi oluşturan önemli makromoleküllerdendir. Elastik fiberler elastin iç kısmın üzerine sarılan fibrillin zengin mikrofibrillerden oluşur. Kan damarları ve cilt gibi bağ dokusu içeren

bölgelerde elastikiyet ve dayanıklılıktan sorumludur [112].

3.4 İmmünohistokimyasal İnceleme

Membranlarda hücre proliferasyonu, inflamasyon, vaskülarizasyon ve kök hücre varlığı değerlendirilmesi amacıyla sırasıyla Ki-67 ve MAC387, CD31 ve STRO-1 belirteçleri kullanılmıştır. Kullanılan antikorların klon isimleri, dilüsyonları ve ticari kaynakları Tablo 2’de belirtilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Antikorların İsimleri, Dilüsyonları ve Ticari Kaynakları

ANTİKOR	KLON	DİLÜSYON ORANI	TİCARİ KAYNAK
CD31(PECAM-1)	Mouse monoklonal (C31.7)	1:800	Abcam(ab187376)
Ki-67	Poliklonal	1:800	Abcam(ab15580)
MAC387	Mouse monoklonal (MAC387)	1:400	Abcam(ab80084)
STRO-1	Mouse monoklonal (STRO-1)	1:400	Abcam(ab214086)

Leica Bond Max DAB Detection kiti kullanılarak, uygun pozitif kontroller eşliğinde, CD31, MAC387 ve STRO-1 monoklonal ve Ki-67 poliklonal antikorları kullanılarak Leica Bond Max immünohistokimyasal otomatik boyama makinesi ile boyama yapılmıştır.

CD31, MAC387 ve STRO-1 ile sitoplazmik ve/veya membranöz; Ki-67 ile nükleer boyanma pozitif kabul edilmiştir.

Eksternal pozitif kontroller kullanılmıştır. Eksternal pozitif kontrol olarak insan dokusunda boyanmada zemin boyanması izlenmezken çalışmamıza ait tavşan dokularında zemin boyanması saptanmıştır.

3.4.1 Proliferasyon

Ki67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteinidir. Esas olarak G₁, S, M ve G₂ fazında görülür. G₀ fazında ise yoktur. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik index ve tümör derecelendirmesinde sıklıkla kullanılır [113].

3.4.2 Vaskülarizasyon

Platelet Endotelial Adezyon molekülü/PECAM-1 (CD31), 130 kDa olup immünoglobulin süperfamilyasına aittir ve normal koşullarda damar endotelinde yüksek düzeyde bulunmaktadır. Bu molekül, diğer proteinlerin endotele yanasmasına ve onların kenetlenmesine yardımcı olur.

PECAM-1 normal olarak endotel hücreleri, trombositler, makrofajlar, granülositler, lenfositler (T, B ve NK), megakaryosit ve osteoblastlarda bulunur[114].İmmünohistokimyasal olarak öncelikle doku kesitlerinde endotelial hücrelerin varlığını göstermekte kullanılır [115].

3.4.3 İnflamasyon

MAC387 12kD alfa zinciri ve 14kD beta zincirinden oluşan bir intrasitoplazmik antijen olan L1 veya Calprotectin molekülünü tanır. Dokularda monosit, makrofaj ve granülositlerde eksprese olur [116].

3.4.4 STRO-1

STRO-1 bilinen en iyi mezenkimal kök hücre markerlarından biri olarak tespit edilmiştir [117].

3.5 İstatiksel Yöntem

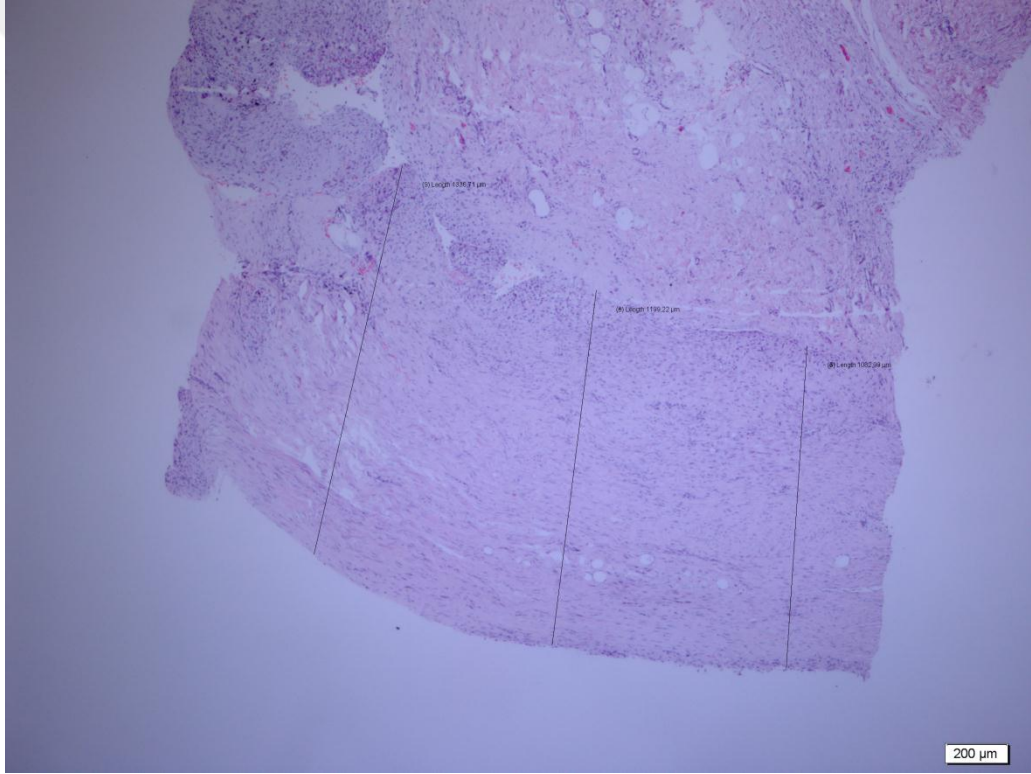
İstatistiksel analizler SPSS versiyon 15 yazılımı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı analizler ortalama, standart sapma, ortanca, en küçük ve en büyük değerler kullanılarak verildi. Sayısal değişkenler denek sayısının azlığı nedeniyle parametrik test koşullarını sağlamadığı için parametrik test yerine non parametrik karşılıkları kullanıldı. Bu doğrultuda sayısal değişkenler için birbirinden bağımsız iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U Testi kullanıldı. p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.



4. SONUÇLAR

4.1 Membran Kalınlığı

Bu çalışmada doku örnekleri membran kalınlığı açısından 40x büyütmede incelenmiş ve mikroskopta birbiriyle çakışmayan 3 bölgede ölçüm yapılmıştır (Resim 9). Membran kalınlığı ortalaması Grup 1 de 802,83 μm ($\pm 264,063$), Grup 2 de 1404,83 μm ($\pm 723,859$), Grup 3 de 497 μm ($\pm 170,250$), Grup 4 de 1072 μm ($\pm 116,241$) olarak hesaplanmıştır (Tablo 3).

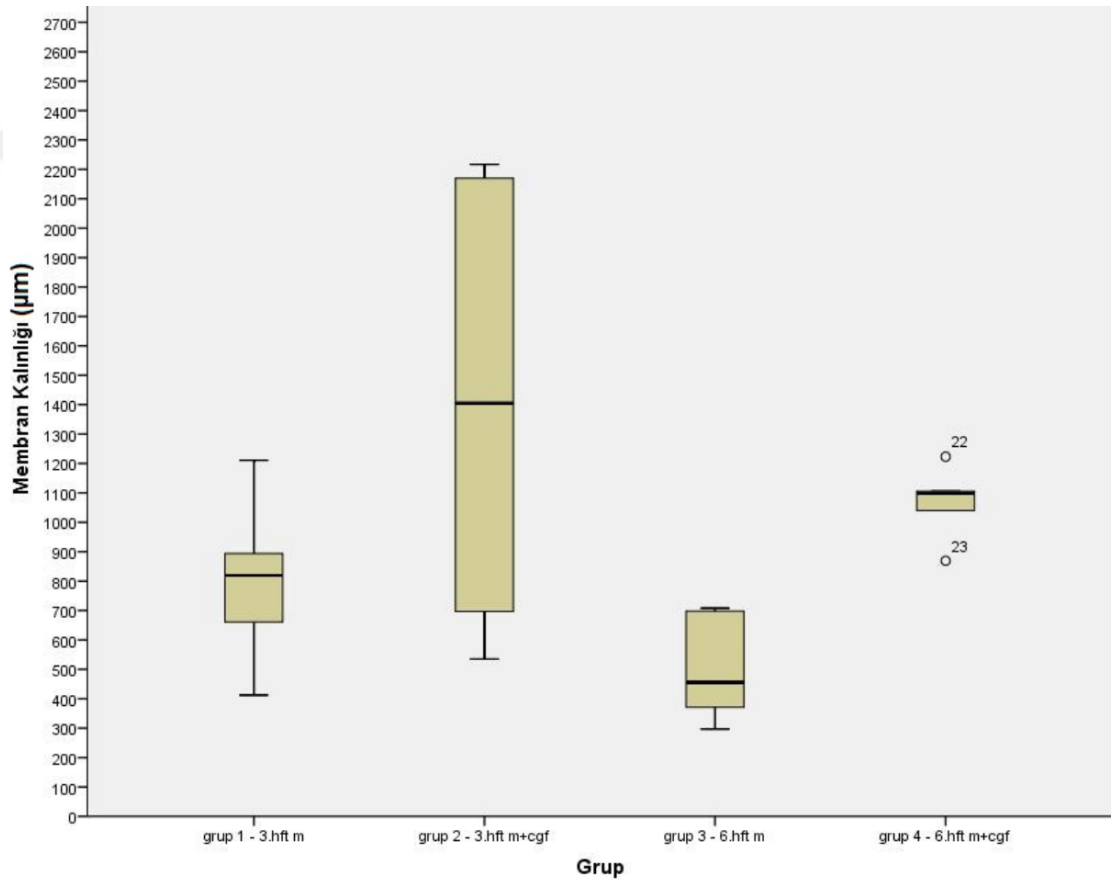


Resim 9. Membran kalınlığının değerlendirilmesi

Tablo 3. Membran kalınlığının gruplara göre dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup4
Ortalama(±SD)	802,83(±264,063)	1404,83(±723,859)	497(±170,250)	1072 (±116,2)
Min.-Max.	412-1211	535-2217	297-708	896-1223

