



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 KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gökhun ARICAN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ahmet ÖZMERİÇ

ANKARA 2018

KABUL ONAY SAYFASI



T.C.S.B.
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi
"Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu"
Karar Defteri

Toplantı No: 0039

26.05.2017

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

SORUMLU ARAŞTIRMACI : Dr.Ahmet ÖZMERİÇ, Tez Çalışması

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

(Dr.Gökhan Arıcan, Dr.Ahmet Özmeriç, Prof.Dr.Kadir Bahadır Alemdaroğlu, Dr.Aysegül Fırat, Dr.Mert Çelik, Dr.Figen Kaymaz, Dr.Hamdi Çelik)

ARAŞTIRMAYI DESTEKLEYEN KURULUŞ(LAR): -

KARAR:

462.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 Laboratuvar'ını kullanılmasına "İZİN" "VERİLMİŞTİR" / "VERİLMEMİŞTİR".

Prof.Dr.Uğur KOÇER

Doç.Dr.Nezih SUNGUR

Doç.Dr.Kemal KİSMET
(Raporör)

Veteriner Hek. Caniz YALÇIN
(Raporör ve Kurul Sekreteri)

Ahmet Zeki GÜLER
(Sivil Toplum Örgütü Üyesi)

Gülen BASEÇMERZ
(Sivil Üye)

TEŞEKKÜR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğinde ihtisas eğitimim süresince; iyiyi, doğruyu ve günceli bulmama yardımcı olan, bizleri devamlı araştırmaya özendiren, cerrahisi ile bana her zaman örnek olan, bilimsellikten ödün vermeyen yaklaşımı ile 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, varlığını, desteğini her zaman arkamda hissettiğim, yetişmemde büyük emeği olan değerli hocam Doç. Dr. Serkan İLTAR' a, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü, sabır ve üzerimdeki emeklerinden dolayı ağabeylerim Doç.Dr.Veyssel 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, her konuda beni destekleyen tez danışmanım değerli ağabeyim Doç.Dr. Ahmet ÖZMERİÇ' e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın her aşamasında benden desteğini hiç bir şekilde esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr.Hamdi Çelik' e, Yrd.Doç.Dr. Ayşegül Fırat'a, Ar.Gör.Vet.Dr. Mert OCAK 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 teşekkürlerimi sunarım.

İhtisas 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, 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' teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Her zaman birlik ve beraberlik içinde çalıştığımız, bana çok şey katan ve bildiklerimi paylaşmak için elimden geleni yaptığıma inandığım doktor kardeşlerim ve ağabeylerim, Op. Dr. Mehmet Yücens, Op. Dr. Emre GÜLTAÇ, Op. Dr. Alper ÖZTÜRK, Op. Dr. Ahmet Suphi DİKMEN, Op.Dr.Aykut KOÇAK, Op.Dr.Oğuzhan TANOĞLU, Op.Dr. Orkun YILMAZ, Dr. M. Burak GÖKGÖZ, Dr. İ. Özay SUBAŞI, Dr. H. Çağlayan KAHRAMAN, Dr. Emre ATMACA, Dr. H. Can TAŞKENT, Dr. Kemal ŞİBAR'a ve beraber çalışmaktan zevk duyduğum hastanemiz klinikleri ve ameliyathanelerinde görevli doktor, hemşire, teknisyen ve diğer çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Hayatıma anlam katan, beni hiç yalnız bırakmayan, sabrı, fedakarlığı ve her zaman gülen gözleriyle yanımda olan, destek olup yoluma ışık tutan bir ömür hayat arkadaşım sevgili eşim Dilara ARICAN'a

Beni yetiştiren, hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini, emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen, varlıklarıyla onur duyduğum canlarım, annem Firdevs ARICAN'a, babam Yücel ARICAN'a ve can kardeşim Galip Orkun ARICAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gökhan ARICAN

ANKARA 2018

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR

ŞEKİLLER DİZİNİ

RESİMLER DİZİNİ

TABLÖLAR DİZİNİ

ÖZET

Kemik kaybının etyolojisine bakılmaksızın, uzun kemiklerin büyük diyafiz defektlerinin rekonstrüksiyonu, ekstremitte kurtarma için en büyük zorluklardan biridir. Masquelet, büyük defektlerdeki bu problem için yeni bir teknik tanımlamıştır[1, 2]. CGF konsantre trombosit yöntemidir. İçerdiği büyüme faktörleri aracılığıyla osteoblastları indükte ederek ossifikasyonu artırır. Güncel literatür araştırmamızda Masquelet teknik ile CGF birleştirilerek kemik iyileşmesi inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık

Bu deneysel çalışmamızda 8. ve 12. haftada değerlendirilmek üzere Masquelet teknik CGF ile birleştirilerek kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin histopatolojik ve radyolojik sonuçlarının karşılaştırılması amaçlandı.

Toplam 28 tavşan randomize ve her grupta 7'şer tavşan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup I 8. hafta sacri fiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak kontrol grup, Grup II 8. hafta sacri fiye edilmek üzere CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup, Grup III 12. hafta sacri fiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak kontrol grup, Grup IV 12. hafta sacri fiye edilmek üzere CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup şeklinde düzenlendi. Sacri fiye edilen tavşanların radius kemiği eksize edildi. Oluşan yeni kemik dokusu histopatolojik ve radyolojik olarak incelendi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Histopatolojik olarak *yeni kemik oluşumunun eski kemiğe oranı* değerlendirildi. Grup 4 ile Grup 3 kıyaslandığında, Grup 4'ün kemik iyileşmesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekliği dikkat çekicidir($p=0,008$). Grup 1 ile Grup 2 'nin karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi($p=0,153$).

Bone Volume; MikroBT tespit edilen, belirlenen sahadaki oluşan yeni kemiğin hacimidir. Grup 3 ile Grup 4 arasında yeni kemik hacmi açısından istatistiksel fark dikkat çekicidir($p=0,028$). Grup 1 ile Grup 2 arasındaki karşılaştırma da yeni kemik hacmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir($p=0,153$). Grup

2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında Grup 4'te Bone Volume değerin istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir($p=0,008$). Grup 3 ile Grup 1'in karşılaştırmasında yeni kemik hacimi açısından istatistiksel anlamlı fark tespit edilememiştir($p=0,064$). BV / TV , yeni kemik oluşumunun toplam kemik hacimine oranıdır. Grup 4'ün Grup 3 ile karşılaştırmasında BV / TV oranının istatistiksel olarak Grup 4 'te yüksekliği gözlenmiştir($p=0,002$). Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında; Grup 2'nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek BV / TV oranına sahip olduğu tespit edilmiştir($p=0,032$).

Sonuç olarak, 8. ve 12.hafta histopatolojik ve radyolojik değerlendirmeler sonucunda CGF eklenen uzun dönem grubun en yüksek kemik iyileşmesine sahip olduğu, kısa dönem CGF eklenen grubun kontrol grubuna göre daha yüksek kemik iyileşmesine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında; Masquelet tekniğın CGF ile birleştirilmesinin büyük diyafizer kemik defektlerinde kemik iyileşmesinin artırılması ve iyileşme süresinin kısaltılması için önemli bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

SUMMARY

Reconstruction of large diaphyseal defects of long bones is one of the greatest challenges for extremity rescue, regardless of the etiology of bone loss. Masquelet [1, 2] defined a new technique for this problem in large defects. CGF is a concentrated platelet method. It increases ossification by inducing osteoblasts through the growth factors it contains. In our current literature, we could not find any study that showed bone healing by combining CGF with Masquelet technique.

In our experimental study, it was aimed to compare the histopathological and radiological results of the effects on bone healing by combining Masquelet technique CGF to be evaluated at 8th and 12th weeks.

A total of 28 rabbits were randomized and divided into 4 groups of 7 rabbits per group. Group 1 and Group 3, only treated with Masquelet technique control groups, to be sacrificed at 8 and 12 weeks respectively. Group 2 and Group 4, treated with Masquelet technique + CGF , to be sacrificed at 8 and 12 weeks respectively. The radius bone of the sacrificed rabbits was excised. The new bone tissue was examined histopathologically and radiologically. The results were compared statistically.

Histopathologically, the ratio of new bone formation to old bone was evaluated. When Group 4 and Group 3 were compared, bone healing of Group 4 was statistically significant ($p = 0.008$). No statistically significant difference was found in the comparison of Group 1 and Group 2 ($p = 0,153$).

Bone Volume is the volume of your new bone. A statistically significant difference was observed between Group 3 and Group 4 in terms of new bone volume ($p = 0.028$). No statistically significant difference was found in the comparison of Group 1 to Group 2 in terms of new bone volume ($p = 0,153$). Compared with Group 2 and Group 4, the Bone Volume value was significantly higher in Group 4 ($p = 0.008$). There was no statistically significant difference in new bone volume between Group 3 and Group 1 ($p = 0.064$). In comparison of Group 4 with Group 3,

BV / TV ratio was statistically higher than Group 4 ($p = 0.002$). When Group 2 and Group 1 were compared; Group 2 had a statistically significant higher BV / TV ratio ($p = 0.032$)

As a result, it was observed that long-term group with CGF had the highest bone healing and group with short-term CGF had higher bone healing than control group at the end of 8th and 12th week histopathological and radiological evaluations. We believe that combining the masquetelet technique with CGF is an important method for increasing bone healing in large diaphragmatic bone defects and for shortening the healing period.

1.GİRİŞ

Kemik kaybının etyolojisine bakılmaksızın, uzun kemiklerin büyük diyafiz defektlerinin rekonstrüksiyonu, ekstremitte kurtarma için en büyük zorluklardan biridir. Küçük defektler nonvaskülerize kansellöz kemik greftiyle tedavi edilirken, 5 cm den büyük defektlerde otolog kemik greftin rezorbsiyon riskinden dolayı tek başına tavsiye edilmemektedir [3]. Büyük defektlerde sık kullanılan tedaviler vaskülerize greftler ve ilizarov distraksiyon osteogenezi tekniğidir [4, 5]. Masquelet [1, 2, 6], büyük defektlerin rekonstrüksiyonu için yeni bir teknik tanımlamıştır. Bu iki aşamalı tekniğin ilk aşamasında, kemik defekti mekanik bir işlevine sahip olan ve fibroz doku defekti içine girmesini önleyen polimetilmetakrilat (PMMA) kemik çimentosu ile doldurulur. Çimentoda yabancı cisim reaksiyonu ile bir membran oluşur. Bu membran kemik greftini revaskülarize eder ve greftin rezorpsiyonunu önleyerek biyolojik etkinlik gösterir. İkinci aşamada 6-8 hafta sonra, çimento hasar görmeden yeni bir cerrahi prosedürle çıkarılır ve defekt, kansellöz kemik grefti ile doldurulur. Membran, grefti emilimden koruyarak kemik iyileşmesini sağlar.

Masquelet Tekniği kullanıldığı araştırmalar sınırlı sayıda [7-9]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda Masquelet tekniğinin başarısını gösteren çalışmalar artış göstermiştir. Giannodis ve ark.[10], Masquelet tekniğini uyguladıkları çalışmalarında sonuçlarının son derece tatmin edici ve umut verici olduğunu bildirmişlerdir.

Doku iyileşmesi birçok mediatör tarafından kontrol edilmektedir. Bu süreci kontrol eden biyoaktif proteinlerdir. Büyüme faktörleri, hücre göçü, hücre çoğalması ve doku rejenerasyonu için anjiyogenezde kritik bir role sahiptir. Bu büyüme faktörleri kan, trombositler ve plazmada bulunur. Trombositler doku iyileşmesini stimüle eden büyüme faktörlerini yüksek miktarda ihtiva eder. Bu mediatörlerin etkinliklerini kullanarak kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için platelet zengin plazma (PRP), trombositten zengin fibrin (PRF) ve konsantre büyüme faktörü (CGF) gibi trombosit konsantreleri kullanılmıştır. PRP ilk jenerasyon konsantre trombosit elde etme yöntemidir. Doku iyileşmesini hızlandırmak için uzun zamandır

kullanılmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda PRP nin hücre proliferasyon ve diferansiyasyonuna olan etkileri çelişkili olarak bulunmuştur[11]. Son yıllarda araştırmacılar PRP'den farklı ve büyüme faktörleri içeren PRF ve CGF'i ve üretim yöntemlerini tanıtmışlardır. Choukroun tarafından tanıtılan ikinci kuşak trombosit yöntemi olarak adlandırılan PRF'nin üretim yöntemi, PRP'den daha basittir ve trombin ve kalsiyum klorür ilavesi gerektirmez[12]. PRP nin aksine PRF katı fibrin pıhtıdır ve yüksek miktarda konsantre trombositler olan; trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü b (TGF-b), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve kemik morfojenik protein (BMP) 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. Konsantre Büyüme Faktörü (CGF) 'nın PRP ve PRF gibi diğer rejeneratif materyallerden en önemli biyolojik farkı ise, CD34 kök hücreleri içermesidir[13]. Diğer önemli farklılık ise fibrin matriksindeki büyüme faktörlerinin densitesi, büyüklüğü ve miktarının fazla olması bunun sonucunda daha yoğun ve daha fazla büyüme faktörü içeren fibrin matriks elde edilmesini sağlar.

Güncel literatür araştırmamızda Masquelet tekniğe CGF ekleyerek kemiğin iyileşmesini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Biz bu çalışmamızda 8. ve 12.haftalarda sacrifiye edilen tavşanların CGF uygulaması ile kemik iyileşmesini histopatolojik olarak yeni kemiğin eski kemiğe oranının, radyolojik olarak mikroCT ile tespit edilen Bone Volume (BV), Tissue Volume (TV) ve BV / TV oranlarının karşılaştırılmasını amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

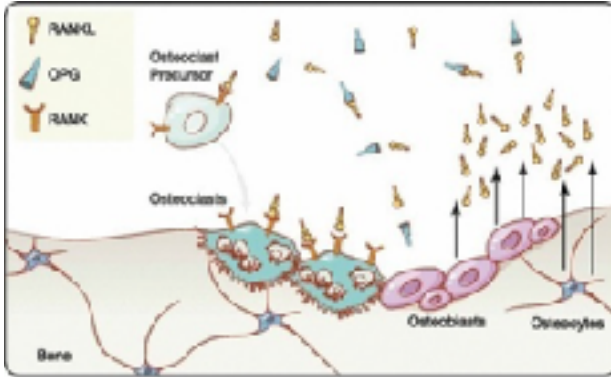
2.1 Kemik Doku

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

Kemik; hücreler arası kalsifiye olan kemik matriksi ve 3 tür hücreden oluşur. (Şekil 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.



Şekil 1. Kemik; hücreler arası kalsifiye olan kemik matriksi ve 3 tür hücreden oluşur

2.1.1 Kemik Hücreleri

2.1.1.1 Osteoblastlar

Osteoblastlar mineralize olan ve kemiği oluşturan bağ dokusu matriksinin organik kısmının (Tip 1 kollajen, glikopeptidler, proteoglikanlar) üretiminden

sorumludur. Osteoblastların prekürsörleri, kemik iliği stromal hücreleri, kondrositler, kas hücreleri ve adipositleri de oluşturan multipotent mezenşimal kök hücrelerdir. Kemik inorganik matriksin oluşabilmesi için osteoblast aktivitesi gereklidir.

Osteoblastlar tarafından yeni sentezlenmiş ve henüz kalsifiye olmamış kemik matriksine osteoid adı verilir. Osteoblastlar, salgıladıkları bu osteoid doku içinde gömülü kalırlar ve matriks kalsifiye olunca faaliyetlerini azaltıp basıklaşarak birer osteosit haline dönüşürler. 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, kemik gelişimini regüle eden büyüme faktörlerini salgılayan yapılardır. Osteositler, osteoblastik aktivitenin son safhasını oluştururlar ve kendiliğinden yenilenemezler. Kalsifiye matriks içinde laküna denen boşluklarda bulunur.

2.1.1.3 Osteoklastlar

Ostoklastlar eşsiz bir şekilde kalsifiye kemik matriksini sindirme kapasitesi olan özelleşmiş multi-çekirdekli hücrelerdir. Makrofajların ve monositlerin prekürsörleri olan 'Granülosit Makrofaj Koloni Oluşturma Birimleri' (GM-CFU) olarak bilinen kemik iliği hematopoietik kök hücrelerinden köken alır. Osteoklastlar, içerdikleri çeşitli lizozomal enzimleri, kemik dokusuna dönük olan ve çok sayıda uzun-kısa kalın-ince sitoplazmik uzantılar bulunan yüzeylerinden hücre dışına vererek kemikleri eritmeye çalışırlar, böylece kemik yüzeyine oturdukları yerlerde çukurlar açarlar, bu çukurlara Howship lakünaları adı verilir. Kemğin 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.

Osteoklast aktivitesi lokal sitokinler ve hormonlar tarafından düzenlenir. Osteoklastların kalsitonin hormonu için reseptörleri vardır fakat parathormon(PTH)

için reseptörleri mevcut değildir. Osteblastlar PTH hormonu ile aktive olur ve M-CSF , RANKL ve diğer sitokinleri salgılayarak osteoklastları aktive ederler .

2.1.2 Kemik Matriks

Kemik, kalsiyum ve fosfatın hidroksiapatit formunu ve kollajen yapıyı içeren matriksten oluşmaktadır. Matriks ayrıca mineralizasyonun regülasyonu ve kolajen iskeletin güçlenmesinde önemli olan non-kollajen proteinler içerir .İnorganik madde kemik matriksin kuru ağırlığının % 50 sini oluşturur. Kalsiyum hidroksiapatit en çok bulunan madde olmasına rağmen bikarbonat, sitrat , magnezyum, potasyum ve sodyum iyonları da bulunur.Kalsiyum bağlanma proteinleri gamma karboksiglutamik asit içeren osteokalsin (kemik Gla proteini) ve matriks Gla proteinini içerir ve pıhtılaşma faktörlerine benzer bir şekilde K vitamini bağımlıdır. Bu proteinler mineralizasyonu geciktirir ve kemik matriksinin olgunlaşmasına izin verir. Kemik sialoprotein ve osteopontin ise hem kalsiyuma hem de kollajene bağlanır ve osteoklastların kemik yüzeyine bağlanmasında rol alabilirler

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

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.