Grafik 1. Gruplara göre membran kalınlıkları



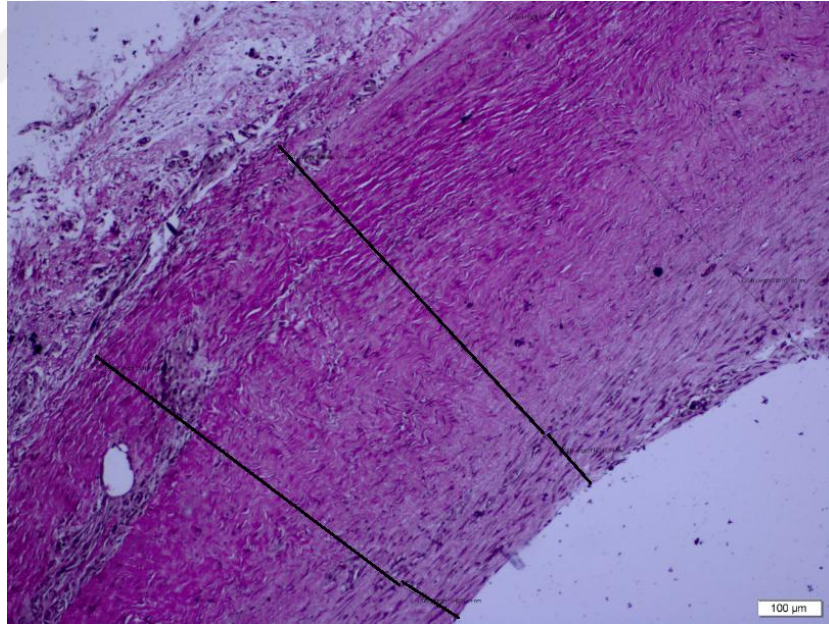
Membran kalınlığı Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,055$). Aynı şekilde Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,423$). Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında da anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,2$). Fakat Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında Grup 4 te membran kalınlığı istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde daha kalın bulunmuştur ($p=0,004$). (Tablo 4)

Tablo 4. Grupların birbirleri arasında p değerlerinin karşılaştırılması

	Grup 2	Grup 3
Grup 1	0,2	0.055
Grup 4	0,423	0,004

4.2 Elastik Fiber Oranı

Bu çalışmada doku örnekleri Elastik Fiber oranı açısından EVG boyası ile boyanıp, 40x büyütmede incelenmiş ve mikroskopta birbiriyle çakışmayan 3 bölgede ölçüm yapılmıştır. EVG boyanan ve boyanmayan bölgeler ölçülüp tüm membranın EVG boyanan bölgeye oranı değerlendirilmiştir (Resim 10). Elastik Fiber Oranı Grup 1 de %63,667 ($\pm 19,0543$), Grup 2 de %87 ($\pm 7,3756$), Grup 3 de %84,667 ($\pm 9,0480$), Grup 4 de %90,500 ($\pm 3,4496$) olarak hesaplanmıştır (Tablo 5)

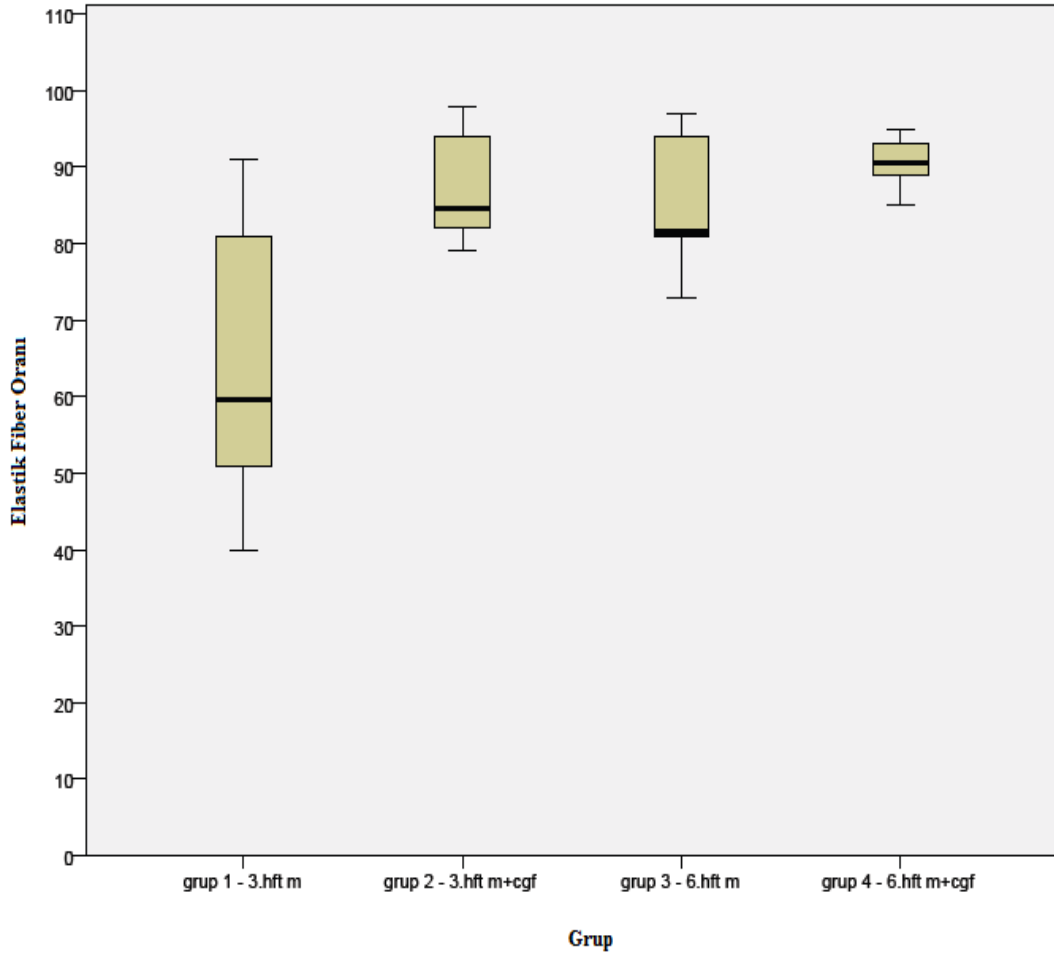


Resim 10. Elastik Fiberlerin Değerlendirilmesi

Tablo 5. Elastik Fiber oranının gruplara göre dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Ortalama($\pm$SD)	63,667 ($\pm$ 19,0543)	87 ($\pm$ 7,3756)	84,667 ($\pm$ 9,0480)	90,500 ($\pm$ 3,4496)
Min.-max.	40-91	79-98	73-97	85-95

Grafik 2. Gruplara göre Elastik Fiber Oranı



Elastik Fiber Oranı Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında Grup 3 te daha fazla olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p=0,053$). Aynı şekilde Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında da istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,297$). Fakat Grup 1 ile Grup 2 karşılaştırıldığında Grup 2 de elastik fiber oranı anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunurken ($p=0,037$), Grup 3

ve Grup 4 karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p=0,261). (Tablo 6)

Tablo 6. Grupların birbirleri arasında p değerlerinin karşılaştırılması

	Grup 2	Grup 3
Grup 1	0.037	0.053
Grup 4	0,297	0,261

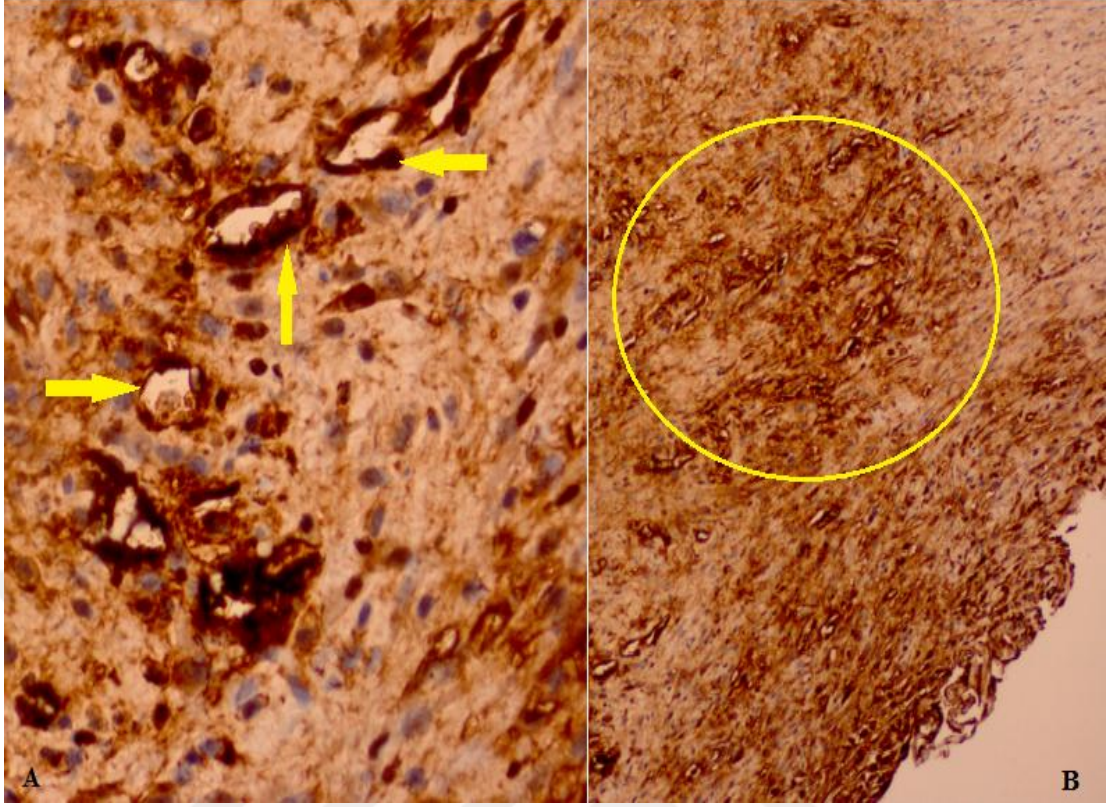
4.3 Vaskülarizasyon

Bu çalışmada doku örnekleri vaskülarizasyon açısından 100x büyütmede incelenmiş ve mikroskopta birbiriyle çakışmayan 3 bölgede CD31 (+) boyanan hücre sayımı yapılmıştır (Resim 11). CD 31 (+) boyanan hücre sayısı ortalaması Grup 1 de 21 ($\pm 6,899$), Grup 2 de 36,17 ($\pm 19,385$), Grup 3 de 8,83 ($\pm 3,545$), Grup 4 de 36 ($\pm 9,571$) olarak bulunmuştur (Tablo 7)

Tablo 7. CD31 (+) boyanan hücre sayılarının gruplara göre dağılımı

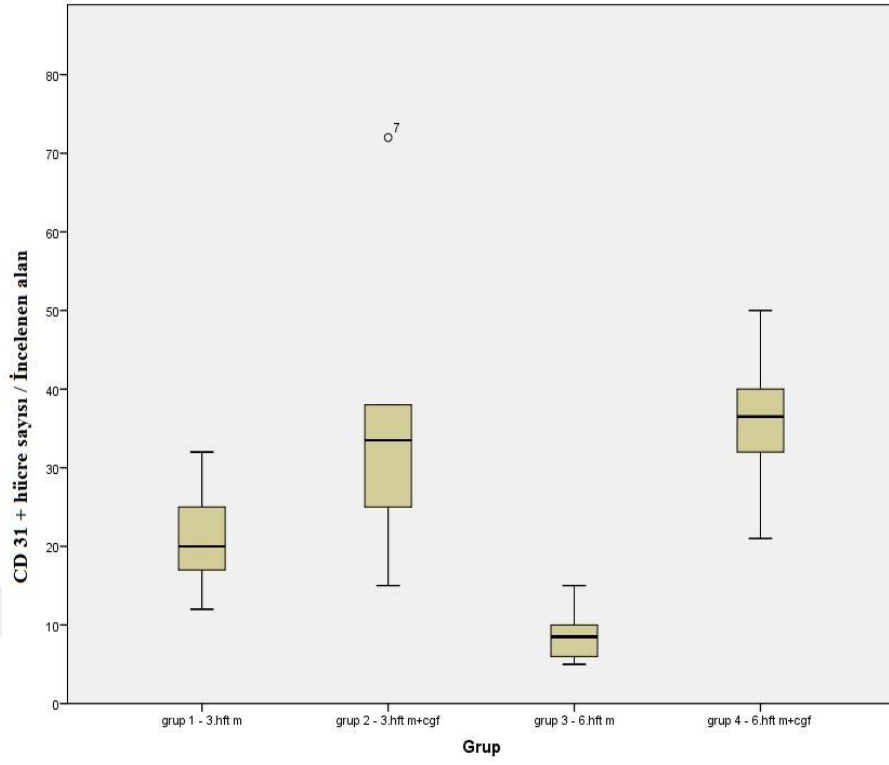
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup4
Ortalama($\pm$SD)	21 ($\pm 6,899$)	36,17 ($\pm 19,385$)	8,83 ($\pm 3,545$)	36 ($\pm 9,571$)
Min.-max.	12-32	15-72	5-15	21-50

Vaskülarizasyon, Grup 1 ile Grup 3 karşılaştırıldığında Grup 1 de istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,006). Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır (p=0,573). Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında da anlamlı fark bulunamamıştır (p=0,077). Grup 3 ve Grup 4 karşılaştırıldığında ise Grup 4 te istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004). (Tablo 8)



Resim 11. Vaskülarizasyonun değerlendirilmesi. Membranın 400x büyütülmüş hali (sarı oklar CD31 + hücreleri göstermektedir)(A). Membranın 100x büyütülmüş hali (Sarı daire içindeki alan yoğun vaskülarizasyonu göstermektedir)(B).

Grafik 3. Gruplara göre CD31 (+) boyanan hücre sayısı

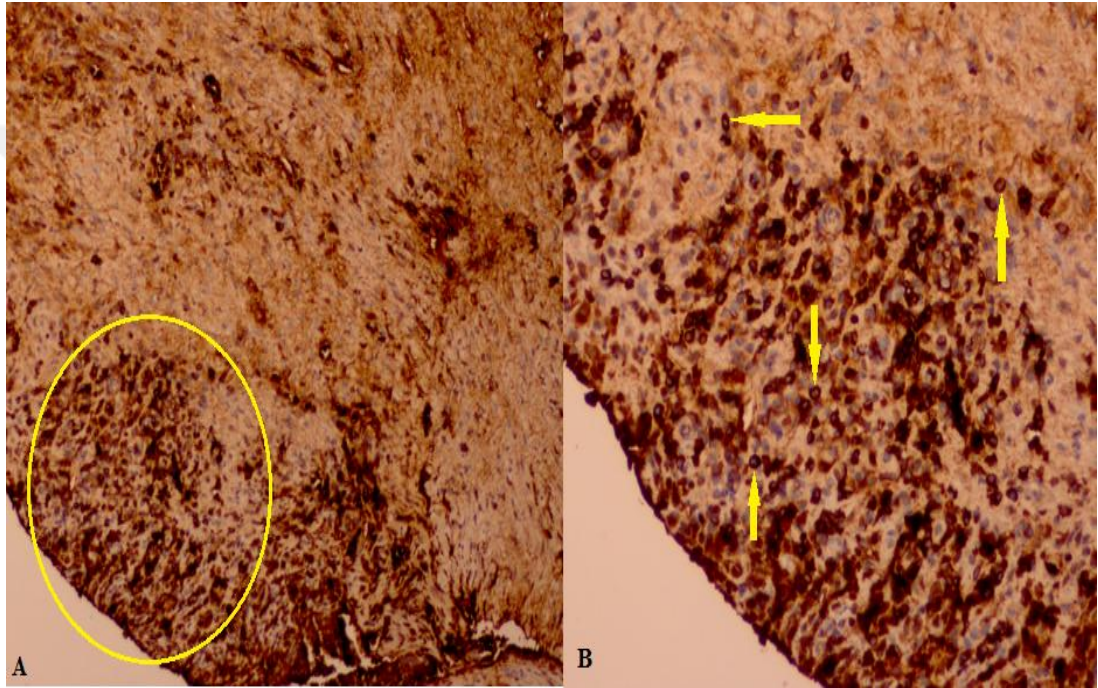


Tablo 8. Grupların birbirleri arasında p değerlerinin karşılaştırılması

	Grup 2	Grup 3
Grup 1	0,077	0,006
Grup 4	0,573	0,004

4.4 İnflamasyon

Bu çalışmada doku örnekleri inflamasyon açısından 100x büyütmede incelenmiş ve mikroskopta birbiriyle çakışmayan 3 bölgede MAC387 (+) boyanan hücre sayımı yapılmıştır (Resim 12). MAC387 (+) boyanan hücre sayısı ortalaması Grup 1 de 14,50 ($\pm 3,564$), Grup 2 de 30,67 ($\pm 5,989$), Grup 3 de 4,83 ($\pm 1,835$), Grup 4 de 48,50 ($\pm 3,082$) olarak bulunmuştur (Tablo 9).

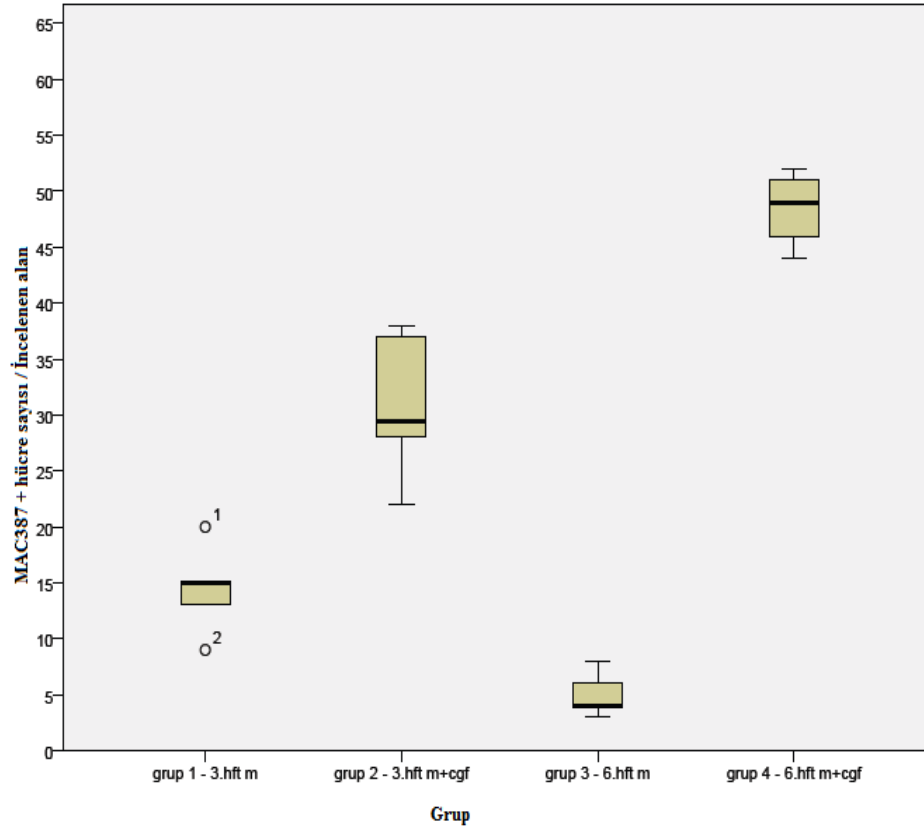


Resim 12. İnflamasyonun değerlendirilmesi. Membranın 100x büyütülmüş hali (Sarı daire içindeki alan yoğun inflamasyonu göstermektedir)(A). Membranın 200x büyütülmüş hali (sarı oklar MAC387 + hücreleri göstermektedir)(B)