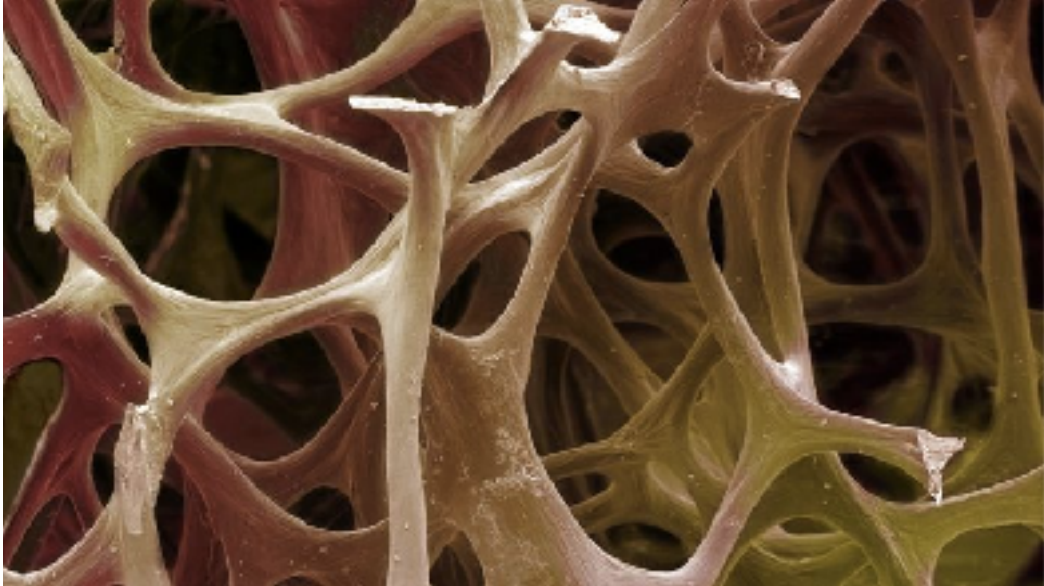
Periosteum kemiği dıştan saran kalın bir tabaka olup, dış fibröz tabaka kollajen fibrilleri ve fibroblastları içerir, hücreden zengin olan iç tabaka da ise osteoprojenitör hücreleri bulunur. Bu hücreler osteoblast üretme kapasitesine sahiptirler. Sharpey fibrilleri olarak isimlendirilen periosteal kollagen fibriller kemik matriksi içine nüfuz ederek periosteumun kemiğe sıkıca bağlanmasını sağlar.

Endosteum tabakası periosteum tabakasından daha ince olup, kemiğin içindeki bütün boşlukları örter. Tek katlı yassı ya da kübik osteoprojenitör hücreleri ile az miktarda retiküler bağ dokusundan oluşur.

Periostun ve endosteumun, kemik dokunun beslenmesi ve 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 (Şekil 2). Kortikal kemik ince bir spongiöz kemiği çevreleyen kalın kortikal kemik ve ortada kanal içeren tübüler bir yapıdır. Kortikal kemiğin iç yapısı endosteal, eklem yüzü haricindeki dış yüzeyler ise periosteal yüz olarak adlandırılır[14].



Şekil 2 . Kemiğin yapısı

Femur, humerus ve tibia gibi uzun kemikler, epifiz, metafiz ve diafiz olmak üzere gruplara ayrılır. Epifiz ve metafiz ince bir kortikal kemikle çevrelenen spongiöz kemikten oluşur ve büyümeye devam eden insanlarda epifiz ile birbirinden ayrılır. Diafiz silindirik kısımdır, hemen hemen tamamı, kemik iliği boşluğuna bakan iç yüzeylerince az miktarda süngerimsi kemik içeren, kortikal kemikten oluşur. Uzun kemiklerin eklem kıkırdağının hemen altındaki subkondral kemik adı verilir.

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

2.2.1 Lamellar kemik

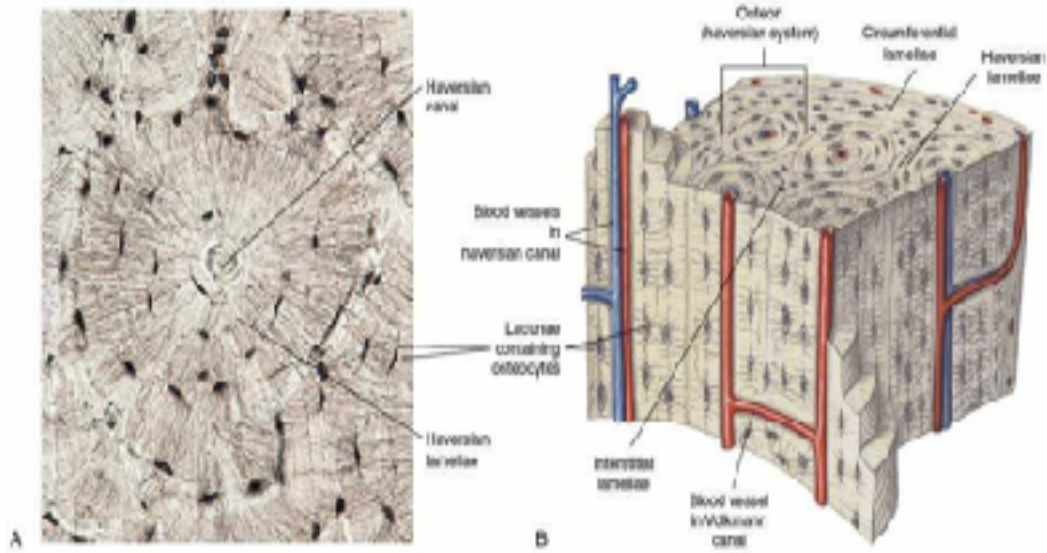
Çoğu erişkindeki kompakt (kortikal) kemik lamellar kemik olarak organize olmuştur. Lamellalar polarize ışık mikroskopuyla görülebilen 3-7 µm kalınlıktaki kalsifiye olan tabakalardır. Bu tabakalı görünümün nedeni kollajen liflerinin ve hüre dışı matriksin düzeni ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Tipik olarak lamellalar, santral kanal etrafında birbirlerine paralel olarak dizilirler.

Lamellalar kemiğin bir bölgesinin ortadan kaldırılması sonucu oluşan yeniden şekillenme süreci sonunda meydana gelir. Bir başka deyişle ikincil kemik dokusu her zaman lamellar tarzdadır. Diğer taraftan birincil kemik genel olarak süngerimsidir fakat bazen süngerimsi olabilir.

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 3).

Osteonlar genel olarak 3-6 mm uzunluk ve 150-300 mikron çapındadırlar. Osteon merkezinde haversian kanal olarak adlandırılan ve içinden damarlar, zayıf myelinize sinir lifleri geçen silindirik boşluk bulunur (Şekil 1). Haversian kanalları nı birbirlerine veya kemik kemik yüzüne Volkman kanalları bağlar. Wolkmann kanalları ve Haversian kanalları kortikal kemik dokusunun porozitesine az miktarda katkı sağlar. Her osteon sement çizgileri ile çevrelenir.

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 3 - Uzun kemiklerin şematik yapısı.

2.2.2 Woven (immatur) Kemik

Kaynama dokusu, embriyonik iskelet, patolojik durumlarda oluşabilen düzensiz düzensiz, döngüsü fazla, zayıf ve esnek kemik çeşitidir. Erişkinde olması her zaman patolojiktir. Burada kemik ara maddesini oluşturan kollagen lifleri normal lamellar kemikte olduğu gibi tabakalar oluşturmazlar; düzensiz yerleşimlidirler

2.3 Kemik Gelişimi (Osteogenezis)

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

2.3.1 İntramembranöz kemikleşme

Farklılaşmamış mezenkimal hücreler tabakalar halinde birleşirler, osteoblastlara dönüşürler ve organik matriks oluşturarak mineralize olurlar. Kıkırdak bir model yoktur.

İntramembranöz kemikleşmeye; embriyonik yassı kemik oluşumu, stabil distraksiyon osteogenezisinde oluşan kemik (instabil ise enkondral kemikleşme olur), çocuk uzun kemik seviyesinden yapılan amputasyon sonrası oluşan blastema kemik örnek olarak verilebilir.

Mezenkimal doku yoğunlaşmasının içinde ossifikasyonun başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Bu yolla kemik oluşacak alanlardaki mezenkim hücreleri uzantılarını çekip hızlı bir bölünme göstererek osteoprogenitör hücre olurlar. Daha sonra bunlar osteoblastlara dönüşerek kemik matriksinin kollajen

liflerini ve şekilsiz temel maddesini sentezler. Osteoblastlar, salgıladıkları matriks içinde gömülü kalırlar. Mezenkim dokusu içinde osteoid odakları meydana gelir. Osteoid odaklarının arasında kalan mezenkim dokusunun içine kapiller damarlar filizlenir. Bu damarlardan çıkıp osteoid dokuya giren kalsiyum ve fosfor iyonları, buradaki osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz enziminin aracılığı ile kalsiyumfosfat molekülleri şeklinde matrikse çöker. Böylece osteoid kireçleşerek primer kemik dokusu halini alır, osteoblastlar da primer kemik dokusu içindeki kendilerine ait lakünalar içinde osteositlere dönüşür. Bu şekilde meydana gelen değişik şekil ve büyüklükteki kemik parçacıklarına kemik trabekülleri veya kemik spikülleri denir. Trabeküllerin yüzeyinde, osteoprogenitör hücrelerden türeyen osteoblastlar tek sıra halinde dizilerek lamelli kemik yapmaya başlarlar. Böylece trabeküller büyüyüp uzarlar. Birkaç odakta birbirinden ayrı oluşan kemik trabekülleri bu şekilde uzayıp birbirleriyle birleşerek süngerimsi yapıyı meydana getirir.

2.3.2 Endokondral kemikleşme

Uzun ve kısa kemikler bu yolla meydana gelir. Bu kemiklerin gelişecekleri yerde önce hiyalin kıkırdaktan ufak birer modelleri şekillenir. Endokondral kemikleşmeyle, bu kıkırdak modelin yerini kemik dokusu alır (Şekil 4).

Kıkırdak modelin diyafiz bölgesinde, kıkırdağı örten perikondriumun iç katındaki mezenkim hücreleri bölünerek osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoblastlar burada kemik matriksi sentezleyip etraflarına salgılarlar ve kendileri de matriks içinde gömülü kalıp osteositlere dönüşürler. Böylece kıkırdak modelin diyafizinde, intramembranöz kemikleşme ile silindirik biçiminde bir kemik manşet oluşur. Kemik manşeti saran zar da artık, periosteum olarak adlandırılır. Normalde kıkırdak matriksi kan damarı içermediği için kıkırdak hücreleri, perikondriumdaki kan damarlarından çıkan besin maddelerinin difüzyonuyla beslenir. Ancak kemik manşet şekillenince difüzyon engellenir. Bu durum, kemik manşetin çevrelediği alandaki kıkırdak hücrelerinin beslenemeyip bozulmalarına yol açar. Bozulmaya yüz tutan hücreler önce irileşir (hipertrofi), peşinden de dejenere olmaya başlar. Hücreler dejenere olup yıkıldıktan

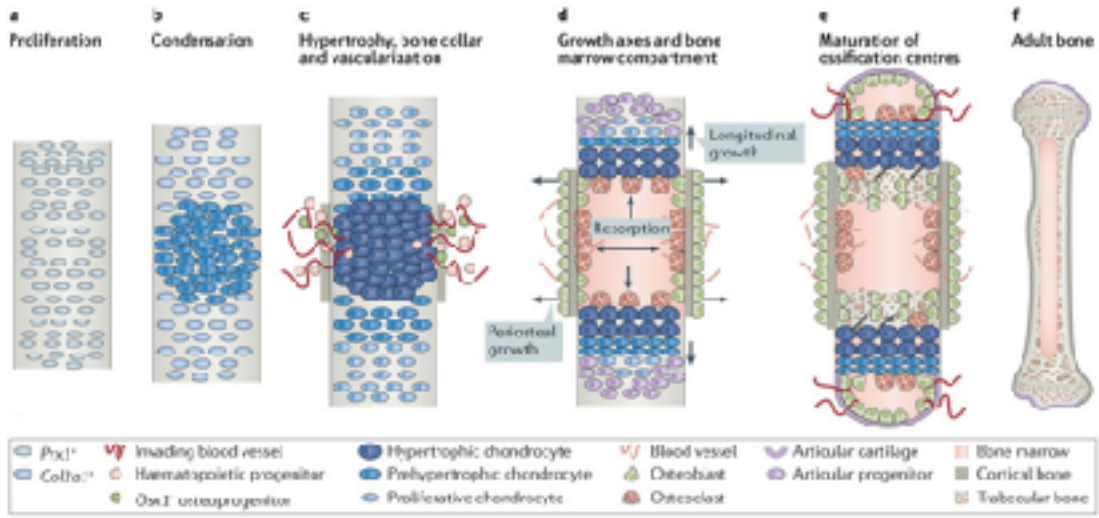
sonra geriye sadece hücreler arasındaki kıkırdak matriksi (kıkırdak spikülleri) kalır. Bu sırada periosteumda osteoklastlar belirir ve bunlar kemik manşeti yer yer delerek foramen nutrisyumları açarlar. Periosteumdaki kan damarlarının bir kısmı bu deliklerden girip, kıkırdak spiküllerinin arasında kalan boşluklara filizlenir.

Bu damarlardan çıkan kalsiyum ve fosfor iyonları, kondrositlerden açığa çıkan alkalen fosfataz enziminin aracılığı ile birleşerek kıkırdak spiküllerini oluşturan matrikse çöker ve onu kireçlendirir. Yani matriks kalsifiye olup sertleşir. Spiküller arasındaki kondrositlerin dejenere olup ölmesiyle ortaya çıkan boşluklara, kan damarlarıyla birlikte mezenkim hücreleri de girer. Bu hücrelerden farklılaşan osteoblastlar, kalsifiye olmuş kıkırdak spiküllerinin üzerine tek sıra halinde dizilerek primer kemik dokusu yapmaya başlar. Histolojik kesitlerde, kalsifiye olmuş kıkırdak matriksi bazofilik boyanmış, bunun üzerinde oluşan kemik dokusu da asidofilik olarak izlenir. Kemik trabekülleri büyüdükçe, kalsifiye kıkırdak matriksi de osteoklastlara benzeyen çok çekirdekli dev hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Trabeküller arasındaki boşluklarda da, mezenkim hücrelerinden köken alan kırmızı kemik iliği gelişir.

Primer kemikleşme merkezinin büyümesi, periostal kemik manşetin epifizlere doğru büyüüp ilerlemesi sonucunda aynı olayların tekrar etmesiyle gerçekleşir. Bu sırada osteoklastlar aktif haldedir ve kemikleşmenin başlangıcından itibaren kemik spiküllerini merkezden başlayarak rezorbe ederler, böylece kemik iliği boşluğunu meydana getirirler. Bu boşluk, kıkırdak modelin kemikleşmesi ve uzaması tamamlanıncaya kadar epifizlere doğru büyür. Dejenere olarak ölen ve yerinde kemik dokusu gelişen kıkırdak hücrelerinin kaybı, modelin epifizleri ile diyafizi arasındaki kondrositlerin hızlı mitoz bölünmeleriyle telafi edilmeye çalışılır. Mitozla çoğalıp alt alta dizilen kondrositler birbirine paralel seyreden hücre kordonları (izogen gruplar) oluştururlar. Bu çoğalmalara bağlı olarak kıkırdak taslağın boyu devamlı uzar.

Ancak bu merkezlerin ortaya çıkışı bir kemikte bile aynı zamanlara isabet etmez. Sekonder kemikleşme merkezlerindeki kemikleşme, diyafizdekinden farklı olarak ışınsal yönde bir büyüme gösterir; bu yüzden epifizler şişkin bir biçim alırlar.

Uzun ve kısa kemiklerin epifizlerdeki kemikleşme eklem yüzeylerine kadar devam etmez; bu kısımda kıkırdak bir bölge kalır ve büyümenin tamamlanmasından sonra eklem kıkırdaklığı olarak varlığını sürdürür. Primer ve sekonder kemikleşme merkezleri arasında, kemiğin uzamasına hizmet eden ve epifiz plağı adı verilen kıkırdak bir alan bulunur. Kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plaklarındaki kıkırdak hücreleri diyafiz yönünde bölünüp çoğalarak sürekli kıkırdak dokusu yaparlar. Bu kıkırdak dokusu da devamlı olarak yerini kemik dokusuna bırakır.



PMID 26191264 Nature Reviews | Endocrinology

Şekil 4 - Endrokondral kemikleşme

2.4 Kırık İyileşmesi

Dıştan veya içten gelen zorlanmalarla kemik dokusunda olan ayrılmaya, yani kemiğin bütünlüğünün bozulmasına “KIRIK” denir. Kemikteki bozukluk ufak bir çatlaktan bir veya birçok kemiğin parçalanmasına kadar olabilir. Kırığı meydana getiren kuvvet veya zorlama kemiği kırıncaya kadar çevredeki cilt, kas, tendon, ligaman, damar, sinir veya organları da hasara uğratar. Bazen bu hasarlara kırılan kemiklerin uçları neden olur. Kemiğin kırılması esnasında hücreler, kemik matriksi, periost da travmanın şiddeti ile doğru orantılı olarak hasar görür. Kırık sonrası kemik iliğinde, kortekste, periostda ve çevre yumuşak dokuda; kırığın bölgesine, kırığın tipine ve uygulanan tedavi metoduna bağlı olarak cevap gelişir[15]. Primer kırık

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

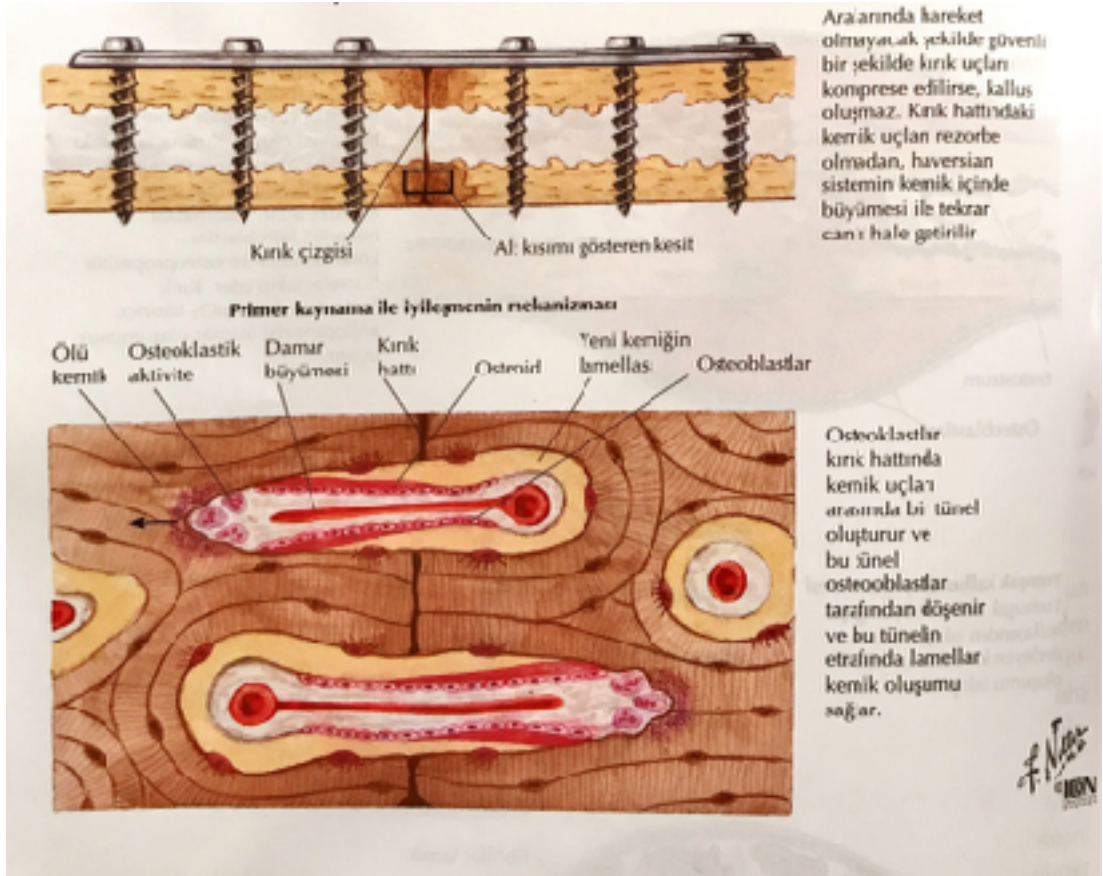
2.4.1 Primer kırık iyileşmesi

Hem spongioz hem de kortikal kemikte kırık iyileşmesi kallus gelişmeden olabilir. Bunun için kırık yüzeyleri rijit olarak kontak halinde olmalıdır. Bu şekildeki kaynama primer kırık iyileşmesi olarak adlandırılır. Bu şekildeki kaynamada kırık kallusu oluşmaz ve rezorbe olmaz. Çoğu impakte epifizyel, metafizyel ve vertebra cisim kırıklarında kırık uçları primer kemik iyileşmesi için yeterli stabiliteyi sağlar. (Şekil 3). Schenck ve Willenegger iki şekilde primer kemik iyileşmesi tarif etmişlerdir.