Tablo 9. MAC387 (+) boyanan hücre sayılarının gruplara göre dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup4
Ortalama($\pm$SD)	14,50($\pm 3,564$)	30,67 ($\pm 5,989$)	4,83 ($\pm 1,835$)	48,50($\pm 3,082$)
Min.-max.	9-20	22-38	3-8	44-52

Grafik 4. Gruplara göre MAC387 (+) boyanan hücre sayısı



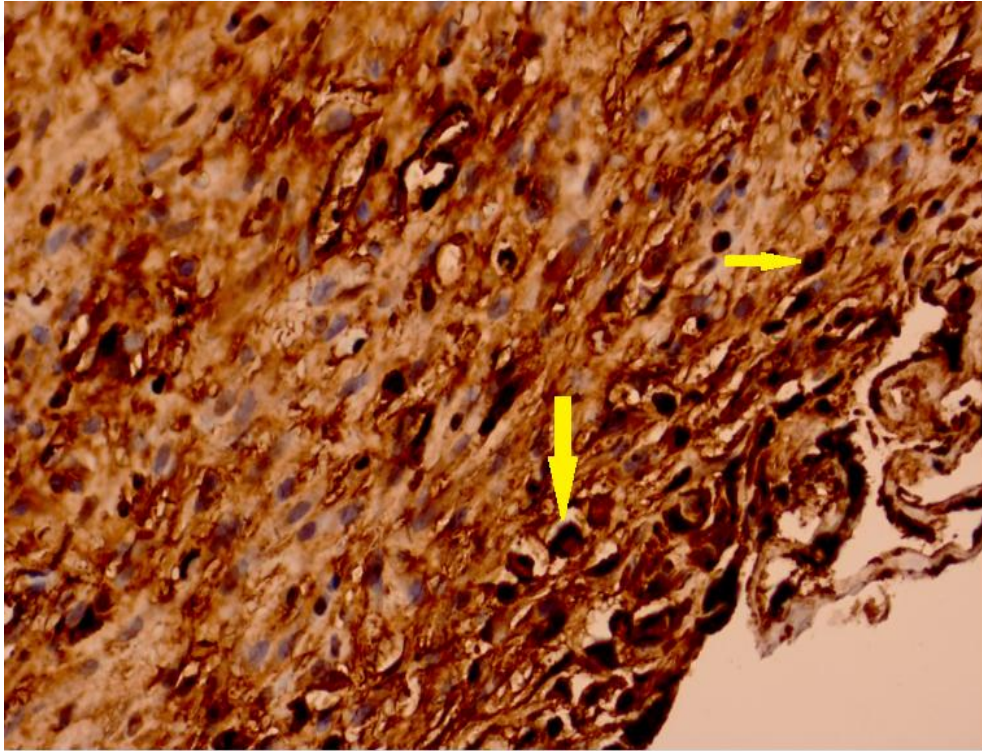
İnflamasyon, Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında Grup 1 de istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,003$). Aynı şekilde Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında Grup 4 te istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,004$). Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında da Grup 2 de istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,004$). Grup 3 ve Grup 4 karşılaştırıldığında da Grup 4 te istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,004$). (Tablo 10)

Tablo 10. Grupların birbirleri arasında p değerlerinin karşılaştırılması

	Grup 2	Grup 3
Grup 1	0,004	0,003
Grup 4	0,004	0,004

4.5 Proliferasyon

Bu çalışmada doku örnekleri proliferasyon açısından 400x büyütmede incelenmiş ve mikroskopta birbiriyle çakışmayan 3 bölgede Ki67 (+) boyanan hücre sayısının total hücreye oranı hesaplanarak dokunun proliferasyon indeksi elde edilmiştir (Resim 13). Proliferasyon indeksi ortalaması Grup 1 de % 4,17 ($\pm 1,722$), Grup 2 de % 6 ($\pm 1,265$), Grup 3 de % 2,83 ($\pm 1,329$), Grup 4 de % 6 ($\pm 0,894$) olarak bulunmuştur (Tablo-11).

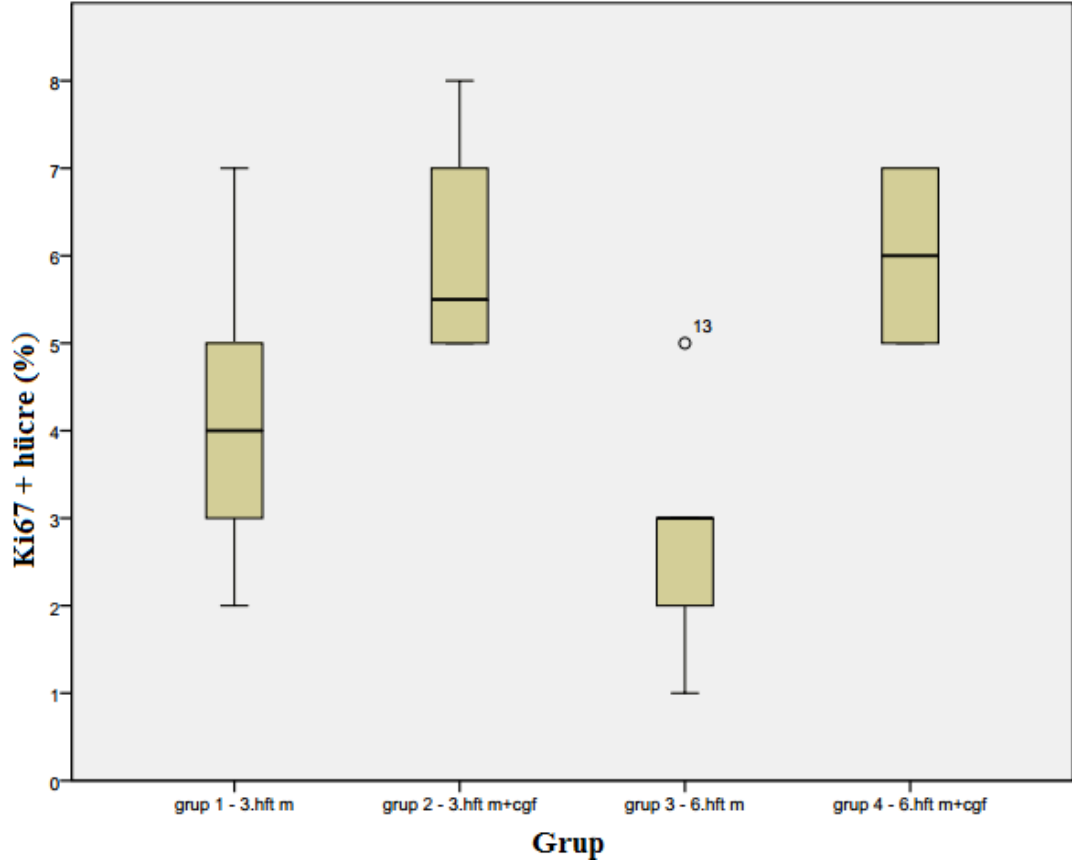


Resim 13. Proliferasyonun değerlendirilmesi. Membranın 400x büyütülmüş hali (Sarı oklar Ki67 + boyanan hücreleri göstermektedir).

Tablo 11. Ki67 proliferasyon indeksinin gruplara göre dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup4
Ortalama(±SD)	4,17 (±1,722)	6 (±1,265)	2,83 (±1,329)	6 (±0,894)
Min.-max.	2-7	5-8	1-5	5-7

Grafik 5. Gruplara göre Ki67 (+) hücre oranı



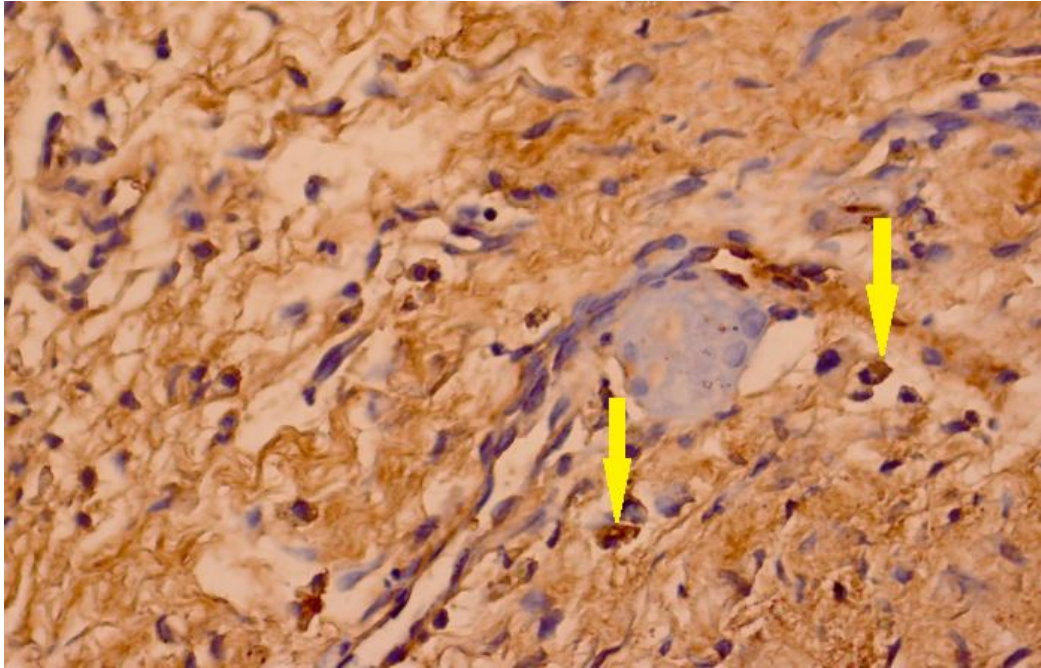
Proliferasyon, Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır($p=0,164$). Aynı şekilde Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır($p=0,866$). Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında ise Grup 2 de istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,05$). Aynı şekilde Grup 3 ve Grup 4 karşılaştırıldığında Grup 4 te istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,006$). (Tablo 12)