- 1) Gap (boşluk) iyileşmesi
- 2) Haversiyen remodelasyon.

Bu iki şekil iyileşme rijit olarak stabilize edilmemiş kırıklarda tamir ve remodelasyon safhalarına karşılık gelmektedir. Çalışmalarında kompresyon plağı ile rijit olarak tespit sonrası tüm kortikal kemik uçlarının yakın kontak içinde olmayıp, kırık sahasında yer yer boşlukların olduğunu göstermişlerdir. Kaynama mekanizması, iyileşme dokusunun yapısı ve yeni kemik oluşum hızı bu boşlukların boyutuna bağlıdır. Eğer kortikal kemik uçlarında direk kontak mevcut ise lameller kemik direk olarak kırık hattına kemiğin uzun aksına paralel olarak geçer. Bu olay osteonların genişlemesi ile olur. Osteoklastları takiben osteoblastlar yeni kemik depolarlar. Kan damarları osteoblastları takip eder. Bu yeni kemik matriks, çevrelenmiş osteositler ve kan damarları yeni haversiyen sistemi veya primer osteonları oluşturur. Bu süreçte kontak iyileşme denir.

Haversiyen remodelasyon nekrotik damarların izini takip eder ve yeni kan damarlarını keser. Eğer kortikal kemikte büyük bir segment nekrotik ise osteonların direk genişlemesi ile yine de iyileşebilir. Ancak bu olay daha yavaş olur ve nekrotik kemik alanları remodelasyona uğramamış şekilde uzun bir süre kalır.



Şekil 5 - Primer kırık iyileşmesi

2.4.2 Sekonder kırık iyileşmesi

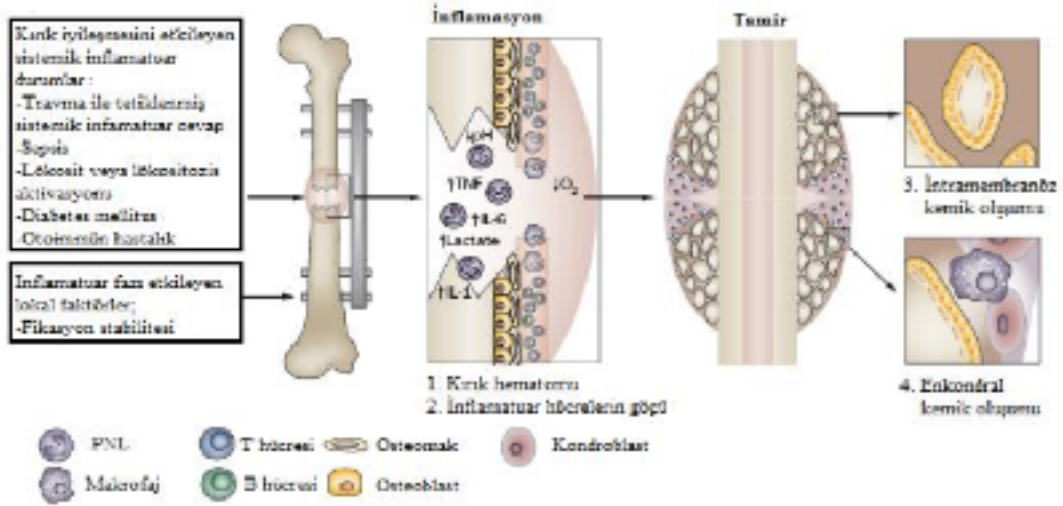
En sık görülen kırık iyileşmesi şekli olan sekonder kırık iyileşmesi, enkondral ve intramembranöz kemikleşmenin birlikteliği ve takiben kallus formasyonu şeklinde özetlenebilir [16, 17]. Mikro hareket ve yüklenme ile bu süreç daha da gelişir. Kırık hattında mikro harekete izin veren konservatif tedavi yöntemleri, intramedüller çivileme, eksternal tespit ya da parçalı kırıkların minimal invaziv perkütan osteosentez tespitinde görülen kırık iyileşmesi indirekt kırık iyileşmesidir[18, 19] Fakat fazla hareket ve fazla yük verme kaynamanın gecikmesi hatta kaynamama ile sonuçlanabilir [20]. Kırık iyileşmesi birbiri içine girmiş 3 fazdan oluşur. Kırık iyileşmesi inflamasyon ile başlayıp tamir ve remodelizasyon ile devam eden bir süreçtir(Şekil 6).

2.4.2.1 İnflamasyon Fazı

Kırıkla beraber kemik içinde ve çevre yumuşak dokudaki damarlar yırtılır, çevre yumuşak doku zedelenir böylece inflamatuvar olaylar zinciri başlar. Yırtılan damarlardan sızan kan kalkmış periost altında, kırık uçları arasında ve intramedüller kanalda birikir ve kırık hematomunu oluşturur. Kırık hematomu karakteristik olarak hipoksiktir ve düşük pH'ya sahiptir. Kan damarlarında meydana gelen hasar kollateral vasküler yapılar oluşana kadar kırık bölgesindeki osteositlerin beslenmesini bozar. Kırık hematomu kan kaynaklı inflamatuvar hücrelere, antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlere ev sahipliği yapar [21]. Kırık oluştuğunda travmanın derecesine göre osteosit beslenmesi bozulur ve kırık uçlarındaki kemik nekroze olur[22]. Kırık normal bir inflamasyon karakteristiği gösterir. Trombositler, ölmüş ve zarar görmüş hücrelerden salınan mediatörler vazodilatasyona ve kırık bölgesinde akut ödem oluşmasına neden olur[23].

Kırık hattına ilk gelen hücreler PNL'erdir[24]. Bir günlük ömrü olan PNL birçok sitokin salgılar. PNL'nin kırık iyileşmesine negatif yönde etkisi olduğu düşünülür [25]. PNL'nin salgıladığı sitokinlerin etkisiyle makrofajlar kırık hematoma ve kırılmamış kemikteki periost ve endosteum çevresine yerleşir. Periost ve endosteumdaki makrofajlar intramembranöz kemik iyileşmesinde temel rol üstlenirken[26] kırık hematoma gelen makrofajlar encondral kemikleşmede kısmi bir rol üstlenir (şekil 6)[27]. Makrofajların kallus dokusuna göçünden bir süre sonra kırık hattına lenfositler göç etmeye başlar[28].

IL-1, IL-6, TNF, RANK ligandı, TGF- β süper ailesi üyeleri (BMP-2, BMP-4, BMP-6) gibi birçok proinflamatuvar sitokin erken inflamatuvar fazda salgılanır[29-31]. TNF- α konsantrasyonunun 24 saatte tepe noktasına ulaştığı travmadan 72 saat sonra travma öncesi değerlerine döndüğü gösterilmiştir [30]. 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 [29]. Akut inflamatuvar cevap ilk bir haftada oluşur ve en yüksek IL-1 β ve IL-6 seviyesine ilk 24 saat içinde ulaşılır[32, 33].



Şekil 6 -İnflamasyon fazı

2.4.2.2 Onarım (yumuşak ve sert kallus) fazı

Kırık sahasında mezenkimal hücreler proliferer olur, farklılaşır ve fibröz doku, kıkırdak ve örgümsü kemikten oluşan kırık kallusunu oluşturur. Kırık kallusu kırık bölgesini doldurur ve çevreler. İyileşmenin erken evresi; Yumuşak veya fibröz kallus , sert veya kemik kallus olmak üzere ikiye ayrılır. Kallusun periferinde erken dönemde intramembranöz kemikleşme ile oluşturulan kemik sert kallustur. Yumuşak kallus merkezde düşük oksijenli bölgededir ve primer olarak kıkırdak ve fibröz doku içerir. Zaman içinde kıkırdak, endokondral ossifikasyon süreci ile kemiğe dönüşür. Sert kallus genişler ve kırığın stabilitesi artar. Bu süreç yeni kemik kırık sahasını köprüleyene kadar devam eder[15] Hayvan modellerinde (sıçan, tavşan, fare) yumuşak kallus oluşumunun travma sonrası 7-9 günde pik yaptığı gösterilmiştir [34]. Kallus matriksinin biyokimyasal içeriği tamir süreci ile değişir. Hücreler fibrin pıhtıyı glikozaminoglikan (GAG), proteoglikan ve tip 1 ve tip 3 kollajen içeren dağıntık fibröz 16 matrikse değiştirir. Çoğu bölgede bu doku daha sert fibrokartilaj veya hyalin benzeri kıkırdağa çevrilir. Hyalin benzeri kıkırdağın oluşması ile tip 2 kollajen, kıkırdak spesifik proteoglikanlar ve bağlayıcı protein içeriği artar. Endokondral ossifikasyon ve intramembranöz kemik formasyonu sırasında tip 1 kollajen konsantrasyonu, Alkalen fosfatase (ALP) ve kemik spesifik proteinler

matriksin mineralizasyonuna kadar artar. Yeni oluşan örgümsü kemik lameller kemiğe dönüşür. Remodelasyon ile beraber kollajen ve diğer proteinler normal seviyeye döner.

Kırık tamirinin hücresel analizi yapıldığında; hücre içinde kan damarları, kırıkta, kemik spesifik proteinler için genlerin aktivasyonu ile granülasyon dokusu, kırıkta ve kemik oluşumu arasında yakın bir birliktelik görölmektedir[35, 36]. Bu birliktelik; kırık iyileşmesinin gen ekspresyonunun düzenlenmesine bağlı olduğunu göstermektedir. Aynı anda kondrojeniz, endokondral ossifikasyon ve intramembranöz kemik formasyonunun kırık kallusunun farklı bölgelerinde oluşması, lokal mediatörler ve mikroçevredeki farklılıklar, ki buna mekanik stresler de dahildir, hangi genin eksprese edileceği ve hangi tip dokunun tamir dokusu tarafından oluşturulacağını belirler. Kompresyon fibröz dokunun oluşumunu engeller. Aralıklı makaslama (shearing) gücü yeni oluşan fibrokartilajın kalsifikasyonunu artırır, diğer yandan aralıklı hidrostatik stres kalsifikasyonu engeller.

Biyomediatörler ve bölgedeki oksijen oranı tamir sürecindeki hücre fonksiyonunu etkiler. Biyomediatörler hücre bölünmesi, matriks sentezi, ve doku farklılaşması gibi olaylarda hücrelerarası bağlantıda rol alırlar. Hedef hücrelerdeki özel reseptörlere bağlanarak hücre içinde bir sinyal iletim sistemini tetikler. Bu sinyal çekirdeğe ulaşarak biyolojik yanıtı oluşturur ve hedef hücrede bir dizi protein sentezi başlar. Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) kondrosit yapımını, kırıkta formasyonunu, osteoblast çoğalmasını ve kemik sentezini artırır. Transforme eden büyüme faktörü- β (TGF β) trombositlerden travmayı takiben salınır ve kallus oluşumuna öncülük eder. TGF- β sentezi ayrıca endokondral ossifikasyon yüzeylerinde kırıkta hipertrofisi ve kalsifikasyonu ile ilişkilidir. Oksijen basıncı kemik veya kırıkta oluşum ayrımında önemlidir. Düşük oksijen basıncında, muhtemelen kan damarlarına olan mesafeye bağlı olarak kırıkta oluşur. Yeterli oksijen ulaşan bölgelerde ise yeterli mekanik ve elektriksel uyaran ile kemik oluşur[37].

Kırıkların iyileşmesi ve başarılı kemik onarımı için revaskülarizasyon şarttır[31, 38]. Vaskülarizasyon süreci vasküler endotelial growth faktör(VEGF) bağımlı yol ve anjiopoetin bağımlı yol olmak üzere iki moleküler yol ile düzenlenir. Vasküler rejenerasyonun ana düzenleyicisi VEGF'dir[38]. VEGF hem vaskülogenezi hem de anjiyogenezi (önceden oluşan damarların genişletilmesi) destekler[39]. Bundan dolayı VEGF kırık hattında hem neoanjiyogenezi hem de revaskülarizasyon için hayati rol oynamaktadır.

Hücre aktivite zincirinin bir sonucu olarak kırık kallusu mineralize olur. Osteoblastlar tip 1 kollajenden zengin bir matriks sentezler. Sonra kollajen fibrillerinde kalsiyum 17 hidroksiapatit kristalleri mineralizasyonu arttıracak ortamı yaratır. Mineralizasyon iki hücre fonksiyonuna ihtiyaç duyar. Birincisi; hücreler mineralizasyonu engelleyecek fibrokartilaj kallus matriksindeki yüksek GAG konsantrasyonu içeren lokal ortamın uzaklaştırılmasıdır. İkincisi de hücreler matriksi mineralizasyona hazırlandıktan sonra, kondrositlerin ve sonra da osteoblastların paketlenmiş kalsiyum-fosfat komplekslerini matrikse salgılamasıdır. Bu hücre zarı kaynaklı veziküller, nötral proteaz ve ALP enzimi taşır. Etki ettiğinde proteolitikandan zengin matriksi parçalar ve ATP'yi ve diğer yüksek enerjili fosfat esterlerini hidrolize ederek kalsiyumun çökmesini sağlar. Kallus mineralize olmaya başladıktan sonra nötral proteazlar ve ALP aktivite ile paralel olarak artar ve en üst seviyeye ulaşır. Kırık fragmanlarının stabilitesi internal ve eksternal kallus ile giderek artar. Sonuçta klinik olarak kaynama olur. Klinik olarak kaynama kırık sahasının stabil ve ağrısız olmasıdır. Radyolojik kaynama trabekül görüldüğünde veya kortikal kemik kırık sahasını köprülediğinde oluşur. Genelde klinik kaynama radyolojik kaynamadan önce olur. Ancak radyolojik kaynama sağlandığında bile iyileşme süreci tamamlanmamıştır. İmmatür kırık kallusu normal kemiğe göre güçsüzdür. Kemik tam gücünü remodelasyon safhası esnasında kazanır.

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[40]. Sert kallus formasyonunun pikine ,hayvan modellerinde 14. günde ulaşıldığı bildirilmiştir[34]. Sert kallus dokusu oluşumu ilerledikçe ve kalsifiye kırıkta yerini immatür (woven) kemiğe bıraktıkça kallus daha katı ve mekanik olarak da daha sert hale gelir[16].

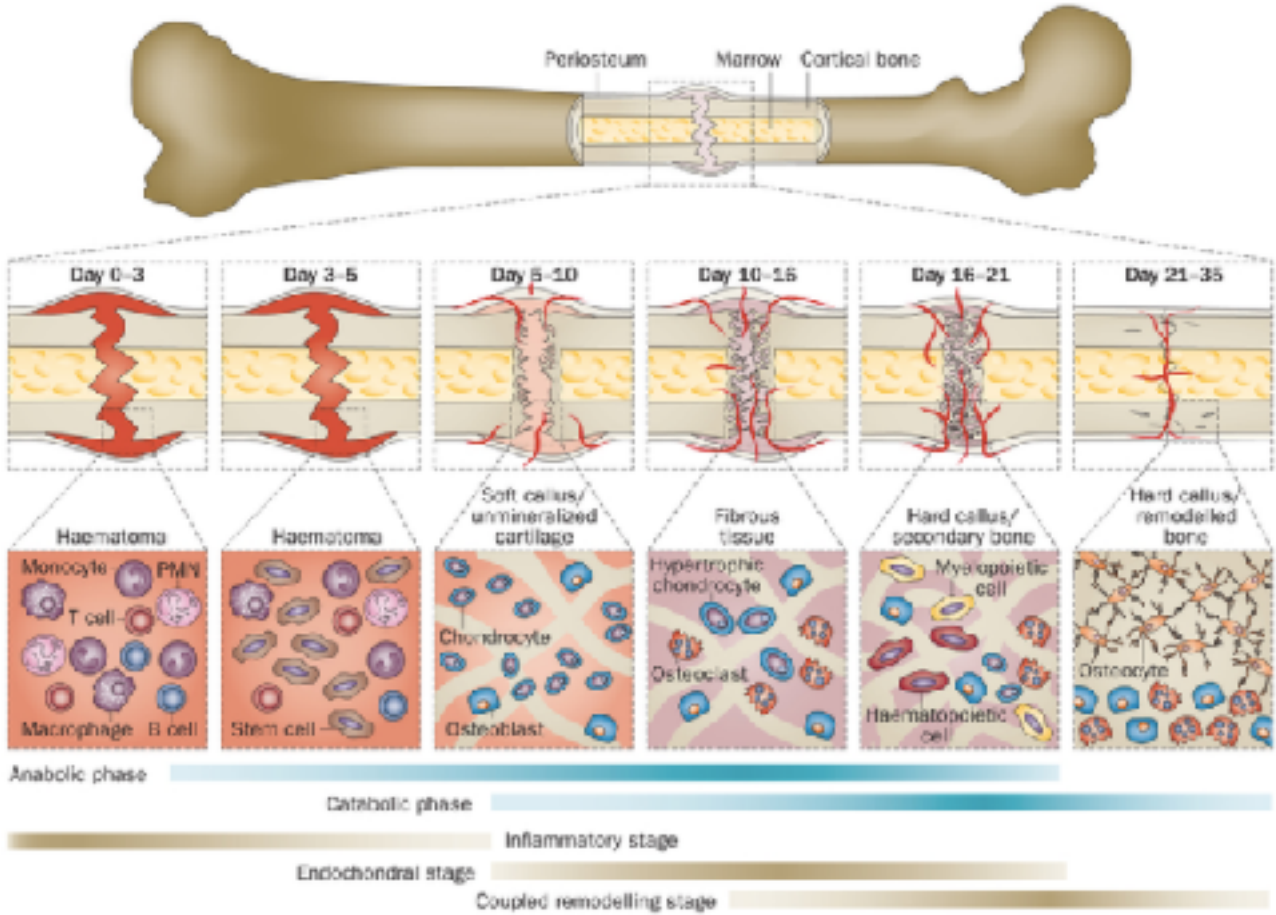
2.4.2.3 Remodelling fazı

Kaynamanın son safhası tamir dokusunun remodelasyonu ile olur. Remodelasyon örgümsü kemik ile lameller kemiğin yer değiştirmesi ve gereksiz kallus dokusunun rezorpsiyonu ile başlar. Bu süreçte sert kallus santral medüller kanallı lamellar kemiğe dönüşür [30]. IL-1 ve TNF- α bu süreci düzenleyen sitokinlerdir[31]. Yapılan radyoizotop çalışmalar ile kırık sahasında tam fonksiyonel kazanım ve düz grafide kaynama olmasına rağmen artmış aktivite tespit edilmektedir. Bu aktivitede klinik ve radyolojik kaynamadan sonra remodelasyonun yıllarca devam ettiğini göstermektedir[41] Elektriksel alanların kırık remodelasyonunu etkilediği düşünülmektedir. Kemik strese maruz kaldığında konveks yüzeyde elektronegatiflik, konkav yüzeyde elektropozitiflik görülür. Elektropozitif aktivite osteoklastik aktivite ile elektronegatiflik ise osteoblastik aktivite ile ilişkilidir. Kemiğin mimarisindeki değişim etki eden yükle bağlantılıdır. Bu duruma Wolff yasası denmektedir.

Her ne kadar kırık kallus remodelasyonu hücre ve matriksteki değişiklikler zinciri olsa da; hasta için en önemli fonksiyonel sonuç mekanik stabilitedeki artıştır. Kırık stabilitesindeki progresif artış 4 aşamada incelenebilir[42]. 1.aşamada torsiyonel teste maruz 18 kalan kemik kırık hattından yumuşak şekilde yetersizliğe uğrar. 2. aşamada kemik yine kırık bölgesinden yetersiz kalır ancak daha yüksek bir sertlik gösterir. 3. aşamada kısmen eski kırık sahasından, kısmen normal olan kemikten yüksek sertlikte yetersiz kalır. 4. aşamada ise yetersizlik eski kırık hattından olmaz. Bu son aşama kırık sahasındaki yeni dokunun normal dokuya göre mekanik özelliklerini ikiye katlandığını göstermektedir. Mükemmel kırık iyileşmesine rağmen etkilenen ekstremitede kemik yoğunluğu değerleri yıllar içerisinde düşebilir [43].

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[41].

Kemik remodelizasyonunun başarılı olabilmesi için yeterli kan temini ve mekanik stabilite çok önemlidir. Her iki durumun sağlanamadığı durumlarda bu sürecin 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 oluşur [20].



Şekil 7 - Sekonder kırık iyileşmesi

2.5 Nonunion (psödoartroz)

FDA, kaynama yokluğunu, kırılmış bir kemiğin dokuz ay içinde tam olarak iyileşmemesi ve üç ardışık ay içerisinde, her ay çekilen seri radyografilerinde iyileşme yönünde ilerleme göstermemesi olarak tanımlasa bile[44], halen kaynama yokluğunu tanımlayacak standart bir ölçüt bulunmamaktadır. Basitçe nonunion kırığın beklenen sürede kaynamamasıdır. Daha genel anlamda nonunion müdahale olmadan kırık iyileşmesinin devam etmeyeceği durumdur [45, 46]. Bütün kırıkların % 90-95 i sorunsuz iyileşir [47]. Nonunionlar , biyolojik kırık onarımının yerel biyolojiyi ve kemik hasarının mekanizmasını aşmadığı vakaların küçük bir yüzdesidir.

Kaynama yokluğunun üç tipi şunlardır; hipertrofik, oligotrofik, atrofik. Hipertrofik kaynama yokluklarının biyolojik olarak bir iyileşme kapasitesi ve yetersiz mekanik desteği vardır; bunlar, aşırı kallus oluşumu ve köprüleşme eksikliği ile karakterizedir. Oligotrofik kaynama yoklukları, iyileşme için biyolojik kapasiteye sahiptir; iyileşmeyi başlatma becerisi yoktur ve hiçten aza kadar kallus oluşumuyla karakterizedir. Atrofik kaynama yokluklarının iyileşme kapasitesi çok azdır ya da hiç yoktur ve kallus oluşumu olmaksızın sklerotik kemik uçları ve yalancı kaynama ile karakterizedir.

2.5.1 Nonunion etyolojisi

İyi bir kemik iyileşmesi için mekanik stabilite, yeterli kan akımı, kırık uçları arasında temas gereklidir. Bunlardan birinin veya birkaçının sağlanması nonunion ile sonuçlanır. Yaralanmanın ciddiyeti ve fiksasyonun yeterli sağlanamaması bu gereklilikleri negatif etkiler. Bozulmuş kaynama için risk faktörleri, değiştirilebilir ve değiştirilemez olarak sınıflandırılabilir. Değiştirilebilir risk faktörlerine müdahale edilmesi, uygun hastalarda kırık iyileşme şansını arttırabilmektedir.

2.5.1.1 Değiştirilebilir Risk Faktörleri

2.5.1.1.1 İnstabilite

Kırık tespitinin dengesi ve bunun sonucu kırık hattında oluşan mekanik durum kırık iyileşmesi etkiler. Bu etkilenme sonucu hem parçalar arası hareketin frekans ve magnitudü kırık kallusunun boyutunu değiştirir hem de mezenşimal

hücrelerin osteoblast yada kondrojenik hücelere dönüşümü etkilenir. Parçalar arası kemik teması kırık iyileşmesi için önemli bir gerekliliktir.

Yumuşak dokunun kırık parçalarının arasına girmesi, kemik kaybı, parçalar arası kötü dizilim ya da ayrılma sonucu defektler ortaya çıkabilir. Oluşan bu defektlerin kırık iyileşmesi sürecinde köprülenmesi gerekir. Osteonal iyileşmede kortikal bir defektin köprülenebileceği mesafe hayvan deneylerinde en fazla 1 mm olarak bulunmuştur [48]. Defektin büyüklüğü arttıkça, kırığın kaynamama ihtimalide artmaktadır. İnternal atellemede ise bu mesafe 2 cm' i geçmemelidir[49]. 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 gerçekleşmeyeceği mesafeyi temsil eder. Bu tavşanlarda 15 mm dir.

Plakla tedavi edilmesi planlanan basit kırıklarda parçalar arası sıkıştırma yapılmazsa oluşan lokal dengesizlik kırık uçlarında emilime sebep olur. Bu durumda plak, parçalar arası temasa engel olarak kırık iyileşmesini olumsuz etkiler ve kaynama süresi uzarsa bu plağın yetmezliği ve kırılması ile sonuçlanır. Biyolojik tespit yöntemleriyle kaynamanın temel felsefesini oluşturan Perren'in gerilim teorisine göre kırık hattındaki boşluk ve hareketin miktarları sonucu oluşan gerilim kırık kaynamasını hücresel düzeyde etkilemektedir. Osteoblastlar yüksek gerilimli ortamdan hoşlanmazken, kondroblastlar ve fibroblastlar için uygun bir ortam oluşmaktadır[50].

2.5.1.1.2 Enfeksiyon

Doğrudan kaynamama sebebi değildir. Ancak kırık hattında bakterilere karşı gelişen yangısal yanıt kemik ölümüne, kallusun devamlılığının bozulmasına, kemik parçaları arasındaki boşlukların genişlemesine ve dolayısıyla hareketin artmasına yol açarak kırığın kaynamasına olumsuz etkiler yapar. Ayrıca kemik kalitesinin olumsuz etkilenmesi neticesi oluşabilecek olan tespit gereçlerinde gevşemede kaynamama sebebi olabilir[51] ve kırık bölgesinde nonunion riskini arttırır[52].

2.5.1.1.3 Sigara içimi

Sigara, içenlerde kaynamama ve geç kaynamanın görülme sıklığındaki artma istatistiksel olarak gösterilmiştir[53] Nikotin kırık iyileşmesi sürecinde hücreler üzerine olumsuz etkileriyle makrofaj ve fibroblastların hem olgunlaşmasını hemde çoğalmasını bozmaktadır. Ayrıca vazokonstriksiyon yaparak doku perfüzyonunda da azalmaya hipoksi ve iskekiye yol açmaktadır[54, 55] ayrıca osteoblast fonksiyonunu bozar[56, 57]. Yapılan bir çalışmada 146 tip 1 açık tibia kırığında sigara içenlerde kaynamanın anlamlı derecede geciktiğini bildirmişlerdir[58]. Brown ve ark, spinal füzyon ameliyatı sonrası kaynamama oranını sigara içenlerde % 40, içmeyenlerde ise % 8 bulduklarını bildirmişlerdir[59].

2.5.1.1.4 İlaç kullanımı

Bazı ilaçların kemik iyileşme kapasitesini kısıtladığı gösterilmiştir. NSAİİ'ler akut ağrı ve şişliği etkin olarak azaltır ve kırıklar da dahil olmak üzere, kas iskelet sistem yaralanmalarında eş zamanlı narkotik gereksinimini düşürür. Ancak temel bilimsel kanıtlar, NSAİİ'lerin kemik kaynamasını yavaşlatma potansiyeli, gecikmiş kaynama ya da kaynama yokluğu riskini artırması sebebiyle, rutin kullanımı hakkında endişeleri arttırmıştır[60]. Bazı hayvan çalışmalarında NSAİD lerin kırık kaynamasına negatif yönde etkileri bildirilmesine rağmen [61-63], NSAİD lerin kırık kaynamasını etkilemediği yönünde çalışmalar da mevcuttur [64, 65]. Son yapılan çalışmalarda basit kırık tipine sahip hastaların bu ilaçların yararlarından mahrum bırakılması için yeterli kanıt olmadığı sonucuna varılmıştır[66].

Sistemik kortikosteroid kullanımının da hayvan modellerinde kırık iyileşmesini inhibe ettiği, kallus sertliğini azalttığı[67] ve intertrokanterik kalça kırığı olan hastalarda kaynamayı geciktirdiği gösterilmiştir[68].

Kırık iyileşmesini negatif yönde etkileyen diğer ilaçlar fenitoin[44], siprofloksasin[69], steroidler, antikoagülanlar olarak sayılabilir.

2.5.1.2 Değiştirilemez Risk Faktörleri

2.5.1.2.1 Yetersiz vaskülerite

Kırık bölgesinde dolaşımın bozulması, kemik iyileşme sürecini doğrudan etkilemektedir. Dolaşımın bozulması parçalı, deplase ya da açık kırıklar gibi yüksek enerjili kırıklarda kemiği çevreleyen yumuşak dokunun ve dolayısıyla besleyici arterlerin zedelenmesi sonucu oluşur. Kırığı yaratan enerji ne kadar yüksekse çevre yumuşak dokular ve kemikteki dolaşımsal hasar da o derece yüksek olmaktadır. Kemik parçalarının devaskülerize olduğu, periostun sıyrıldığı ve parçalandığı durumlarda oluşan nekrotik parçalar ve geniş defektler atrofik kaynamamalar için ciddi risk oluşturmaktadırlar. Kardalani ve arkadaşları, tip III açık kırıklarda kaynamama oranını % 20-30 arasında bildirmişlerdir[70] . Reed ve arkadaşları da, atrofik kaynamamalarda kan damarlarının sayısını normal iyileşen gruptan daha az bulmuşlardır[71].

Metafiz bölgesindeki kırıklar diyafiz kırıklarına göre daha çabuk kaynamakta ve kaynamama oranları daha düşük bulunmaktadır. Bunun sebebi metafiz bölgesinde kemiğin daha iyi kanlanması ve daha çabuk rejenere olmasıdır. Periostta ve kırık parçalarında ciddi hasar olsa bile sıklıkla kaynama problemi oluşmamaktadır[72].

Kırığa cerrahi müdahale sırasında yaratılan yumuşak doku ve dolaşım hasarı da kaynamama gelişiminde etkili bir faktördür. Kırık iyileşmesinde çok etkili olan sitokinler, osteoblastlar ve diğer mediatörleri içeren hematoma boşalması, kemik ve periostun, çevredeki kas ve diğer yumuşak dokularla bağlantısının kesilmesi gibi kırık iyileşmesini olumsuz etkileyecek durumlar cerrahi yaklaşım sırasında en alt düzeyde tutulmaya çalışılmalıdır[73].

Dolaşımı bozarak kırık kaynamasını olumsuz etkileyen faktörlerden biri de kompartman basıncında ki artmadır. Bu durum yumuşak dokulara ve kırık hattına gelen kan akımında azalmaya neden olur. Fasyotomi yapılmasındaki gecikmeyle kırık iyileşme süresindeki uzama arasındaki ilişki literatürde gösterilmiştir[74].

2.5.1.2.2 İleri Yaş

2.5.1.2.3 Cinsiyet

2.5.1.2.4 Ek Hastalıklar

Periferik damar hastalığı, genetik bozukuklar örnek verilebilir.

2.5.2 Nonunion Sınıflandırması

Kaynamamaları temel olarak biyolojik olarak aktif olanlar (canlı/vasküler) ve biyolojik olarak aktif olmayanlar (cansız/avasküler) olarak iki ana gruba ayıran Weber ve Cech'in 1976 da yaptığı sınıflama hala geçerliliğini korumaktadır[75]. Genel olarak bakıldığında, avasküler kaynamamalar kırık iyileşmesinin erken aşamaları üzerine etki eden olumsuz faktörler sonucu oluşurken, vasküler kaynamamalar sıklıkla kırık iyileşmesinin yeniden şekillenme(reorganizasyon) dönemine etki eden faktörler sonucu oluşmaktadır[76].

2.5.2.1 Vasküler Kaynamamalar

Kallus yanıtının iyi olduğu yani kırık parçalarının biyolojisinin iyi olduğu kaynamamalardır. Burada sorunun çoğu mekanik denge kaynaklıdır. İyi kanlanan bir dokudaki hareket periostu uyarak yeni kemik oluşumunu tetiklemektedir. Yeterli denge olsa kemik kaynamaya hazırdır. Dolayısıyla mikro ya da makro-hareketin kırık iyileşmesi ile uyumlu kritik eşik seviyenin altına indirilmesi gerekmektedir. Sintigrafik olarak kanlanmalarının iyi olması nedeniyle yüksek aktivite gösterirler.

Olgular genellikle uzuvlarını kullanabilirler ancak yorulma ya da yüklenme ile ağrı oluşması önemli bir bulgudur. Radyolojik görünüme göre fil ayağı, at ayağı ve oligotrofik olarak üç alt gruba ayrılırlar[77]. Fil ayağı kaynamamaların özelliği hipertrofik ve zengin bir kallus oluşumudur. Sıklıkla yetersiz tespit ya da erken yük verme nedeniyle oluşurlar.

At ayağı kaynamamalarda ise kallus birinciye göre daha azdır. Sebep çoğunlukla başarısız plak-vida tespittir. Metalin dayanabileceği sürede kaynama gerçekleşmez ise tespit materyali kırılır. Bu tip kaynamamaların tedavisinde

biyolojiyi iyileştirici bir ek tedaviye ihtiyaç duyulmaz asıl gerekli olan mekanik olarak varsa şekil bozukluğunun düzeltilmesi ve kaynamama sahasındaki dengenin arttırılmasıdır. Bu da kompresyon plaklama ya da oymalı kilitli intramedüller çivileme gibi internal ya da ilizarov gibi fiksatorlerle eksternal olarak sağlanabilir. Ancak yeterli denge sağlandıktan sonra fibröz kıkırdak kalsifiye olabilir ve yeni damarların penetrasyonu sonucu remodelasyon süreci işleyebilir. Kırık uçlarında rezeksiyon yapılması, canlı kemik dokuda kayıplara sebep olacağı için hatadır[77].

Oligotrofik kaynamamalarda ise kallus görülmez. Kırık uçları canlı olmasına rağmen kaynamamanın sebebi tespitin kırık uçları arasında kabul edilemez boşluklar bırakacak şekilde yapılmış olmasıdır. Kallusun yokluğu kaynamama sahasında hareketliliği arttırarak kemik iyileşmesi için uygunsuz bir ortam yarattığından dengenin arttırılması tedavi için şarttır. Vasküler olmalarına rağmen kemik oluşturmamaları için kemik oluşumunu uyaran osteoprogenitor hücrelerin, osteoindüktif proteinlerin ve osteokondüktif matriksin elde edilebilmesi amacıyla dekortikasyon ve otojen kansellöz greft uygulanması önerilmektedir.

2.5.2.2 Avasküler Kaynamamalar

Bu kaynamama tipinde kemik parçaları cansızdır dolayısıyla biyolojik herhangi bir reaksiyon oluşturma kapasitesine sahip değildirler. Sintigrafik olarak zayıf kanlanmaları nedeniyle düşük aktivite gösterirler. Direkt grafilerde kallus görülmez.

Cansız kaynamamalar 4 alt tipe ayrılır. Kama şeklindeki cansız kaynamamalarda kanlanması bozuk bir ara parça mevcuttur. Bu parça ana parçalardan birine kaynarken diğerine kaynamaz. İkinci tip olan parçalı kaynamalarda nekrotik parça sayısı birden fazladır.