Tablo 12. Grupların birbirleri arasında p değerlerinin karşılaştırılması

	Grup 2	Grup 3
Grup 1	0,05	0,164
Grup 4	0,866	0,006

4.6 Kök Hücre Varlığı

Bu çalışmada doku örnekleri kök hücre varlığı açısından 400x büyütmede incelenmiş ve mikroskopta birbiriyle çakışmayan 3 bölgede STRO 1 (+) boyanan hücre sayımı yapılmıştır (Resim 14). STRO 1 (+) boyanan hücre sayısı ortalaması Grup 1 de 0,33 ($\pm 0,816$), Grup 2 de 1,83 ($\pm 1,329$) bulunurken, Grup 3 ve Grup 4 de STRO 1 (+) hücreye rastlanmamıştır. (Tablo 13)



Resim 14. Kök hücre varlığının değerlendirilmesi. Membranın 400x büyütülmüş hali (Sarı oklar STRO 1 + boyanan hücreleri göstermektedir).

Tablo 13. STRO 1 (+) boyanan hücre sayılarının gruplara göre dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup4
Ortalama(±SD)	0,33 (±0,816)	1,83 (±1,329)	0	0
Min.-max.	0-2	0-4	0	0

Kök hücre varlığı Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır($p=0,317$). Fakat Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur($p=0,007$). Aynı şekilde Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında da anlamlı fark bulunmuştur($p=0,036$). Fakat Grup 3 ve Grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır($p=1,00$). (Tablo 14)

Tablo 14. Grupların birbirleri arasında p değerlerinin karşılaştırılması

	Grup 2	Grup 3
Grup 1	0,036	0,317
Grup 4	0,007	1,00

5. TARTIŞMA

Uzun kemiklerin geniş diyafiz defektlerinin rekonstrüksiyonu kemik kaybının etiyojisi ne olursa olsun ekstremitte kurtarma için en büyük zorluklardan birisidir. Küçük defektler non-vaskülerize kansellöz kemik greftiyle tedavi edilebilirken, büyük defektler için baska tedavi protokolleri gerekmektedir. Büyük defektlerde sık kullanılan tedaviler, vaskülerize fibula grefti ve ilizarov distraksiyon osteogenezi tekniğidir [1, 2]. Otolog kemik greftlenmesi 5 cm'den büyük defektlerde greftin rezorbsiyon riskinden dolayı tek başına tavsiye edilmemektedir [3, 95]. Masquelet [4, 5, 96], büyük defektlerdeki bu problem için yeni bir teknik tanımlamıştır. 2 aşamalı olan bu tekniğin ilk aşamasında kemik defekti polimetilmetakrilat (PMMA) kemik çimentosu ile doldurulur. Bu kemik çimentosunun, defektin içerisine fibroz doku invazyonunu önleme gibi bir mekanik görevi vardır. Ayrıca yabancı cisim reaksiyonu ile çimentonun üzerinde bir membranın oluşması gibi biyolojik görevi de mevcuttur. Oluşan bu membran kemik greftini revaskülarize edip, greft rezorpsiyonunu önler. İkinci aşamada 6-8 hafta sonra yeni bir cerrahi girişim ile membrana zarar vermeden çimento çıkarılır ve defekt kansellöz kemik grefti ile doldurulur. Oluşan membran, grefti rezorbsiyondan koruyarak kemiğin kaynamasını sağlar [5, 96]. Masquelet tekniği kullanılarak yapılmış birçok klinik çalışma mevcuttur[118-121]. Giannodis ve arkadaşları [122], Masquelet tekniği hakkındaki yayınları değerlendirdiği makalelerinde, sonuçların oldukça tatmin edici ve umut verici olduğunu bildirmişlerdir. Güncel literatür incelememizde Masquelet tekniğine CGF eklenerek oluşan membranın histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendiği bir çalışmaya rastlayamadık.

Konsantre Growth Faktör (CGF) 2006 yılında Sacco tarafından tanımlanan konsantre trombosit yöntemidir. Trombositler yüksek miktarda platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) ve β 2 (TGF- β 2), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), ve insulin-like growth factor (IGF) gibi büyüme faktörlerini ihtiva eder [6]. Bu yöntemde kan antikoagülansız tüpte santrifüje edilir. Fibrinojen, fibrine dönüşmeden orta hatta konsantre hale gelir. Santifüj esnasında tüple temas eden trombositler pıhtılaşma kaskatını başlatır ve konsantre fibrinojen tüpün ortasında fibrin pıhtıya dönüşür. Trombositler ve büyüme faktörleri büyük miktarda bu fibrin

pıhtı içinde hapsolur. CGF'nin kemik defektlerinde kemik greftleri ile, ayrıca dental cerrahide maksiller sinüs augmentasyonu için kullanımı mevcuttur [108]. Kim ve arkadaşlarının [111], tavşan kalvariasında defekt oluşturarak yaptığı çalışmada, defekte CGF eklenen grupta kontrol grubuna oranla daha fazla yeni kemik formasyonu olduğunu bildirmiştir.

Biz çalışmamızda Masquelet tekniğe CGF ekleyerek kemik çimentosunun üzerinde yabancı cisim reaksiyonu ile oluşan membranı daha kaliteli hale getirebileceğimizi düşündüğümüzden, membrandaki vaskülarizasyonu, inflamasyonu, proliferasyonu, kök hücre varlığını ve oluşan membranın kalınlığını ve membrandaki elastik fiber oranının değerlendirildik.

Yaptığımız çalışmada immunohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz ilk parametre oluşan *membranın vaskülarizasyonudur*. Vaskülarizasyonun değerlendirilmesinde Platelet Endotelyal Adezyon molekülü /PECAM-1 (CD31) (+) boyanan hücreler sayılmıştır. CD31, normal koşullarda damar endotelinde yüksek düzeyde bulunmaktadır ve immünhistokimyasal olarak öncelikle doku kesitlerinde endotelyal hücrelerin varlığını göstermekte kullanılır [115]. 3. haftada sadece Masquelet teknik kullanılan grup (Grup 1) ile 6. haftada sadece Masquelet teknik kullanılan grup (Grup 3) karşılaştırıldığında CD 31 (+) hücre sayısında, 3. haftadan 6. haftaya doğru istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p=0.006$). Fakat Henrich ve arkadaşları [102] yaptıkları çalışmalarında, kemik defektinden aldıkları membranda vaskülarizasyonun 2. haftadan 4. haftaya geçerken arttığını, 4. haftadan 6. haftaya geçerken değişmediğini bildirmişlerdir. 3. haftada Masquelet tekniğe CGF eklenen grup (Grup 2) ile 6. haftada Masquelet tekniğe CGF eklenen grup (Grup 4) karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,573$). Grup 1 ile Grup 2 karşılaştırıldığında CD31 (+) hücre sayısı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p= 0.077$), Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p= 0.04$). Bu sonuçlar ışığında sadece Masquelet tekniği uygulanan kontrol grubunda 3. Haftadan 6. haftaya gelirken vaskülarizasyon azalırken, membrana CGF eklenmesi ile vaskülarizasyonun 6. haftada da hala 3. haftadaki gibi olduğu görülmektedir. Rodella ve arkadaşları [9] yaptıkları çalışmada, CGF nin yüksek konsantrasyonda VEGF içerdiğini bildirmişlerdir. VEGF'nin anjiyogenezi indüklediği ve vaskülogenezin düzenlenmesinde kritik rol oynadığı bilinmektedir [123]. 6. haftada