Üçüncü tip kayıplı (defekt) kaynamamalardır. Açık kırık ya da enfeksiyona ikincil olarak bir parça kaybı söz konusudur. Başlangıçta kırık uçları canlı olsada kaybın büyüklüğü kırık iyileşmesinin köprüleyebileceği mesafenin üstündedir. Zamanla bu uçlar da canlılıklarını yitirirler.

Dördüncü tip olan atrofik kaynamamalar ise aslında ilk üç tipin zaman içinde geldiği noktadır. Kırık uçlarının uzun süre içinde kısmen incelendiği, uzuvda da kullanılmamaya bağlı kas atrofileri ve osteoporozun geliştiği genel bir tablodur[77].

Oluşum sebebi esas olarak kırık hattına komşu kemik parçalarının yaralanmanın şiddeti yada kötü cerrahi teknikler neticesinde cansız hale gelmesidir. Kaynamanın sağlanabilmesi için sadece tespitin dengelenmesi yeterli değildir. Cansız kemiklerin uzaklaştırılması, kırık uçları arasındaki fibrotik dokuların temizlenmesi, canlı kemik uçlarının temasının sağlanması ve ilave olarak greftleme ile biyolojik canlandırmada tedaviye eklenmelidir. Cansız bir kemik de canlı bir kemiğe kaynayabilir ancak bunun olmasını sağlayan, nekrotik parçaları uzaklaştıran yeniden şekillenme sürecinin zaman içinde kısalık ve distal parçada osteopeniye yol açacağı unutulmamalıdır. Tedavi seçenekleri içinde seçim kemik kaybının büyüklüğüne göre yapılmalıdır. Bunlar basit kısaltma, karşılıklı kısaltma, kısaltma ve uzatma(kallus distraksiyon) ya da defektli sahanın canlı kemikle köprülenmesi(tibia pro fibula) olabilir.

2.5.3 Nonunionun Değerlendirilmesi

Kaynamama ile gelen her hasta ayrı değerlendirilmelidir. 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. kaynamama bölgesindeki son durum üç temel açıdan değerlendirilmedir. 1) Kaynamama bölgesindeki biyolojik durum 2) Kaynamama bölgesindeki mekanik durum 3) Hasta ile ilgili sistemik sorunların yansımaları. 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 önce ameliyat prosedürleri bilgisi, doğru tedavi planını tasarlamak için kritik

önem taşır. Ayrıca anamnezde önceki yara yeri enfeksiyonları varsa yarı yeri kültürleri sorgulanmalıdır.

Hastanın genel sağlığı ve beslenme durumu sorgulanmalıdır. Malnutrisyon ve kaşeksinin kırık kaynamasını engellediği bildirilmiştir [78]. Nonunionla gelen obez hastalarda da kemiğe ulaşmak için gereken yağ dokusu fazla olduğu için cerrahi sırasında tam bir mekanik stabilizasyon yapmak zordur[79].

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 grafiler 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

Günümüz BT cihazlarıyla her düzlemde yüksek kaliteli görüntü elde etmek mümkündür. Böylelikle kemik köprüleşmedeki yetersizlik değerlendirilebilir. Tibiadaki kaynamamaların tespitinde BT nin yüksek duyarlılığa(%100) sahip olduğu gösterilmiştir [80]. Fakat BT nin en önemli dezavantajı düşük özgüllüğüdür [80]. 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[81].

2.5.3.3.3 Kemik Sintigrafisi

Kaynamamaların büyük çoğunluğu kemik sintigrafisinde normal iyileşme süreci devam eden kırıklarda olduğu gibi yoğun tutulum gösterir[82].

2.5.4 Nonunion Tedavisi

2.5.4.1 Cerrahi Dışı Tedavi

Cerrahi dışı müdahaleler varolan iyileşme sürecini hızlandırabilir veya iyileşme olmayan durumlarda iyileşmeyi başlatabilir. Cerrahi dışı tedaviler direkt ve indirekt girişimler olarak ikiye ayrılır.

2.5.4.1.1 İndirek Girişimler

Yeterli beslenme kemik dahil tüm dokuların iyileşmesi için en temel ihtiyaçtır. İyileşmeyi en uygun düzeyde tutmak için yeterli kalori, vitamin ve protein alınmalıdır[83].

Sigara içenlerde kaynamama veya geç kaynama oranları daha yüksek olarak bildirilmiştir ve bu durumun içilen sigara sayısı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir[84, 85].

Diabet gibi sağlık sorunları da kemik iyileşmesini etkiler ve kaynamama riskini arttırır. Diabet yanında bir veya daha fazla sağlık sorunu olan hastalar kaynamama gelişimi açısından daha yüksek riske sahiptir. Beslenme değişiklikleri ve kan şekeri düzeylerinin kontrol altında tutulması kırık iyileşme sorunlarını azaltmada yardımcı olur[86].

Nikotine ek olarak steroidler, fenitoin, kemoterapötik ajanlar, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar ve bazı antibiyotikler(florokinolonlar) gibi ilaçlar kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkileyebilir.

Son yıllarda hiperbarik oksijen tedavisi bu alanda kullanılmaya başlanmıştır henüz yarar sağladığı yönünde yeterli veri bulunmamaktadır[87].

2.5.4.1.2. Direk Girişimler

Kaynamama için yapılan direk girişimlerden en basit ve uzun süredir kullanılan yöntem fonksiyonel alçı ile yük verilmesine müsaade etmektir.

Kapasitif eşleme, doru akım ve indüktif eşleme gibi bir çok elektrikle uyarma yöntemi kullanılmaktadır. Kırık bölgesinde elektrik potansiyelinin değiştirilmesi ile kaynamayı sağlamayı amaçlamaktadır[88, 89].Düşük yoğunlukta ultrasonun kırıklarda kaynama hızını arttırdığı gösterilmiştir. Taze kırıklarda düşük yoğunlukta ultrason kullanımı ile kaynama süresinin kısaldığını gösteren çalışmalar yayınlanmıştır[90, 91].

Cerrahi tedaviler ile karşılaştırıldığında en önemli dezavantajları kaynamanın sağlanması için gereken sürenin daha uzun olmasıdır.

2.5.4.2 Cerrahi Tedavi

Kaynamamanın cerrahi tedavisindeki temel amaç kemik iyileşmesinin sağlamaktır. Kırık tedavisindeki temel prensipler kaynamamaların tedavisinde de geçerli olduğundan seçilecek tespit şekli, akut kırık tedavisinde kullanılan tekniklerin aynısıdır(Örneğin tibianın middiafizer kapalı kırığı için intramedüller çivi tercih edilmesi gibi)[92] . Tam bir tanı için kaynamama atrofik, oligotrofik, hipertrofik ve psödoartroz oluşuna göre sınıflandırılmalı , vasküler veya avasküler olduğu, septik veya aseptik olduğu belirlenmeli ve eşlik eden deformite tespit edilmelidir. Kaynamamanın sınıflandırılması bölgede iyi temizlik ya da kemik grefti gerekip gerekmeyeceği konusunda yol gösterir.

Hipertrofik kaynamamalarda biyolojik kaynama kapasitesi mevcut iken , mekanik stabilite yetersizliği nedeniyle kaynama sağlanamaz. Bu nedenle hipertrofik kaynamamalarda tedavi mekanik stabilitenin arttırılması yönünde olacaktır. Hipertrofik kaynamamalarda biyolojik iyileşme potansiyeli olduğundan , kaynamama bölgesinin debridmanı ve kemik greftlanması 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[93, 94]. 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 rahatlıkla kullanılabilir. Plaklar distal kaynamamaların yanısıra diafizler bölge kaynamamalarında da kullanılabilir. Her ne kadar, intramedüller çivileme femur, tibia ve bazen humerus akut middiafiz kırıkları için tercih edilen tedavi yöntemi olsa da , bu bölgelerde plak fiksasyonu da kullanılabilir[95, 96].

Plaklar ile kaynamama tamiri sonrası yumuşak doku bakımına özen gösterilmelidir. Genellikle geniş insizyonlar ile uygulandığından, cerrahi sonrası ciddi komplikasyonlar ile karşılaşılabilir.

En önemli dezavantajları intramedüller çivilemeler kadar minimal invaziv bir teknik olmaması buna bağlı yumuşak doku komplikasyonlarının daha sık görülmesidir. Ancak yumuşak doku problemi olmayan durumlarda plaklar her tip kaynamamada kullanılabilir.

2.5.4.2 2 Kaynamama Tedavisinde İntramedüller Çivi kullanımı

Psödoartroz tedavisinde başarılı bir cerrahi sonucun anahtarı, minimal yumuşak doku hasarı ve yeterli fakat en az metalik cihaz kullanımı gerektiren rijit fiksasyondur.

İntamedüller çivi kaynamama tedavisinde 3 tip kaynamama durumunda kullanılır.

- 1) Öncesinde çivi yapılmamış kaynamamalarda çivileme
- 2) Önceden çivi yapılmış ve kaynaması olmayan hastalarda çivi değişimi
- 3) Dinamizasyon.

Bu uygulamalardan hangisi yapılacak olursa olsun çivi tedavisi en çok uzun kemiklerin diyafizleri için uygundur. İntramedüller çivi ile tedavi edilen kaynamamalarda en iyi sonuçlar distal femur ve distal tibia kaynamamalarının tedavisinde elde edilmiştir [97, 98]. Tibia ve femur için çoğunlukla başarılı sonuçlar bildirilmiştir, ancak humerus kaynamamalarında çivi değişimi ile kemik greftleme yapılmadığı takdirde daha kötü sonuçlar elde edilmiştir[99].

Çivi değişimi, çivi yetersizliğinin daha kalın çapta oymalı bir çivi ile giderilebildiği kaynamamalarda uygun bir seçenektir. Yetersiz nedeni, gerekenden daha kısa ve küçük çapta çivi kullanımına bağlı stabilite eksikliği veya kilitleme vidasının kullanılmamasına bağlı rotasyonel instabilitedir. Oyma işlemi periosteal kan akımını arttırarak ve yeni kemik oluşumunu uyarak biyoloji üzerinde olumlu etkilerde bulunurken[100], daha geniş çaplı çivi uygulanması da kortikal teması arttırarak mekanik denge üzerine olumlu etkiler oluşturur[101]. Ayrıca oyma işlemi esnasında oluşan ve içinde osteoblastları ve kök hücreleri barındıran debrislerinde kemik grefti etkisiyle kaynamama bölgesinde medüller iyileşmeye pozitif etkilerinin

olduğu literatürde gösterilmiştir[102, 103]. Mekanik denge yeniden çivileme esnasında çivi çapını arttırmanın dışında çivi boyunu uzatarak ya da kilitleme vidalarının sayısını arttırarak da olumlu yönde değiştirilebilir.

Uzun kemiklerin diyafiz kırıklarında altın standart intramedüller çivileme olduğu için kaynamamada çivi değişimi primer intramedüller çivilemeden daha siktir. Primer intramedüller çivileme daha çok konservatif tedavi uygulanıp kaynamanın sağlanamadığı tibia ve humerus shaft kırıklarında kullanılır.

Hem biyoloji hemde mekanik üzerine olumlu etkileri nedeniyle kanal içi çiviler hem atrofik hem de hipertrofik kaynamamalarda kullanılabilirler[104]. Serilerde kaynama oranları % 75-90 arasında, Femur ve tibia kaynamamalarında çivi değişimi sonrası kaynama oranları %50 ile %90 arasında değişmektedir [105-107]. Ancak kanal içi çivilemenin kortikal çapın % 30-50'sine ulaşan kemik kayıplarında ve parçalı kırıklar sonucu oluşan kaynamamalarda kullanılması çok uygun değildir[108]. Ayrıca açılanma ya da kısalık varsa çivi değişiminden önce bu sorunların osteotomilerle yada uzatmalarla düzeltilmesi önerilmektedir[109]. Geçirilmiş enfeksiyon öyküsü olan kaynamamalarda kullanımı ile ilgili henüz bir fikir birliği oluşmamıştır[93, 110].

Çivi değişimindeki oyma işlemi ile bir miktar lokal kemik grefti birikir bu greftin iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir [111]. Ancak bu lokal kemik grefti büyük defektler için yeterli değildir. Bu nedenle çivi değişimi, açık kemik greftleme işlemi yapılmayacaksa, kemik kaybı olmayan durumlar için daha uygundur.

Kilitli intramedüller çivilemenin diğer cerrahi tedavilere göre belirgin üstünlükleri vardır. Fiksasyon materyalinin mekanik olarak daha güçlü olması, implant yetmezliği sorunlarının çok ender görülmesi, ameliyat sonrası dönemde alçı, atel, breys gibi eksternal tespit gereçlerine ihtiyaç duyulmaması, yumuşak doku hasarı az olduğu için kanlanmanın daha fazla olması ve bunun sonucu kırık iyileşmesinin hızlanması, erken hareket verilebildiğinden daha iyi fonksiyonel sonuçlar ve erken işe dönmeye olanak tanınması, yapılan minimal insizyon sonucu

kanama miktarı ve ameliyat süresinin kısa olması, enfeksiyon oranının düşük olması, açılmal deformite derece ve sıklığının az olması yöntemin önemli üstünlükleridir.

Dinamizasyon çivinin bir ucundaki kilitleme vidalarının çıkarılarak yük verme ile aksiyel kısılmanın sağlanmasıdır. Dinamizasyonla kırık hattındaki defekt küçültülerek kaynama sağlanmaya çalışılır. Kaynamama ve gecikmiş kaynama olgularının %50 sinde dinamizasyon ile kaynama sağlandığı bildirilmiştir[104, 112, 113].

2.5.4.2 3 Kaynamama Tedavisinde Eksternal Fiksator Kullanımı

Kırıkların tedavisinde çok farklı ekstrenal fiksator tipleri kullanılmasına rağmen sıklıkla tercih edilen yöntem Ilizarov'dur. Son zamanlarda, kırık kaynamamalarının tedavisinde Ilizarov eksternal fiksator uygulamaları, çok yönlü yaklaşım olarak değer kazanmıştır. Kırık parçalarının, eksternal olarak düzenlenmesi, gerektiğinde segmentlerin pozisyonlarının değiştirilmesi, ekstremité uzunluğunun ayarlanması, bu şekilde biyomekanik çevrenin değişmesi ve kontrolü, yöntemin en büyük üstünlüklerindendir[114, 115]. Ilizarov ve arkadaşları, 1950'den beri, kendi uyguladıkları yöntem ve fiksatorle, aynı anda, hastanın günlük aktivitelerini kısıtlamadan, eklem fonksiyonlarını koruyarak kaynamayı başarmış, deformiteyi düzeltmiş, uzunluğu yeniden sağlamıştır. Yine bu yöntemle kemik defektleri giderilmiş ve enfeksiyon ortadan kaldırılmıştır.

Ana fikir olarak distraksiyonun dokulardaki canlandırıcı ve gençleştirici etkisine dayanır. Yöntem batıya geldikten sonra hidroksiapatit kaplı yarım çiviler, karbonfiber halkalar ve Stewart Gough menteşeleri gibi teknolojik ilerlemeler kaydetse de temel felsefesi değişmemiştir[116]. İnce tellerin kullanıldığı fiksatorler el, ayak hatta klavikula gibi uzun kemiklerin kaynamamalarında kullanılabilir [117-119].

Distraksiyon osteogenezisinin ve/veya kemik taşınmasının gerekli olduğu ciddi kemik kaybı olan olgularda, çevre yumuşak dokularda yaralanma sonucu oluşan ağır nedbe dokularının varlığında ve canlı kemikte enfeksiyon varlığında

birincil tespit yöntemi olarak tercih edilmelidir. Bu tip olgular tüm cerrahi ile tedavi edilen kaynamamaların yaklaşık olarak % 5'ini oluşturmaktadır[120]. Uzun tespit süreleri, ağrı ve çivi yolu problemleri bu tespit şeklinin dezavantajlarıdır.

Kemiğin belirgin şekilde cansız olmadığı enfekte kaynamamalarda ilizarov yöntemi ile elde edilen stabilite, kortikotominin yarattığı kanlanma ve kaynama süreci ilerledikçe gelişen kemik içi dolaşımın yeniden oluşması enfeksiyonun gerilemesine yardımcı olur. Ancak bu sayılan etkilerden hiçbirinin ölü bir kemikteki osteomyelit üzerine etkili olamayacağı unutulmamalıdır. Bu durumda tedavi seçeneği rezeksiyondur.

Ilizarov, kaynama yokluklarını, sert (hareketsiz ve çok az hareketli) ve gevşek (hareketli) olmak üzere iki gruba ayırmıştır. Klinik olarak yapılan bu sınıflandırma, tedavinin şeklinin belirlenmesinde son derece önemlidir[121].

Sert kaynama yokluğu, radyolojik olarak hemen her zaman hipertrofik olarak gözlenir. Kırık bölgesindeki damarlanma, bol miktardaki yeni kemik oluşumu ile oldukça belirgin ve fazladır. Kaynamama bölgesindeki fibro-kartilajinöz yumuşak doku interpozisyonu, aksiyel yönde uygulanan kompresyon ve distraksiyonla solid kemik yapıya dönüşür. Ekstremitenin düzgün fonksiyonunu sağlamak için yük ekseninin yeniden düzenlenmesi gerekir.

Makaslama kuvvetleri, kallus oluşumunu bozarak, kaynamayı engeller. Dolayısıyla, bu kuvvetler ortadan kaldırılarak, sadece kompresyon - distraksiyon kuvvetlerini ortaya koymak gerekir. Radyografide atrofik olarak gözlenen hareketli, gevşek kaynama yoklukları ise daha çok segmentlerin damar yapısının harap olduğu kırıklarda oluşur. Bu kaynamamaların tedavisinde, kırık stabilitesinin yeniden sağlanmasının yanında, osteogenez için biyolojik bir uyarana da ihtiyaç vardır. Ilizarov yönteminde, bu uyarı, kortikotomi ile distraksiyon ve kaynamama bölgesine uygulanan ilerleyici kompresyonla oluşturulur. Dikkat edilmesi gereken nokta kırık uçlarının sklerotik olduğu durumlarda distraksiyona başlamadan önce bir süre kompresyon uygulanması önerilmektedir[116]. Kortikotomi ve takiben yapılan

distraksiyonla, segmentin tamamında vasküler yapı artar. Kaynamama bölgesine uygulanan kompresyon ise segmentlerin stabilitesini arttırır[122].

İlizarov ile kaynamama tedavisinin en önemli avantajları tamir yönteminin daha az yumuşak doku hasarına neden olması ve varolan deformitenin tedrici olarak düzeltilebilmesidir. Bu sayede akut deformite düzeltilmesi ile oluşabilecek yumuşak doku gerginliklerinden kaçınılmış olur. Bunların yanı sıra, ince düzeltmelerin yapılabilmesi ve erken yük vermeye olanak sağlaması başlıca avantajlarındandır.

2.5.4.2 4 Kaynamama Tedavisinde Artroplasti

Kaynamama tedavisinde artroplasti veya hemiartroplastinin 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 artrit 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[123-125]. 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 kontrendikasyon oluşturur. Artroplasti seçeneği enfekte kaynamamalarda enfeksiyon agresif bir şekilde tedavi edildikten sonra uygulanmalıdır.

2.5.4.2 5 Kaynamama Tedavisinde Amputasyon

Kaynamama tedavisinde kesin bir yöntem olarak amputasyon kaynamayı sağlamaktan, teknik zorluklardan çok, hastanın eşlik eden hastalıkları ve hastanın isteği sonucu uygulanır.

Kaynamama tedavisinde hastaya uygulanması planlanan ek müdahaleler; harcanacak gerekli zaman ve çaba, kazanılabilecek relatif fonksiyonel, kozmetik ve nörolojik potansiyel başarı ve başarısızlıklar, objektif bir şekilde değerlendirilerek tartışılmalı ve tedavi seçenekleri buna göre yönlendirilmelidir.

2.6 Kaynamama Tamirine Ekler

2.6.1 Otojen Kemik Greftleme

Greftlemede otojen kemik grefti klinik standart olmaya devam etmektedir. Otojen kemik grefti osteojenik ve osteokondüktif maddeler sağlar. Büyük boyutlu greftler için iliak kanat en sık kullanılan bölgedir ve %90'ı aşan kaynama oranlarına sahiptir[95, 126]. Otojen greftlemenin dezavantajı alınabilecek greft miktarının kısıtlı olmasıdır. Otojen greftleme atrofik ve bazı oligotrofik kaynamamalarda ve bazı psödoartroz tamirlerinde kullanılır.

Yakın zamanda 'Oyucu-İrrigatör-Aspiratör' (Synthes, Paoli, PA) adında femoral kanaldan otojen greft alınmasını sağlayan daha a invaziv bir yöntem sunulmuştur. Cihaz kullanılırken oyma sırasında oluşan parçalar aspiratör ile emilir ve toplanıp greftleme amacıyla kullanılabilir.

2.6.2 Vaskülarize Greftler

Mikrocerrahi tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak vasküler pediküllü serbest kemik greftleri özellikle enfekte ve defektli psödoartrozlarda başarıyla kullanılmaktadır. Vaskülarize greftler en çok segmental defektlerin tedavisinde kullanılır. Bu tarz durumlarda daha avantajlı olmalarının nedeni canlı bir kemik grefti olmaları ve standart iliak kanat kansellöz otogreftinde bulunmayan yapısal özelliklere de sahip olmalarıdır. İliak kanat ve kotlar da kullanılabilmesine rağmen fibula en çok kullanılan kemiktir.

Greftlenen kemiğin başarılı bir şekilde kaynayabilmesi için her iki uça da belirli bir derecede hipertrofiye uğramaları gerekir[127]. Daha güçlü ve daha hızlı stabilite sağlamak amacıyla kansellöz greftlerle birlikte çift vaskülarize greftler kullanımı önerilmiştir[128]. Ancak mikrovasküler anatomozlar gerektirdiği için

teknik olarak güç bir işlemdir. Koplikasyonlar arasında tekrarlayan greft kırıkları ve donör alan morbiditesi sayılabilir[129]. Bunun yanısıra özel cerrahi gerektirmesi, uzun süreli tespit, yüksek oranda kaynama güçlüğü, tibia-fibula çap farkı, host kemik bileşkesindeki stres konsantrasyonu nedeniyle kırık riskinin fazla olması yöntemin sakıncaları olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.6.3 Kemik Grefti Benzeri Materyaller

Otolog kemik grefti son zmanlarda, kaynamamalarda kemik grefti olarak standart kriter haline gelmiştir. Otolog kemik greftine alternatif olarak, demineralize kemik matriksi (DBM), kemik iliği aspiratı, plateletten zengin plazma, allogreft ve seramikler geliştirilmiş ve kaynamama tedavisinde çeşitli başarı oranları ile kullanılmışlardır.

Kaynamama tedavisinde greft benzeri materyallerin avantajları hasta morbiditesinin azalması veya hiç olmaması, ayrıca otolog kemik greftine göre sınırsız miktarda elde edilebilmesidir. Kaynamama tedavisinde ideal greft benzeri madde; ucuz, istenilen miktarda, hazırlaması ve kullanımı kolay, implantasyonu kolay, yan etkisiz ve %100 etkili olmalıdır.

Sözü edilen greft benzeri maddelerin her biri bu özelliklerin bir kısmına sahiptir ancak hepsine birden sahip olanı yoktur. Bu maddeler yapılan kaynamama tamirlerinde yüksek oranda iyileşme bildirilmiştir ancak direkt olarak otolog kemik grefti ile karşılaştırma yapılan çalışma çok azdır[10, 130, 131].

İliak kanattan alınan kemik iliği aspiratının, osteoprogenitör hücreler içerdiği ve hem osteojenik hem de osteoindüktif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir[132]. Ancak optimal sonuçların elde edilmesi için konsantre hücrelerin kaynamama bölgesine açık debridman sonrası osteokondüktif bir taşıyıcı ile birlikte uygulanmasının mı, yoksa bu bölgeye perkütan olarak direkt enjekte edilmesinin mi faydalı olacağı konusunda tartışmalar mevcuttur[133].

Trombositten zengin plazma (PRP) periferik kanın santrifüje edilmesi ile oluşan berrak plazma ile eritrositler arasındaki ince tabakadan alınır. Bu sıvı

osteoblast proliferasyonu ve diferensiyasyonunu uyardığı düşünölen konsantre trombositler içerir[134]. Ancak řu anda PRP'nin kaynamama tedavisinde kullanımını destekleyen güncel klinik kanıtlar bulunmamaktadır.

Seramikler (kalsiyum sülfat, kalsiyum fosfat, beta trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit gibi) ve allogreftler gibi diğör kemik grefti benzeri materyaller osteoindüktif ve osteojenik özelliklere sahip değildirler ve kaynamama tedavisinde kemik iyileşmesini uyarmada çok az role sahiptirler. Bu materyaller öncelikle osteokondüktiftirler ve osteoindüktif bileşenlerle birlikte kullanıldıklarında hacim arttırıcı veya taşıyıcı olarak faydalıdırılar.

2.7 Segmenter Kemik Kaybı Olan Kaynamamaların Tedavisi

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

2.7.1 İlizarov tekniğı ile kemik defektlerinin tedavisi

Çeşitli nedenlerle kemikte oluşın defekt ve bunun sonucunda ortaya çıkan potansiyel kısalık ve instabilitenin tedavisinde standart yöntemler çoğı zaman yeterli olmaz. Enfeksiyon, segmental kemik kaybı ve kötü yumuşak doku örtüsüne sahip bir kaynamama durumunda, internal fiksasyonla birlikte greftleme tekniklerinin kullanılması yeni enfeksiyon kaynağı olup, tercih edilen bir yöntem değildir. Kemikte anatomisinin ve fizyolojinin bozulduğı bölgede, az materyal ile yeterli stabilizasyonu sağlaması 'İlizarov Tekniğinin' bir avantajıdır.

2.7.1.1 Uygulama Tekniği

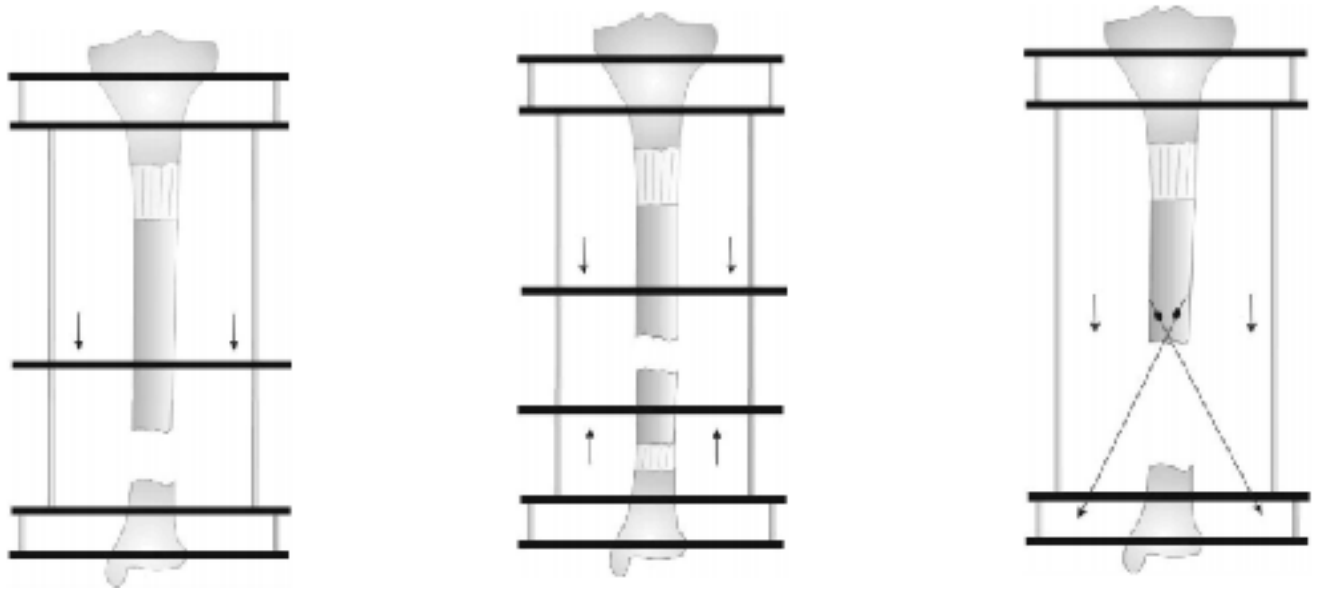
Segmenter defekti olmayan kaynamamaların ilizarov ile tedavisinde kaynamama bölgesinde basit kompresyon veya distraksiyon ya da bu ikisinin kombinasyonu kullanılır. Kemik defekti olduğuunda ise distraksiyon bölgesine kortikotomi yapılır, bifokal veya trifokal olarak uygulanabilir. Kemik distrakte edilirken, defektin olduğu bölgeye ise kompresyon yapılır. Bu metod son 20 yıldır tibia defektli hastaların tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır[135, 136].

İlizarov sadece K-teli kullanılarak uygulanabileceği gibi, K-teli ile Schanz vidalarının birlikte kullanıldığı hibrid sistem şeklinde de uygulanabilir. Aynı seansta kemik defektine uygun uzaklıkta bir mesafeden, tercihen metafizyodiafizyal bölgeden kortikotomi uygulanır. Yedi-on gün süreyle primer kallusun oluşması beklenir, sonra distraksiyona başlanır. Geçmiş yıllarda oluşan kemiğın kalite ve miktarını etkileyen faktörler incelendiğinde, kortikotomi tipi ve distraksiyon ritmi üzerinde en çok durulan konular olmuştur. Osteotominin tipi üzerinde yapılan tartışmalarda, periosteal ve endosteal yapılar gibi kemik iyileşmesi için önemli olan dokuların korunduğu, perkütan kortikotomi veya kompaktotominin değeri üzerinde fikir birliği mevcuttur[137]. Ancak kortikotomi sırasında intramedüller damarsal yapıları korumak her zaman mümkün olmamaktadır. Bununla birlikte yaralanan damarların bir hafta içinde yeniden rekanalize olduğu mikroanjiyografik yöntemlerle gösterilmiştir. Bu sonuçtan hareketle, periost korunarak ve yeterli süre beklenerek distraksiyon yapılması durumunda en güvenilir ve basit yöntem transvers osteotomidir. Transvers osteotomi ile perkütan kortikotomi arasında, oluşan yeni kemik dokuların kalitesi açısından fark olmadığı da deneysel olarak gösterilmiştir[137]. En uygun distraksiyon miktarının bir günde 0.7- 1.4 mm arasında olması gerektiği deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir[137, 138]. İlizarov ise, en az günde 4 defa olmak üzere 1 günde 1 mm uzatmayı önerir, mümkünse bu otodistraktörle yapılmalıdır[137].

Distraksiyon osteogenezinde etkili bir diğer faktör de fiksasyonun stabilitesidir. İlizarov, osteotomi bölgesinde arzu edilmeyen hareketleri önleyecek

şekilde stabiliteyi sağlamalıdır. Sistem ancak kemik aksına paralel mikro hareketlere izin vermelidir. Tek kortikotomi uygulanarak bir segmentin transport edildiği distraksiyon osteogenezi bifokal yöntem olarak isimlendirilir(Şekil 8). Eğer iki kortikotomi uygulanıp proksimal ve distalden iki segment defekte doğru taşınıyor ise trifokal yöntem olarak isimlendirilir(Şekil 8).

Kemik fragmanın transportu iki şekilde gerçekleştirilir. Çapraz gergin tellerin bağlandığı halkalarla yada kemik segmentten oblik olarak geçirilen stoplu tellerle ekstremitte boyunca hedef kemiğe doğru ilerletilerek transport yapılır. Bu yöntem, defektte birlikte kısalık ve deformite tedavisine de imkan sağlar ve 5-7 cm kadar defektlerde kullanılabilir[115]. Oblik tellerle transport sırasında ciltte herhangi bir yaralanma söz konusu değildir. Ancak bu uygulamada transport edilen fragman hedef bölgeye ulaştığında bu teller eğildiğinden yeterli kompresyon yapılamaz ve bu aşamada halka sistemine geçmek gerekir. Bu transport tekniği, defektte birlikte kısalık ve deformite tedavisi için uygun değildir. 7-10 cm üzeri defektlerde kullanılmalıdır(Şekil 8). Defekt 15 cm'den fazlaysa iki seviyeli kortikotomi yapılmalıdır.



Şekil 8 - İlizarov tekniği ile kemik defektinin tedavisi

2.7.2 Masquelet Tekniği İle Kemik Defektlerinin Tedavisi

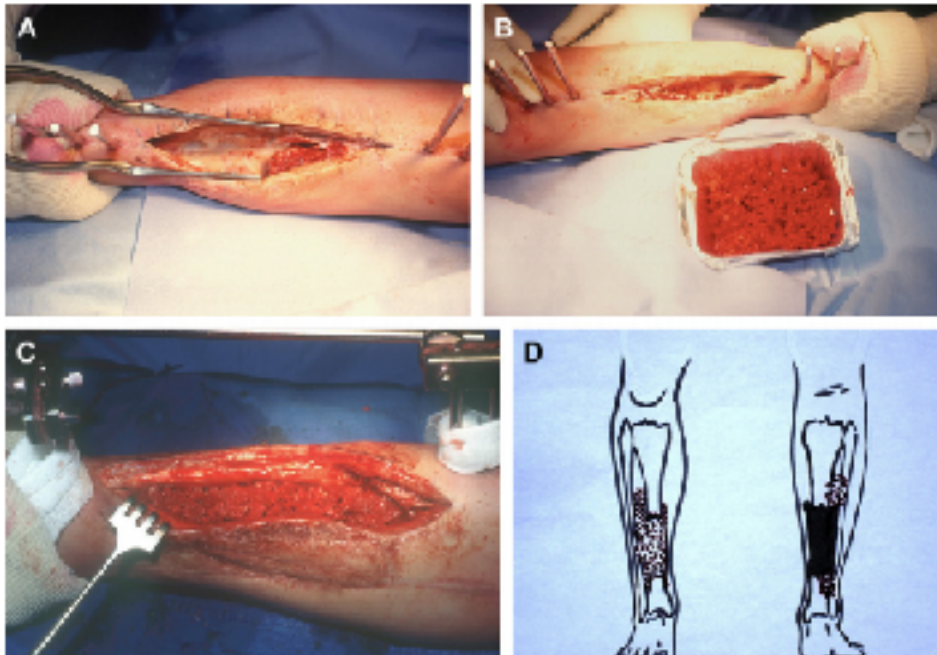
Uzun kemiklerin geniş diyafiz defektlerinin rekonstrüksiyonu genellikle kemik kaybının etiyojisi ne olursa olsun ekstremité kurtarma için en büyük zorluktur. En sık ve en yaygın kullanılan metodlar vaskülerize fibula grefti ve ilizarov ile distraksiyon osteogenezi işlemidir. Kemik otogreftleri defekt 4-5 cm nin üzerinde olduğu zaman önerilmez. Çünkü diyafizyel defekt 5 cm nin üzerine çıktığı zaman greft iyi kanlanan bir kas dokusu zarfı içinde dahi olsa rezorpsiyona uğrar ve kaynama gerçekleşmez [3, 139]. Masquelet indüklenmiş membran ve kansellöz otogreftlerin kombine edildiği bir prosedür önermiştir[140]. Masquelet ilk olarak bu tekniği 1986'da 4-25 cm arasında değişen defektleri olan 35 vakada başarılı bir şekilde uyguladığını bildirmiştir[141, 142]. Hatta bu tekniğin defekt alanı enfekte olsa veya radyoterapiye maruz kalsa dahi otogrefti koruyacak membranı oluşturduğu bildirilmiştir[2, 141].

2.7.2.1 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 çimentonun üzerini yabancı cisim reaksiyonuna bağlı bir membran kaplar. 6-8 hafta sonra ikinci aşamada

çimentonun üzerini kaplayan membrana zarar vermeden çimento çıkarılır(Şekil 9A) ve kaviteye iliak kanattan alınan otolog kemik grefti uygulanır(Şekil 9B). İliak greftin yeterli olmadığı zaman kansellöz kemik grefti 3'e 1 oranla karıştırılarak da kullanılabilir[142]. İlk aşamada çimento uygulanırken ikinci aşamada membranın zarar görmeden kaldırılabilmesi için sadece defekte değil etraf kemik dokuya da sürülmesi gerekir(Şekil 9C). Ayrıca ikinci aşamada greft uygulandıktan sonra membranın ve etraf yumuşak dokunun greftin sınırlandırılabilmesi için sıkıca dikilmesi gerekir(Şekil 9D) [142].

Çimentonun başlangıçtaki rolü ekstremité uzunluğunu sağlamak ve fibröz dokunun yerleşmesini engelleyerek ilerideki greftleme alanını hazırlamaktır. İkinci rolü ise kemik greftini revaskülarize edecek ve rezorpsiyonunu önleyecek membranın indüksiyonunu sağlar[2, 140-142]. Klauke ve ark 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[143].