vaskülarizasyonun hala devam etmesi CGF içerisindeki VEGF ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada immunohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz ikinci parametre oluşan *membranın inflamasyonudur*. Masquelet teknikte membran oluşmasının nedeni PMMA çimentoya bağlı yabancı cisim reaksiyonudur [96]. Yabancı cisim reaksiyonunda dominant hücre tipi monosit/makrofajlardır [99]. Makrofajların yaradaki kolonizasyonunun fibrinin kimyasal ve fiziksel özellikleri tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir [124]. Choukroun ve arkadaşları PRF'nin içindeki fibrin matriksin ve sitokinlerin makrofaj aktivasyonuna pozitif etkisinin olduğunu bildirmişlerdir [125]. Ayrıca Ghanaati ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PRF'nin içindeki nötrofilik granüositlerin makrofaj aktivasyonuna katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir [126]. Çalışmamızda inflamasyonun değerlendirilmesinde immunohistokimyasal olarak MAC387 (+) boyanan hücreleri saydık. MAC387 dokularda monosit, makrofaj ve granüositlerde eksprese olur [116]. Sadece kontrol grubu olan Masquelet tekniğinin uygulandığı Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında MAC387 (+) hücre sayısında, 3. haftadan 6. haftaya doğru istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlenmiştir ($p= 0.03$). Nau ve arkadaşlarının [127] farklı antibiyotik emdirilmiş PMMA çimentoların membran üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, antibiyotiksiz çimento grubunda bizimle aynı şekilde 2. haftadan 6. haftaya geçerken inflamasyonun azaldığını bildirmişlerdir. Grup 1 ile Grup 2 karşılaştırıldığında ise 3. haftada CGF eklenen Grup 2 de MAC387 (+) hücre sayısı Grup 1 e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p= 0.04$). Ayrıca Masquelet tekniğe CGF eklenen Grup 2 ile Grup 4 karşılaştırıldığında ise MAC387 (+) hücre sayısında, 3. haftadan 6. haftaya doğru geçerken istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p= 0.04$). Aynı şekilde 6. haftaya geldiğimizde Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında da CGF eklenen Grup 4'te MAC387 (+) hücre sayısı Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek izlendi ($p= 0.04$). Bu sonuçlara göre membrana CGF eklemenin membrandaki makrofaj sayısını ve inflamasyonu hem 3. hafta hem de 6. hafta da arttırdığı izlenmiştir. Sadece Masquelet tekniği uygulanan grup 1 ve 3'te 3. haftadan 6. haftaya gelirken membranda inflamasyon azalırken CGF eklenen membranda inflamasyonun hala yüksek seyrettiği gözlemlenmiştir. Bu da bize çalışmamızda Choukroun ve arkadaşlarının verilerini destekler şekilde CGF in inflamasyonu ve makrofaj aktivasyonunu arttırdığını göstermektedir.

Çalışmada oluşan *membrandaki proliferasyon*, immunohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz diğer bir parametredir. . Proliferasyon, Ki67 (+) boyanan hücre sayısının total hücreye oranı hesaplanarak dokunun proliferasyon indeksi elde edilmesi ile değerlendirilmiştir. Ki67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteindir. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik index ve tümör derecelendirmesinde sıklıkla kullanılır [113]. Kontrol grubu olan sadece Masquelet tekniğin uygulandığı Grup 1 ile Grup 3 karşılaştırıldığında proliferasyon indeksinde, 3. haftadan 6. haftaya doğru azalma mevcut iken bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.164$). Henrich ve arkadaşları [102] çalışmalarında, kemik defektinden aldıkları membranda proliferasyon indeksini en yüksek 2. haftada bulmuşlar ve 2. haftadan 6. haftaya kadar proliferasyon indeksinin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Masquelet tekniğe CGF eklenen Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında ise proliferasyon indeksi açısından, 3. haftadan 6. haftaya geçerken istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. ($p= 0,866$). Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında ise 3. haftada CGF eklenen Grup 2 nin proliferasyon indeksi Grup 1 e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p= 0.05$). Aynı şekilde 6. haftaya geldiğimizde Grup 3 ve Grup 4 karşılaştırıldığında da CGF eklenen Grup 4 te proliferasyon indeksi Grup 3 e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p=0.06$). Bu sonuçlar ışığında membrana CGF eklemenin membrandaki proliferasyonu hem 3. haftada hem de 6. haftada arttırdığı görülmektedir. Bu da bize proliferasyon indeksinin CGF eklenen gruplarda yüksek olmasının artmış makrofaj proliferasyonuna bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada oluşan *membrandaki kök hücre varlığı*, immunohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz diğer bir parametredir. Kök hücre varlığı, membranda STRO-1 (+) hücre sayımı yapılarak değerlendirilmiştir. STRO-1 bilinen en iyi mezenkimal kök hücre markerlarından biri olarak tesbit edilmiştir [117]. STRO-1 (+) hücrelerin in vitro osteoblastlara farklılaşabileceği bildirilmiştir [128]. Henrich ve arkadaşları [102] çalışmalarında, Masquelet teknikte oluşan membrandaki STRO-1 (+) hücrelere uygun kemotaktik sinyal gelirse bu hücrelerin membrandan defekt alanına geçerek kırık iyileşmesini hızlandırabileceğini bildirmiştir. Rodella ve arkadaşları ise, çalışmalarında CGF in kök hücre içerdiğini bildirmişlerdir [9]. Çalışmamızda STRO-1 (+) hücre nadir olarak görülmüştür. 3. haftada CGF eklenen

grup (Grup 2) sadece Masquelet teknik uygulanan grup (Grup 1) ile karşılaştırıldığında STRO-1 (+) hücre sayısı Grup 2 de istatistiksel olarak anlamlı oranda daha fazla bulunmuştur ($p=0,036$). 6. haftaya geldiğimizde ise her iki grupta STRO-1 (+) hücre bulunamamıştır. Nau ve arkadaşları da çalışmalarında bizim çalışmamıza benzer şekilde STRO-1 (+) hücrenin nadir olarak bulunduğunu ve özellikle 2. haftada mevcut olduğunu bildirmişlerdir.

Histopatolojik olarak değerlendirdiğimiz ilk parametre *membranın kalınlığıdır*. 3. hafta sadece Masquelet teknik kullanılan grup ile (Grup 1) Masquelet tekniğe CGF eklenen grup (Grup 2) karşılaştırıldığında; Grup 2’de membran kalınlığı daha fazla olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.2$). Ancak 6. haftada sadece Masquelet teknik kullanılan grup ile (Grup 3) Masquelet tekniğe CGF eklenen grup (Grup 4) membran kalınlıkları açısından karşılaştırıldığında CGF eklenen Grup 4’te membran kalınlığının, Grup 3’e oranla daha kalın olduğu tespit edilmiştir ve bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p=0.004$). Bu sonuçlara göre özellikle 6. haftada sadece Masquelet teknik uygulanan kontrol grubuna kıyasla Masquelet tekniğine CGF eklenmesi ile membranın daha kalın olduğu tespit edilmiştir. Güncel literatürde, membranın kalınlığının kemik iyileşmesine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamasına rağmen, Taylor ve arkadaşları [129], farklı kemiklerdeki segmenter defektlerin tedavisinde Masquelet teknik uygulanan 69 hastadaki membran kalınlığının en yüksek 6. haftada oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Sadece Masquet teknik uygulanan Grup 1 ile Grup 3 ve Masquelet tekniğe CGF eklenen Grup 2 ile Grup 4 karşılaştırıldığında 3. hafta’dan 6. hafta’ya doğru membran kalınlığı azalmış olarak ölçülse de bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Histopatolojik olarak değerlendirdiğimiz diğer parametre ise *membrandaki elastik fiber oranıdır*. Elastik fiberler kan damarları ve cilt gibi bağ dokusu içeren bölgelerde elastikiyet ve dayanıklılıktan sorumludur [112]. Elastik fiberlerin fibroblastlar tarafından yapıldığı bilinmektedir [130]. Fibrin, PDGF ve TGF- β ’nın fibroblast proliferasyonu ve fibroblastların yara yerine göçünü düzenleyen başlıca moleküller olduğu bildirilmiştir [131]. Rodella ve arkadaşları CGF’in yüksek miktarda TGF- β içerdiğini göstermişlerdir [9]. Çalışmamızda elastik fiber oranını belirlemek için membranda EVG boyanan bölgeler ölçülüp, tüm membranın/ EVG boyanan bölgeye oranı değerlendirilmiştir. Sadece Masquet teknik uygulanan kontrol

grupları olan Grup 1 ile Grup 3 karşılaştırıldığında elastik fiber oranında, 3. haftadan 6. haftaya doğru artış mevcut iken bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.53$). Aynı şekilde Masquelet tekniğe CGF eklenen Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında da elastik fiber oranında istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.297$). 3. haftadaki Grup 1 ile Grup 2'yi karşılaştırdığımızda ise CGF eklenen Grup 2 de elastik fiber oranının Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışı tespit edilmiştir ($p=0.037$). 3. haftada CGF eklenen gruptaki elastik fiber oranı yüksekliğinin CGF'in fibroblast aktivasyonuna neden olup elastik fiber sentezini arttırması nedeniyle olduğunu düşünmekteyiz. 6. haftaya geldiğimizde ise elastik fiber oranı açısından sadece Masquelet teknik uygulanan grup (Grup 3) ile Masquelet tekniğe CGF eklenen grup (Grup 4), karşılaştırıldığında arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p= 0.261$).

Çalışmamızın limitasyonları, gruplarda kullanılan denek sayısının az olması ve kemik çimentosunun yabancı cisim reaksiyonu ile üzerinde. oluşan membran kalitesini incelemek için başka immunohistokimyasal testlerin de kullanılabilecek olmasıdır.

Sonuç olarak; Masquelet tekniğe CGF eklenmesi ile 3. haftada inflamasyonun, proliferasyonun, kök hücre varlığının ve elastik fiber oranının sadece Masquelet teknik uygulanan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu, 6. haftada ise inflamasyonun, vaskülarizasyonun, proliferasyonun ve membran kalınlığının sadece Masquelet teknik uygulanan kontrol grubuna göre CGF eklenen grupta istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında uzun kemiklerin geniş diyafiz defektlerinin cerrahi tedavisinde kullanılan Masquelet tekniğe CGF eklemesinin oluşan membrana histokimyasal ve immunohistokimyasal olumlu katkısından dolayı önerilebileceği görüşündeyiz.

6. KAYNAKÇA

1. Weiland, A.J., *Current concepts review: vascularized free bone transplants*. JBJS, 1981. **63**(1): p. 166-169.
2. Cattaneo, R., M. Catagni, and E.E. Johnson, *The treatment of infected nonunions and segmental defects of the tibia by the methods of Ilizarov*. Clinical orthopaedics and related research, 1992. **280**: p. 143-152.
3. Weiland, A.J., T.W. Phillips, and M.A. Randolph, *Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts*. Plastic and reconstructive surgery, 1984. **74**(3): p. 368-379.
4. Klaue, K., U. Knothe, and A. Masquelet, *Effet biologique des membranes à corps étranger induites in situ sur la consolidation des greffes d'os spongieux*. Rev Chir Orthop Suppl, 1995. **70**: p. 109-110.
5. Masquelet, A., et al. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. in *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2000.
6. Intini, G., *The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy*. Biomaterials, 2009. **30**(28): p. 4956-4966.
7. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies*. Growth Factors, 2009. **27**(1): p. 63-69.
8. Choukroun, J., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **101**(3): p. e56-e60.
9. Rodella, L.F., et al., *Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction*. Microscopy research and technique, 2011. **74**(8): p. 772-777.

10. Mescher, A., *Bone*, in *Junqueira's basic histology : text & atlas*, A. Mescher, Editor. 2010, McGraw-Hill Medical ;McGraw-Hill distributor: New York London. p. xi, 467 p.
11. Ducky, P., et al., *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice*. 1996.
12. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Bone*, in *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology* M.H. Ross and W. Pawlina, Editors. 2011, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia. p. xviii, 974 p.
13. McKibbin, B. *The biology of fracture healing in long bones*. in *J Bone Joint Surg [Br]*. 1978. Citeseer.
14. Gerstenfeld, L.C., et al., *Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006. **54**(11): p. 1215-1228.
15. Green, E., J. Lubahn, and J. Evans, *Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture*. *Journal of surgical orthopaedic advances*, 2004. **14**(2): p. 64-72.
16. Pape, H.-C., et al., *Effects of intramedullary femoral fracture fixation: what is the impact of experimental studies in regards to the clinical knowledge?* *Shock*, 2002. **18**(4): p. 291-300.
17. Perren, S.M., *Evolution of the internal fixation of long bone fractures*. *Bone & Joint Journal*, 2002. **84**(8): p. 1093-1110.
18. Kolar, P., et al., *The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing*. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2010. **16**(4): p. 427-434.
19. Mark, H., et al., *Microvascular invasion during endochondral ossification in experimental fractures in rats*. *Bone*, 2004. **35**(2): p. 535-542.
20. Gerstenfeld, L.C., et al., *Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation*. *Journal of cellular biochemistry*, 2003. **88**(5): p. 873-884.
21. Kon, T., et al., *Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of NF- κ B Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001. **16**(6): p. 1004-1014.

22. Cho, H.H., et al., *Overexpression of CXCR4 increases migration and proliferation of human adipose tissue stromal cells*. Stem cells and development, 2006. **15**(6): p. 853-864.
23. Balga, R., et al., *Tumor necrosis factor-alpha: alternative role as an inhibitor of osteoclast formation in vitro*. Bone, 2006. **39**(2): p. 325-335.
24. Lee, S.-K. and J. Lorenzo, *Cytokines regulating osteoclast formation and function*. Current opinion in rheumatology, 2006. **18**(4): p. 411-418.
25. Sfeir, C., et al., *Fracture repair*, in *Bone Regeneration and Repair*. 2005, Springer. p. 21-44.
26. Yang, X., et al., *Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice*. Bone, 2007. **41**(6): p. 928-936.
27. Granero-Moltó, F., et al., *Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing*. Stem cells, 2009. **27**(8): p. 1887-1898.
28. Kitaori, T., et al., *Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model*. Arthritis & Rheumatism, 2009. **60**(3): p. 813-823.
29. Bais, M.V., et al., *BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells*. Bone, 2009. **45**(2): p. 254-266.
30. Rahn, B.A., *Bone healing: histologic and physiologic concepts*. Bone in clinical orthopaedics: a study in comparative osteology. Philadelphia etc: WB Saunders, 1982: p. 335-86.
31. Dimitriou, R., E. Tsiridis, and P.V. Giannoudis, *Current concepts of molecular aspects of bone healing*. Injury, 2005. **36**(12): p. 1392-1404.
32. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clinical orthopaedics and related research, 1998. **355**: p. S7-S21.
33. Cho, T.J., L.C. Gerstenfeld, and T.A. Einhorn, *Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing*. Journal of Bone and Mineral Research, 2002. **17**(3): p. 513-520.
34. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair*. Injury, 2009. **40**: p. S4-S7.

35. Tsuji, K., et al., *BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing*. Nature genetics, 2006. **38**(12): p. 1424-1429.
36. Keramaris, N., et al., *Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF*. Injury, 2008. **39**: p. S45-S57.
37. Ai-Aql, Z., et al., *Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis*. Journal of dental research, 2008. **87**(2): p. 107-118.
38. Kanczler, J. and R. Oreffo, *Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone*. Eur Cell Mater, 2008. **15**(2): p. 100-114.
39. Breur, G., et al., *Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates*. Journal of Orthopaedic Research, 1991. **9**(3): p. 348-359.
40. Barnes, G.L., et al., *Growth factor regulation of fracture repair*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(11): p. 1805-1815.
41. Ketenjian, A.Y. and C. Arsenis, *Morphological and biochemical studies during differentiation and calcification of fracture callus cartilage*. Clinical orthopaedics and related research, 1975. **107**: p. 266-273.
42. Wendeborg, B., *Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85*. Acta Orthopaedica Scandinavica, 1961. **32**(sup52): p. 3-81.
43. Praemer, A., et al., *Musculoskeletal conditions in the United States*. 1992.
44. Browner, B.D., *Skeletal trauma: basic science, management, and reconstruction*. Vol. 1. 2009: Elsevier Health Sciences.
45. Mandt, P.R. and D.H. Gershuni, *Treatment of nonunion of fractures in the epiphyseal-metaphyseal region of long bones*. Journal of orthopaedic trauma, 1987. **1**(2): p. 141-151.
46. Haverstock, B.D. and V.J. Mandracchia, *Cigarette smoking and bone healing: implications in foot and ankle surgery*. The journal of foot and ankle surgery, 1998. **37**(1): p. 69-74.
47. Chatziyiannakis, A., et al., *Nonunion of tibial fractures treated with external fixation. Contributing factors studied in 71 fractures*. Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum, 1997. **275**: p. 77-79.

48. Keating, J., J. Christie, and M. McQueen, *Exchange intramedullary nailing. Its use in aseptic tibial nonunion*. Bone & Joint Journal, 1995. **77**(3): p. 407-411.
49. Harley, B.J., et al., *The effect of time to definitive treatment on the rate of nonunion and infection in open fractures*. Journal of orthopaedic trauma, 2002. **16**(7): p. 484-490.
50. Schenk, R. and H. Willenegger, *Aur histologie der primaren knochen-heilung: Modifikationen und grenzen der spaltheilung in abhangigkeit von der defektgrosse*. Unfallheilk, 1977. **80**: p. 155.
51. Daftari, T.K., et al., *Nicotine on the Revascularization of Bone Graft: An Experimental Study in Rabbits*. Spine, 1994. **19**(8): p. 904-911.
52. Riebel, G.D., et al., *The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model*. Spine, 1995. **20**(20): p. 2198-2202.
53. De Vernejoul, M., et al., *Evidence for Defective Osteoblastic Function A Role for Alcohol and Tobacco Consumption in Osteoporosis in Middle-aged Men*. Clinical orthopaedics and related research, 1983. **179**: p. 107-115.
54. Fang, M., et al., *Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells*. Bone, 1991. **12**(4): p. 283-286.
55. Schmitz, M.A., et al., *Effect of smoking on tibial shaft fracture healing*. Clinical orthopaedics and related research, 1999. **365**: p. 184-200.
56. Allen, H.L., A. Wase, and W. Bear, *Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat*. Acta Orthopaedica Scandinavica, 1980. **51**(1-6): p. 595-600.
57. Altman, R.D., et al., *Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats*. Journal of orthopaedic trauma, 1995. **9**(5): p. 392-400.
58. Burd, T., M. Hughes, and J. Anglen, *Heterotopic ossification prophylaxis with indomethacin increases the risk of long-bone nonunion*. Bone & Joint Journal, 2003. **85**(5): p. 700-705.
59. Huo, M.H., et al., *The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats*. Journal of orthopaedic research, 1991. **9**(3): p. 383-390.

60. MORE, R.C., et al., *The effects of two nonsteroidal antiinflammatory drugs on limb swelling, joint stiffness, and bone torsional strength following fracture in a rabbit model*. Clinical orthopaedics and related research, 1989. **247**: p. 306-312.
61. Huddleston, P., et al., *Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture-healing*. J Bone Joint Surg Am, 2000. **82**(2): p. 161-73.
62. Schenk, R., *Histology of fracture repair and non-union*. 1978: Swiss Association for the Study of Internal Fixation.
63. Ruedi, T.P. and W.M. Murphy, *Principles of fracture management*. 2000: Thieme Stuttgart.
64. Panagiotis, M., *Classification of non-union*. Injury, 2005. **36**(4): p. S30-S37.
65. Guarniero, R., et al., *Study of fracture healing in protein malnutrition*. Revista paulista de medicina, 1991. **110**(2): p. 63-68.
66. Jupiter, J.B., D. Ring, and H. Rosen, *The complications and difficulties of management of nonunion in the severely obese*. Journal of orthopaedic trauma, 1995. **9**(5): p. 363-370.
67. Bhattacharyya, T., et al., *The accuracy of computed tomography for the diagnosis of tibial nonunion*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(4): p. 692-697.
68. Costelloe, C.M., et al., *Computed tomography reformation in evaluation of fracture healing with metallic fixation: correlation with clinical outcome*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2008. **65**(6): p. 1421-1424.
69. Schelstraete, K., F. Daneels, and E. Obrie, *Technetium-99m-diphosphonate, gallium-67 and labeled leukocyte scanning techniques in tibial nonunion*. Acta orthopaedica belgica, 1991. **58**: p. 168-172.
70. Polyzois, V.D., et al., *Current concepts in delayed bone union and non-union*. Clinics in podiatric medicine and surgery, 2006. **23**(2): p. 445-453.
71. Friedenberg, Z. and C.T. Brighton, *Bioelectric potentials in bone*. J Bone Joint Surg Am, 1966. **48**(5): p. 915-923.
72. Scott, G. and J. King, *A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of non-union of long bones*. J Bone Joint Surg Am, 1994. **76**(6): p. 820-826.