Şekil 9 - Masquelet Tekniğın Uygulanışı [142]

2.7.2.2 Yabancı Cisim Reaksiyonu ile İndüklenmiş Membran Oluşması

Yumuşak doku iyileşmesinin bir parçası olan granülasyon dokusu formasyonu yabancı cisim reaksiyonunda da izlenir [144]. Yabancı cisim reaksiyonu yabancı materyalin vaskülerize yumuşak dokuda meydana getirdiğı yaralanma ile başlar. Bu yaralanma doku rejenerasyonuna ve granülasyon dokusunun yoğun fibrozis , kemik veya diğerk mezenkimal dokuya matürasyonuna neden olabilen bir akut inflamasyon fazını başlatır. Uygun olmayan durumlarda ise kronik inflamasyon gelişir ve doku matürasyon sürecini etkiler. Enflamatuvar reaksiyonun derecesi, kalitesi ve süresi doku ortamının optimizasyonu (tüm ölü doku ve enfeksiyonun debridmanı, yeterli vaskülarizasyon) ile değıştirilebilir. 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 materyalı sarar daha sonra inflamatuvar reaksiyonun sonunda bu granülasyon dokusu matür fibröz kapsüle dönüşür [145].

2.7.2.3 Oluşan Membranın Histolojisi

Masquelet ve ark 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 [141]. Pelissier ve ark tavşan modelinde PMMA çimento spaceri ektopik olarak subkutan dokuya implante ederek büyüme faktörlerini (BMP-2, TGFβ1, VEGF) salgılayan osteojenik ve vaskülojenik / anjiyojenik özelliklere sahip membranın oluştuğunu ve bu membranın osteoblast diferansiasyonunun arttığını tarif etmişlerdir [2]. Viateau ve ark yaptığı çalışmada membranda CBFA1 + hücrelerin bulunduğunu bundan dolayı membranın

osteoprogenitör hücrelere sahip olduğunu bildirmişlerdir[146]. Henrich ve ark PMMA spaceri ektopik subkutan dokuya değilde 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[147].

2.8 Konsantre Growth Faktör (CGF)

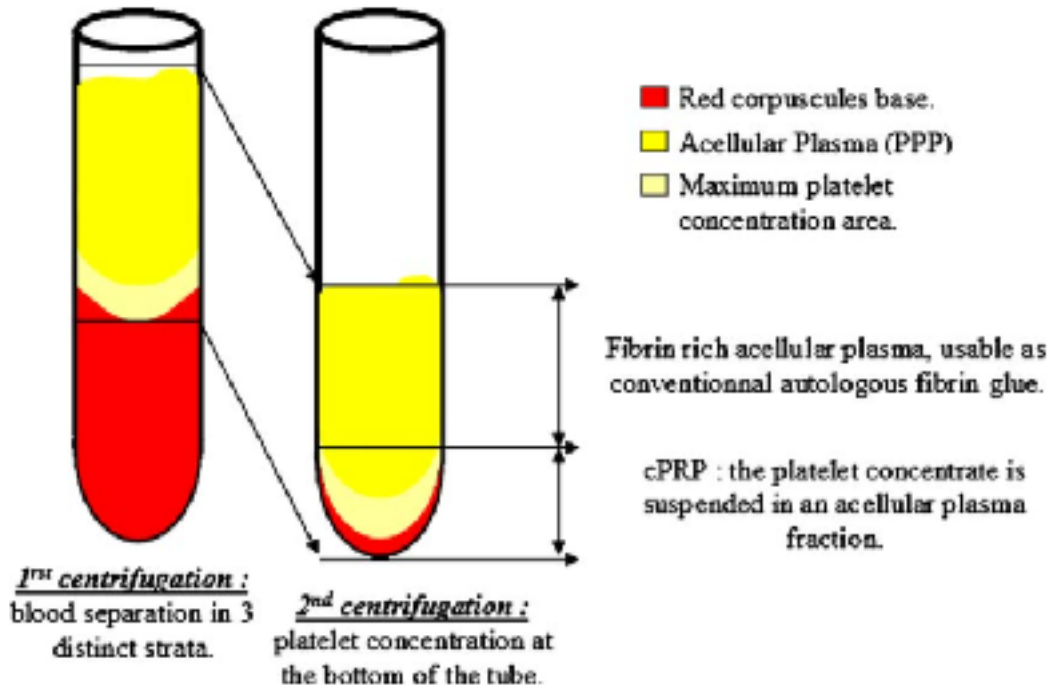
Yara iyileşme süreci birçok intraselüler ve ekstraselüler medyatör tarafından yönetilir. Klinikte kemik ve yumuşak dokuların iyileşmesini hızlandırmak için trombosit konsantrasyonları kullanılmaktadır.

Trombositlerin doku tamiri ve vasküler yeniden şekillenmede daha önceden bilinmeyen bir rolü olduğu ve inflamatuvar ve immün yanıtın aktif oyuncularını olduğu belirtilmektedir[148]. Biyolojik olarak aktif proteinlerin ve diğer maddelerin serbest bırakılmasıyla birlikte, hücrelerin göç, büyüme ve morfogenezini düzenleyerek bu süreçlere etki edebilir hale gelirler. Bu maddeler, aktive olmuş trombosit yüzeyinde ya bulunurlar ya da serbest bırakılırlar. Hücre dışı komponentleri (kollajenler, glikozaminoglikanlar, adheziv proteinler) veya pıhtının fibrin ağı, matrikste aktif olan metalloproteazlar (MMPs) tarafından sekonder olarak serbest bırakılan depo havuzunun oluşturulmasına ek olarak, trombositlerden elde edilen büyüme faktörlerini ve hücre göçünü kolaylaştıran kemotaktik gradientleri kuran sitokinleri birbirine bağlar. Büyüyen pıhtının içindeki trombositlerin salgılama yeteneği daha sonradan doğal hızlanmayı iyileştirecek, büyüme faktörleri ve sitokinlerden oluşan doğal bir terapötik kaynak oluşturmaktadır[149].

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[150].

Son zamanlarda, trombosit, büyüme faktörleri, lökosit ve fibrin matriks elde etmek için trombosit konsantrasyonunu kullanan sayısız teknik geliştirilmiştir [151, 152].

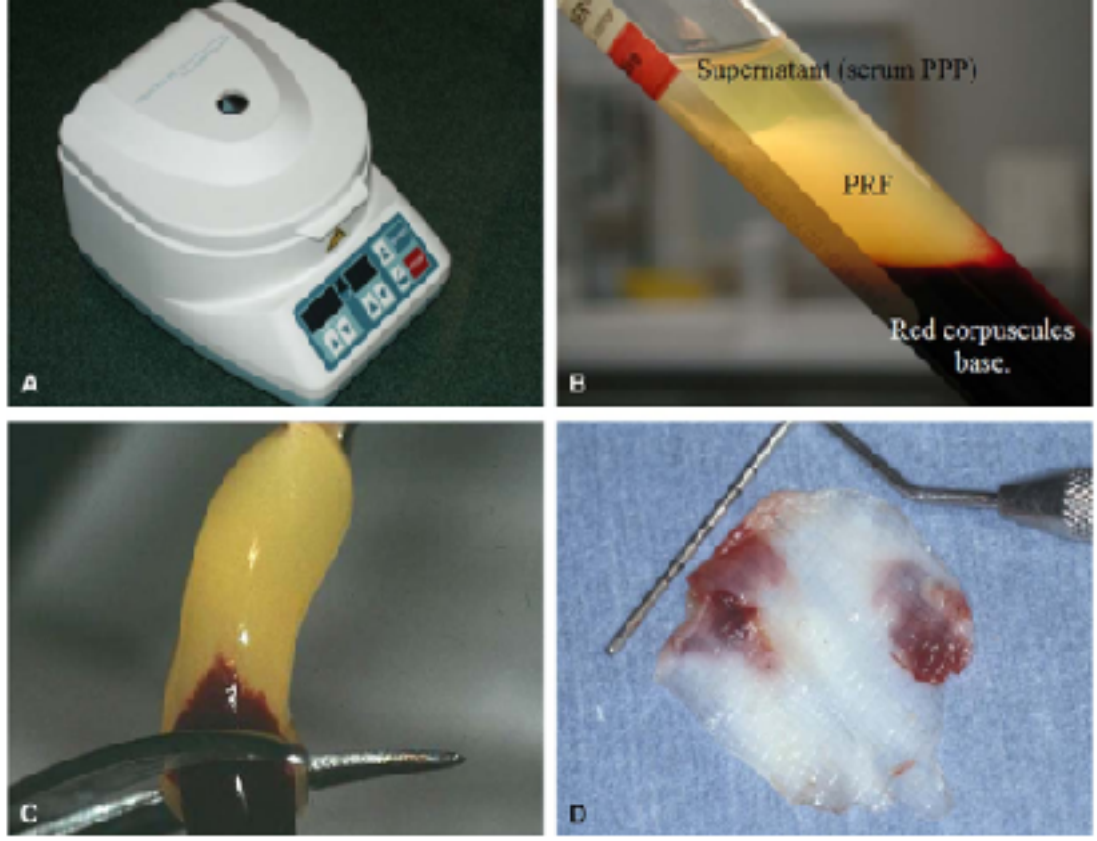
İlk jenerasyon trombosit konsantrasyonu trombosit zengin plazma (PRP) dir. PRP uzun zamandır doku iyileşmesini hızlandırmak için kullanılmaktadır. PRP için kan antikoagülanlı bir tüpe alınır ve santrifüje edilir. Santrifüj sonrası tüpte 3 farklı katman oluşur en üstte aselüler plazma (PPP) en altta kırmızı 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 antikoagülanlı bir tüpe aktarılır ve tekrar santrifüj edilir. Santrifüj sonrası dipte kalan katman PRP olarak adlandırılır (Şekil 10). PRP uygulanırken elde edilen PRP ye fibrin polimerizasyonu ve α granüllerin degranülasyonu için sıgır trombin ve kalsiyum klorid eklenir.



Şekil 10 - PRP nin hazırlanışı

İlk nesil trombosit konsantrasyonu olan TZP'nin insan osteoblastlarında hücre proliferasyonunu ve osteojenik markırları artırdığı in vitro olarak gösterilmiştir[153-155]. 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 [152]. PRP nin hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonu üzerine etkilerinin çelişkili olduğunu bildiren yayınlarda mevcuttur[11].

Choukroun 2000 yılında trombosit zengin fibrin (PRF) adı verilen maksillofasiyal cerrahide kullanılmak üzere yeni bir protokol yayınlamıştır[12, 152]. Bu protokolda 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 (Şekil 11). TZF elde edilirken TZP'den farklı olarak kanın santrifüji ile üç boyutlu fibrin matriks oluşmaktadır. Bu sayede TZF uygulandığı bölgede hemen çözünmez ve yapısını korur. Ayrıca oluşan bu fibrin matriks TZF'nin içeriğindeki büyüme faktörlerinin ortama yavaşça salınmasını sağlar. Yapılan bir çalışmada TZF'in yoğun fibrin yapısı sayesinde üç ana büyüme faktörü olan TGF β -1, PDGF ve VEGF'yi yapısında 7 güne kadar bulundurduğu ve ortama yavaşça salgıladığı tespit edilmiştir [11]. Fibrin yapısı TZF'ye biyoiskelet özelliği kazandırmaktadır. Ayrıca hücre göçünü sağlamaktadır. Bu fibrin matriksin hücrelerin migrasyonunu, proliferasyonunu ,osteoblastik diferansiyasyonunu desteklediği, anjiyogenezi indüklediği, özellikle kemik iyileşmesinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir[156, 157].



Şekil 11 - PRF nin hazırlanışı

PRF nin oluşumu ilk kuşak trombosit konsantrasyonlarına göre daha kolay ve düşük maliyetlidir. İlk olarak 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[158] .Yavaş fibrin polimerizasyon trombositlerden salgılanan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin PRF tabakasındaki glikozaminoglikanlar tarafından yakalanmasını sağlar. Bunun sonucu olarak da PRF

de diğ er trombosit konsantrelerinin aksine yavaş ve devamlı bir sitokin ve büyüme faktörleri salınımı meydana gelir[158].

Konstantre growth faktör(CGF) 2006 yılında Sacco tarafından geliştirilmiştir. Oluşturulma mantığı PRF ile aynıdır. Hastadan alınan kan antikoag lansız 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 [13]. Kemik iyileşmesini hızlandırma amacıyla CGF in kullanıldığı bir çok çalışma mevcuttur[159, 160]. Ayrıca CGF nin kemik iyileşmesine etkisini araştıran in vitro çalışmalar da yapılmıştır[161, 162].

Konsantre Büyüme Faktörü'n n PRP ve PRF gibi diğ er rejeneratif materyallerden en önemli farkı ise, CD34 kök hücreleri içermesidir[13]. Diğ er önemli farklılık ise, fibrin matriksindeki büyüme faktörlerinin densitesi, büyüklüğü ve miktarıdır.

Masquelet tekniğe CGF ekleyerek kemik iyileşmesini inceleyen herhangi bir çalışma yoktur. Bu  alışmamızda 8. ve 12. haftada hayvanlar sacrifiye edilip alınan örneklerde histopatolojik ve radyolojik olarak kemik iyileşmesinin karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma olup Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde 16.05.2017 tarihinde, 2017-0035 sayılı Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınarak yapılmıştır

Yeni Zelanda cinsi ağırlıkları 3500-4000 g. arasında değişen 28 erkek tavşan çalışmaya alındı. Hayvanlar randomize ve her grupta 7 şar tavşan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup I 8. hafta sacrikiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak grup, Grup II 8. hafta sacrikiye edilmek üzere tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup, Grup III 12. hafta sacrikiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak grup, Grup IV 12. hafta sacrikiye edilmek üzere tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup (Tablo 1) olacak şekilde düzenlendi. Tüm gruplardaki tavşanlar 4.hafta Masquelet teknik için konulan sement çıkarılarak tavşan kalçasından alınan kansellöz otogreft ile greftlendi. Her bir kafeste bir tavşan olacak şekilde 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 enjekteable-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

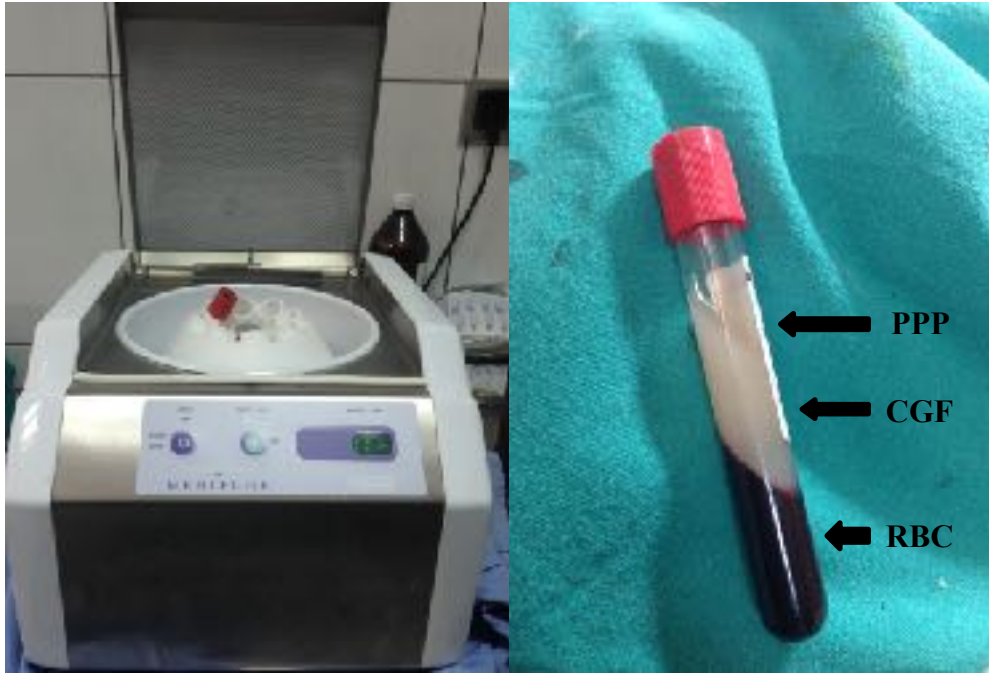
<i>Deney ve kontrol grupları</i>	<i>Açıklama</i>	<i>Grup başına hayvan adedi</i>
Grup I	8. Hafta sacriyiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak grup	7
Grup II	8. Hafta sacriyiye edilmek üzere tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup	7
Grup III	12. Hafta sacriyiye edilmek üzere sadece Masquelet teknik uygulanacak grup	7
Grup IV	12. Hafta sacriyiye edilmek üzere tavşanın kanından hazırlanan CGF + Masquelet teknik uygulanacak grup	7
Toplam		28

3.1 CGF nin Hazırlanması

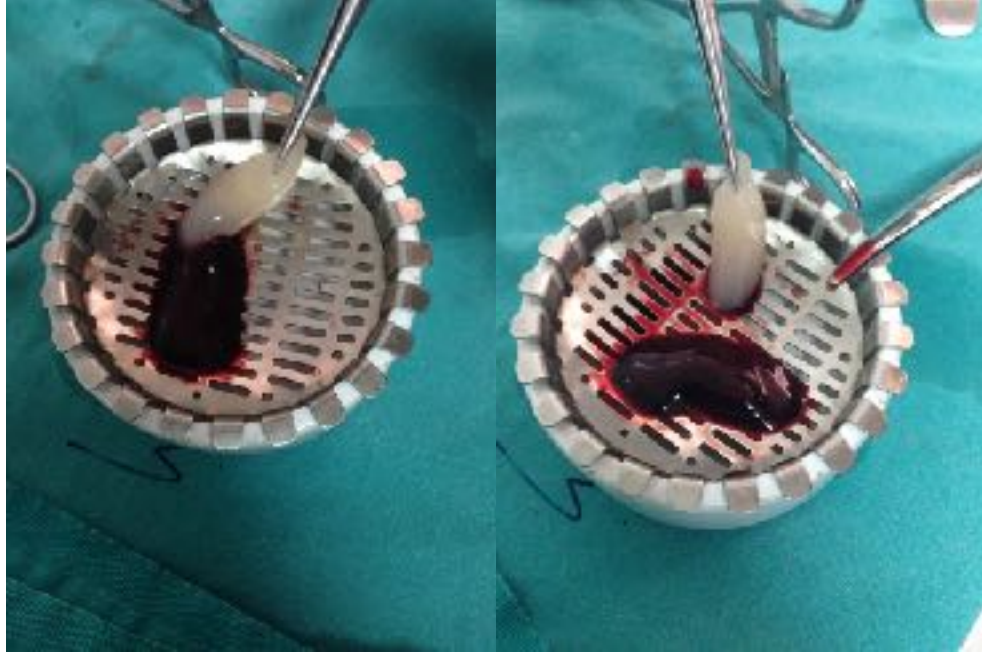
Sacco' nun tariflediği gibi tavşanların kulaklarından alınan 9 ml venöz kan antikoagölansız tüpe(Vacutest® Kima , Arzergrande, Italy) konuldu (Resim 1). Bu tüpler hemen özel bir santrifüj cihazında (MEDIFUGE™ , Silfradentsrl, S. Sofia, Italy) 30 saniye hızlanma , 2700 rpm(600g) de 2 dakika, 2400 rpm(400g) de 4 dakika, 2700 rpm (600g) 4 dakika, 3000 rpm(800g) de 3 dakika ve en sonunda 36 saniye yavaşlama ile santrifüje edildi (Resim 2). 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 2). 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 3). Daha sonra CGF jel presleme maşası ile kullanılmak üzere CGF membranı haline getirildi (Resim 4).