73. Kristiansen, T.K., et al., *Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study.* J Bone Joint Surg Am, 1997. **79**(7): p. 961-73.
74. Heckman, J.D., et al., *Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound.* The Journal of Bone & Joint Surgery, 1994. **76**(1): p. 26-34.
75. Ohtsuka, H., et al., *Use of antibiotic-impregnated bone cement nail to treat septic nonunion after open tibial fracture.* Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2002. **52**(2): p. 364-366.
76. Qiang, Z. and L. Hang, *Use of antibiotic cement rod to treat intramedullary infection after nailing: preliminary study in 19 patients.* Archives of orthopaedic and trauma surgery, 2007. **127**(10): p. 945-951.
77. Richmond, J., et al., *Nonunions of the distal tibia treated by reamed intramedullary nailing.* Journal of orthopaedic trauma, 2004. **18**(9): p. 603-610.
78. Wu, C.-C., *Retrograde dynamic locked nailing for femoral supracondylar nonunions after plating.* Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2009. **66**(1): p. 195-199.
79. Oh, J.K., et al., *Treatment of femoral and tibial diaphyseal nonunions using reamed intramedullary nailing without bone graft.* Injury, 2008. **39**(8): p. 952-959.
80. Weresh, M.J., et al., *Failure of exchange reamed intramedullary nails for ununited femoral shaft fractures.* Journal of orthopaedic trauma, 2000. **14**(5): p. 335-338.
81. Brinker, M.R. and D.P. O'Connor, *Exchange nailing of ununited fractures.* The Journal of Bone & Joint Surgery, 2007. **89**(1): p. 177-188.
82. Cole, J., *The vascular response of bone to internal fixation.* The science and practice of intramedullary nailing, 2nd edn. Williams and Wilkins, 1996: p. 43-69.
83. Wu, C.-C., *Exchange nailing for aseptic nonunion of femoral shaft: a retrospective cohort study for effect of reaming size.* Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2007. **63**(4): p. 859-865.

84. Papakostidis, C., et al., *Femoral-shaft fractures and nonunions treated with intramedullary nails: the role of dynamisation*. Injury, 2011. **42**(11): p. 1353-1361.
85. Pihlajamäki, H.K., S.T. Salminen, and O.M. Böstman, *The treatment of nonunions following intramedullary nailing of femoral shaft fractures*. Journal of orthopaedic trauma, 2002. **16**(6): p. 394-402.
86. Wu, C. and C.-H. Shih, *Effect of dynamization of a static interlocking nail on fracture healing*. Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie, 1993. **36**(4): p. 302-306.
87. Catagni, M.A., et al., *Distraction osteogenesis in the treatment of stiff hypertrophic nonunions using the Ilizarov apparatus*. Clinical orthopaedics and related research, 1994. **301**: p. 159-163.
88. Kabata, T., et al., *Reconstruction with distraction osteogenesis for juxta-articular nonunions with bone loss*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2005. **58**(6): p. 1213-1222.
89. Kocaoglu, M., et al., *Management of stiff hypertrophic nonunions by distraction osteogenesis: a report of 16 cases*. Journal of orthopaedic trauma, 2003. **17**(8): p. 543-548.
90. Appleton, P., et al., *Distal femoral fractures treated by hinged total knee replacement in elderly patients*. Bone & Joint Journal, 2006. **88**(8): p. 1065-1070.
91. Davila, J., A. Malkani, and J.M. Paiso, *Supracondylar distal femoral nonunions treated with a megaprosthesis in elderly patients: a report of two cases*. Journal of orthopaedic trauma, 2001. **15**(8): p. 574-578.
92. Espiga, X., S.A. Antuña, and A. Ferreres, *Linked total elbow arthroplasty as treatment of distal humerus nonunions in patients older than 70 years*. Acta Orthop Belg, 2011. **77**(3): p. 304-10.
93. CIERNY III, G. and K.E. Zorn, *Segmental Tibia1 Defects Comparing Conventional and Ilizarov Methodologies*. Clinical orthopaedics and related research, 1994. **301**: p. 118-123.
94. Paley, D. and D.C. Maar, *Ilizarov bone transport treatment for tibial defects*. Journal of orthopaedic trauma, 2000. **14**(2): p. 76-85.

95. Hertel, R., et al., *10. Cancellous bone graft for skeletal reconstruction Muscular versus periosteal bed—Preliminary report*. Injury, 1994. **25**: p. SA59-SA70.
96. Pelissier, P., et al., *Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes*. British journal of plastic surgery, 2002. **55**(7): p. 596-598.
97. Masquelet, A.C. and T. Begue, *The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects*. Orthopedic Clinics of North America, 2010. **41**(1): p. 27-37.
98. Klaue, K., et al., *Biological implementation of “in situ” induced autologous foreign body membranes in consolidation of massive cancellous bone grafts*. J Bone Joint Surg Br, 1993. **79**: p. 236.
99. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang. *Foreign body reaction to biomaterials*. in *Seminars in immunology*. 2008. Elsevier.
100. Patel, J., et al., *Foreign body-induced granulation tissue is a source of adult stem cells*. Translational Research, 2010. **155**(4): p. 191-199.
101. VIATEAU, V., et al., *Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model*. Veterinary Surgery, 2006. **35**(5): p. 445-452.
102. Henrich, D., et al., *Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2013.
103. Anitua, E., et al., *Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2008. **84**(2): p. 415-421.
104. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **101**(3): p. e37-e44.
105. Eyrich, D., A. Göpferich, and T. Blunk, *Fibrin in tissue engineering*, in *Tissue Engineering*. 2006, Springer. p. 379-392.
106. Gaßling, V.L., et al., *Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2009. **108**(1): p. 48-55.

107. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **101**(3): p. e45-e50.
108. Sohn, D.-S., et al., *Bone regeneration in the maxillary sinus using an autologous fibrin-rich block with concentrated growth factors alone*. Implant dentistry, 2011. **20**(5): p. 389-395.
109. Kim, J.-M., et al., *Flapless transcrestal sinus augmentation using hydrodynamic piezoelectric internal sinus elevation with autologous concentrated growth factors alone*. Implant dentistry, 2014. **23**(2): p. 168-174.
110. Honda, H., et al., *Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in Rattus norvegicus calvaria defect model*. Journal of Artificial Organs, 2013. **16**(3): p. 305-315.
111. Kim, T.-H., et al., *Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing*. Archives of oral biology, 2014. **59**(5): p. 550-558.
112. Kielty, C.M., M.J. Sherratt, and C.A. Shuttleworth, *Elastic fibres*. Journal of cell science, 2002. **115**(14): p. 2817-2828.
113. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. Journal of cellular physiology, 2000. **182**(3): p. 311-322.
114. Newman, P.J., et al., *PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily*. Science, 1990. **247**(4947): p. 1219.
115. Leong, A.S.-Y.C., Kumarason; Leong, F Joel W-M . Greenwich Medical Media, Ltd..ISBN 84110-100-1., (2003). **Manual of Diagnostic Cytology 2 ed.**) p. p.103.
116. Goebeler, M., et al., *The monoclonal antibody MAC387 detects an epitope on the calcium-binding protein MRP14*. Journal of leukocyte biology, 1994. **55**(2): p. 259-261.
117. Dennis, J.E., et al., *The STRO-1⁺ marrow cell population is multipotential*. Cells Tissues Organs, 2001. **170**(2-3): p. 73-82.
118. Pelissier, P., et al., *Bone reconstruction of the lower extremity: complications and outcomes*. Plastic and reconstructive surgery, 2003. **111**(7): p. 2223-2229.

119. Roche, O., et al., *Treatment of septic nonunion of long bones: preliminary results of a two-stage procedure*. J Bone Joint Surg Br, 2005. **87**(SUPP II): p. 111-112.
120. Stafford, P.R. and B.L. Norris, *Reamer-irrigator-aspirator bone graft and bi Masquelet technique for segmental bone defect nonunions: a review of 25 cases*. Injury, 2010. **41**: p. S72-S77.
121. Apard, T., et al., *Two-stage reconstruction of post-traumatic segmental tibia bone loss with nailing*. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 2010. **96**(5): p. 549-553.
122. Giannoudis, P.V., et al., *Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions*. Injury, 2011. **42**(6): p. 591-598.
123. Ferrara, N., H.-P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nature medicine, 2003. **9**(6): p. 669-676.
124. Lanir, N., et al., *Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration*. The Journal of Immunology, 1988. **140**(7): p. 2340-2349.
125. Choukroun, J., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **101**(3): p. 299-303.
126. Ghanaati, S., et al., *Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells*. Journal of Oral Implantology, 2014. **40**(6): p. 679-689.
127. Nau, C., et al., *Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur*. Injury, 2016. **47**(2): p. 325-334.
128. Gronthos, S., et al., *The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4164-4173.
129. Taylor, B.C., et al., *Treatment of bone loss with the induced membrane technique: techniques and outcomes*. Journal of orthopaedic trauma, 2015. **29**(12): p. 554-557.

130. Mescher, A.L., *Connective Tissue*, in *Junqueira's basic histology : text and atlas*, A.L. Mescher and L.C.U. Junqueira, Editors. 2013, McGraw-Hill Medical ;McGraw-Hill distributor: New York London. p. xi, 544 p.
131. Gray, A.J., et al., *A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts*. *Journal of cell science*, 1993. **104**(2): p. 409-413.