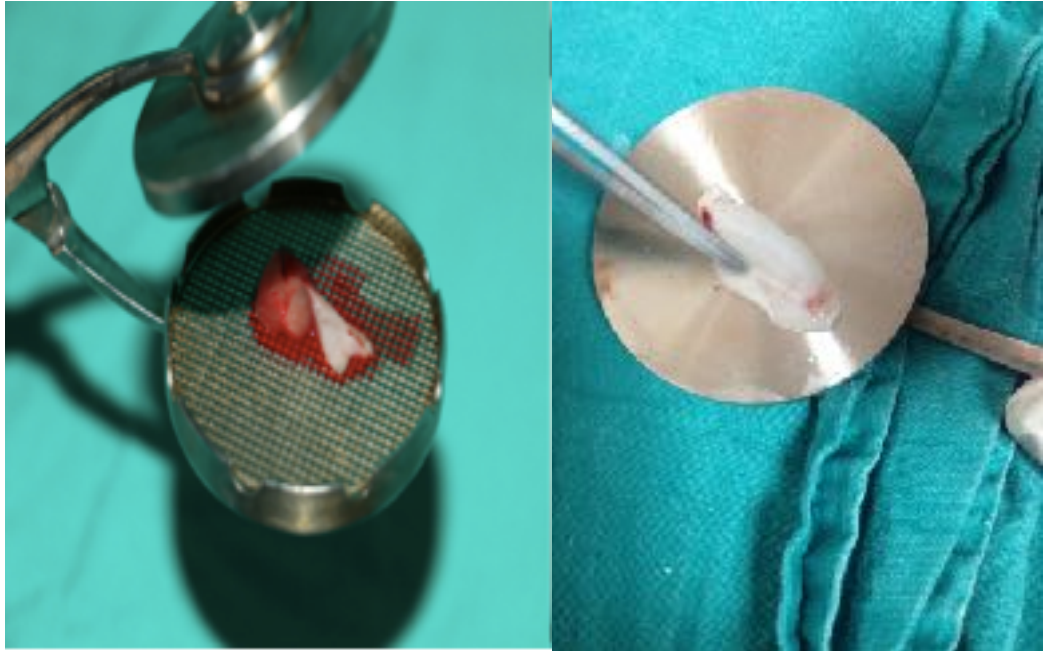
Resim 1. CGF'nin Hazırlanması. 9 ml venöz kan antikoagülansız tüpe(Vacutest® Kima , Arzergrande, Italy) konuldu. Bu tüpler hemen özel bir santrifüj cihazında (MEDIFUGE™ , Silfradentsrl, S. Sofia, Italy) santrifüje edildi



Resim 2. Bu tüpler hemen özel bir santrifüj cihazında (MEDIFUGE™ , Silfradentsrl, S. Sofia, Italy) santrifüje edildi. 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 3. 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. CGF'nin jel presleme maşası ile kullanılmak üzere CGF membranı haline getirilmesi.

3.2 Cerrahi Prosedür

Anestezi sağlandıktan Masquelet Tekniğin 1.aşamasına başlandı. 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. Sağ ön bacak anteriordan radius üzerinden 5 cm lik insizyonla girildi(Resim 5). Kaslar ve periost sıyrılarak radiusa ulaşıldı. İki adet enjektör ucu interosseöz mesafeden gönderilerek radius hem yumuşak dokudan hem de ulnadan ayrıldı. Tavşan radius diyafizinde kritik boyutta kemik defekti yapmak için distal işaretli radiokarpal eklemin 3 cm proksimalinde olacak şekilde 15 mm'lik radius diyafizi işaretlendi. 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).

Defekt antibiyotiksiz PMMA kemik çimentosu (BIOMET, Warsaw, Indiana, USA) ile dolduruldu (Resim 7A). Daha sonra radiusun proksimali ve distali defekt korunarak 1.5 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 7B). Serum fizyolojik ile cerrahi saha yıkandıktan sonra Grup II ve Grup IV'e hazırlanan CGF membran çimento üzerine örtüldü(Resim 7C).

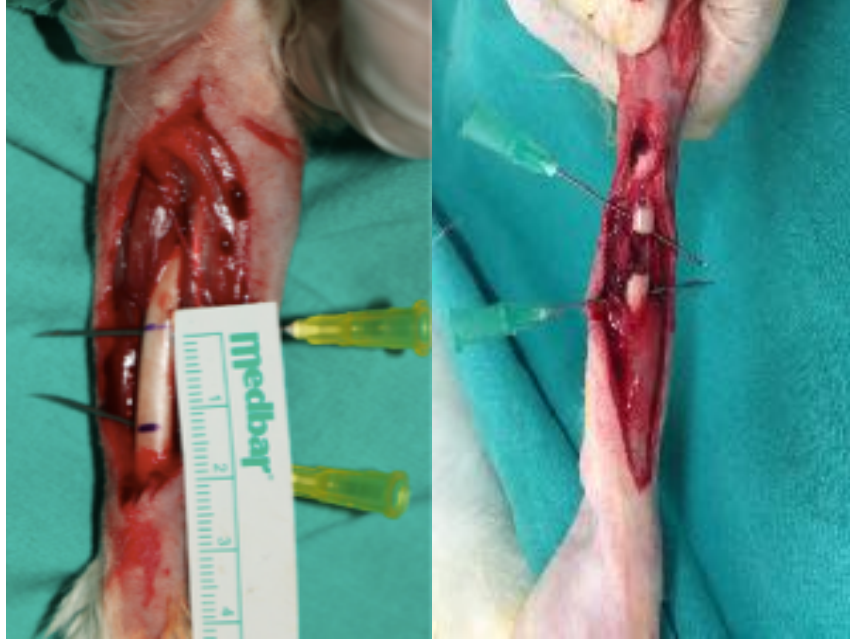
Tüm gruptaki tavşanlara 4.haftalarında anestezi sağlandıktan sonra Masquelet tekniğin 2. aşaması uygulandı. Tavşanlar supin pozisyonda yatırıldı ve sağ taraf ön bacakları eski operasyon sahası Polivinil İodür (Batticon, ADEKA) solüsyonu ile boyanıp cerrahi sterilite sağlandı. Ardından cerrahi saha steril şekilde örtüldü. Sağ ön bacak anteriordan eski insizyondan girilerek konulan çimento çıkarıldı (Resim 8), aynı seansda tavşanın kontrlateral taraf iliak kanadından alınan otolog kemik grefti kaviteye uygulandı (Resim 9). Ardından Kaslar 4-0 vikril sutur ile plak tamamen kapanacak şekilde ,cilt ise 5-0 prolene ile sütüre edildi.

Tüm hayvanlara preop ve postop 48 saat olacak şekilde antibiyotik profilaksisi(55.000 IU/kg , kristalize Penisilin G potasyum) uygulandı.

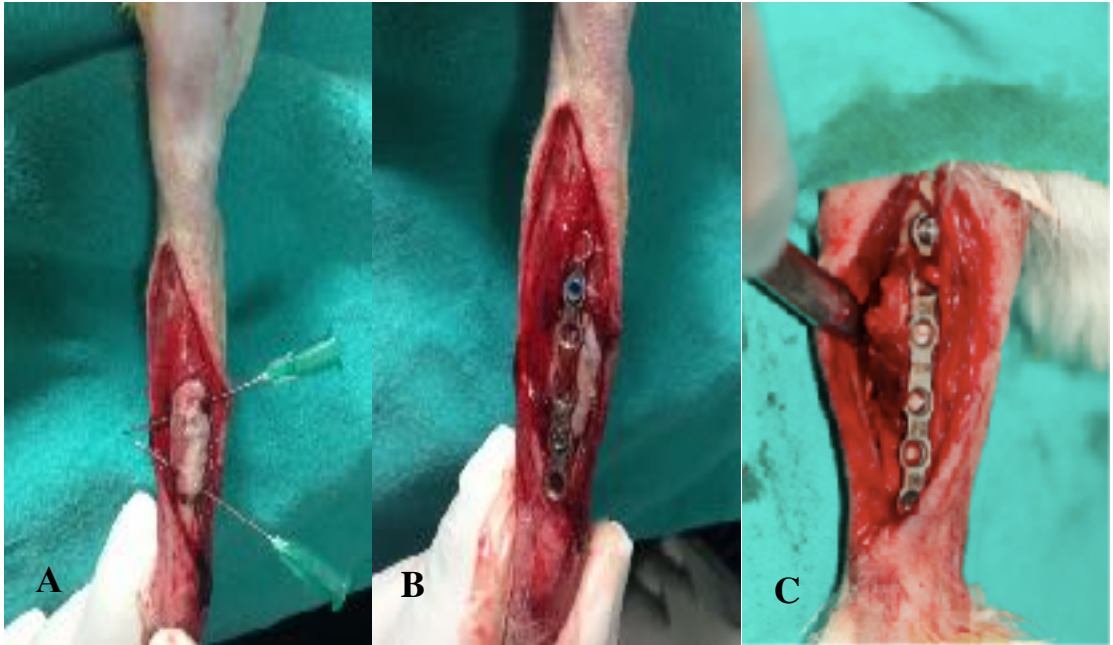
Postoperatif dönemde tavşanlar normal kafes aktivitelerine bırakıldı ve günlük olarak izlendi. Ön bacağı hareketsiz tutmak için herhangi bir tespit aracı kullanılmadı. 1. , 3. ve 5. gün pansumanları yapıldı. Grup I ve Grup II 8. Hafta Grup III ve Grup IV 12.hafta intrakardiyak 3 cc tiopental sodyum verilerek sakrifiye edildi. Ardından eski insizyon üzerinden girilerek cilt, ciltaltı ve kaslar aralandı. Tavşan önkolu eksterne edildi ve patolojik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edildi.



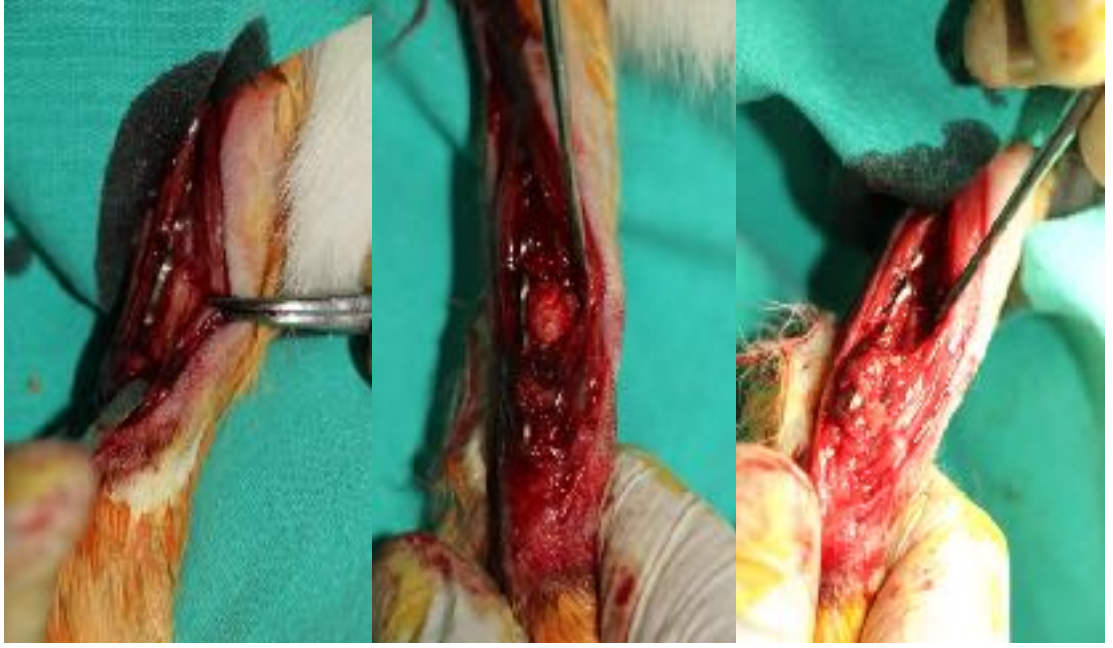
Resim 5. Cerrahi saha steril şekilde örtüldü. Sağ ön bacak anteriordan radius üzerinden 5 cm lik insizyonla girildi.



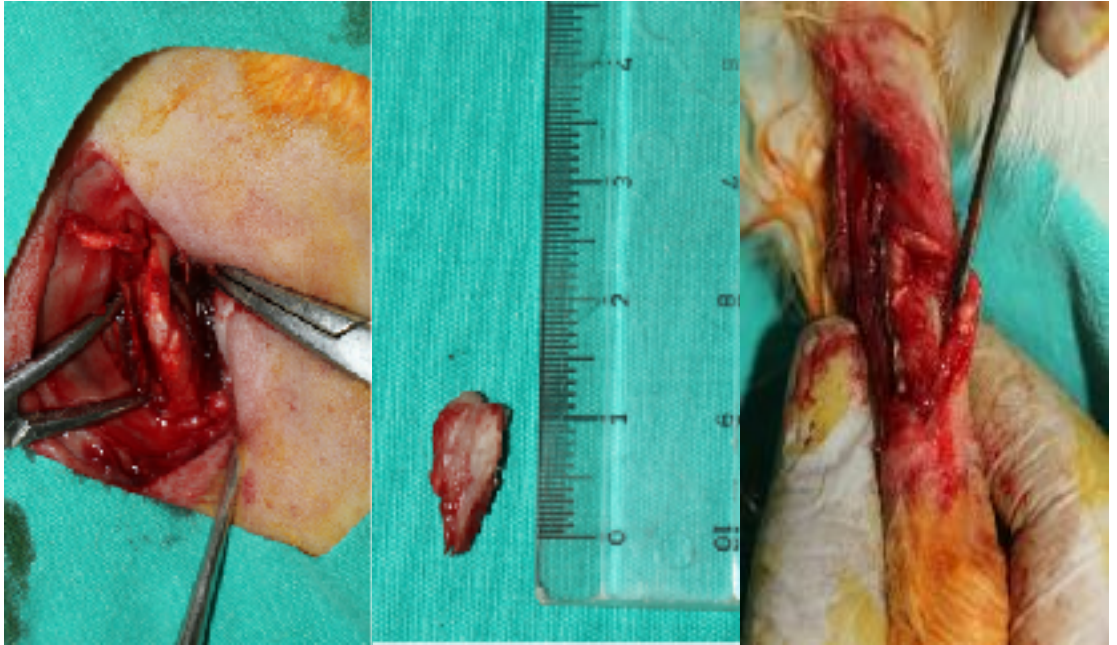
Resim 6. Kaslar ve periost sıyrılarak radiusa ulaşıldı. İki adet enjektör ucu interosseöz mesafeden gönderilerek radius hem yumuşak dokudan hem de ulnadan ayrıldı. Tavşan radius diyafizinde kritik boyutta kemik defekti yapmak için distal işareti radiokarpal eklemin 3 cm proksimalinde olacak şekilde 15 milimetrelilik radius diyafizi işaretlendi. Ardından işaretli yerler 4 numara kıl testeresi ile kesildi ve aradaki kemik çıkarılarak tavşan radiusunda kritik boyutta kemik defekti oluşturuldu.



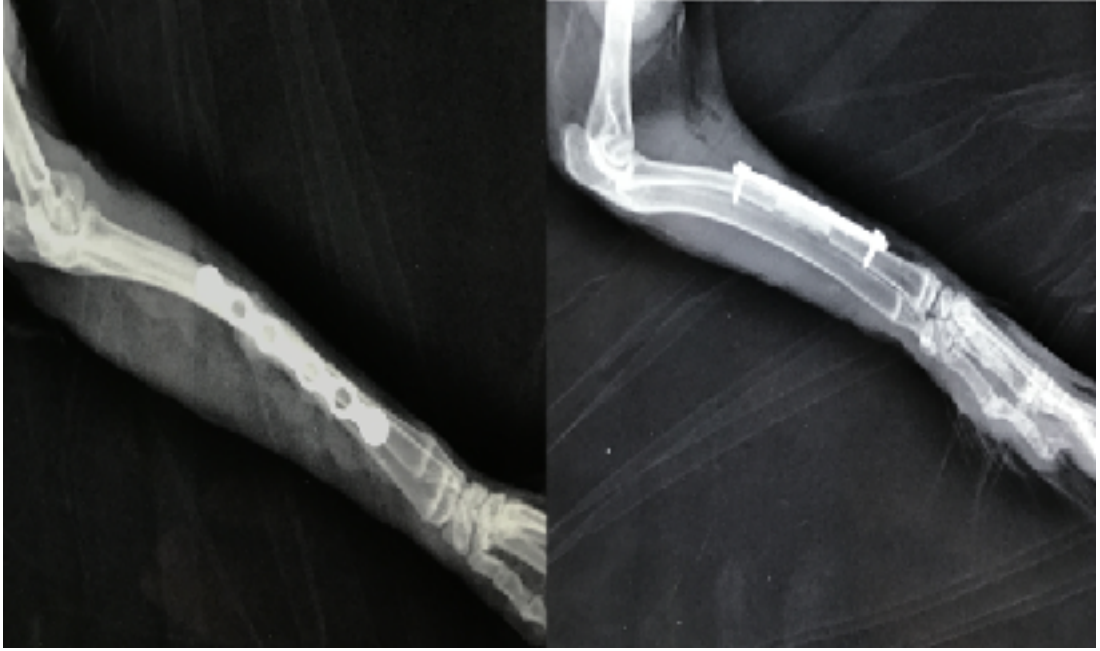
Resim 7. (A)Masquelet tekniğin 1.aşamasında defekt antibiyotiksiz PMMA kemik çimentosu ile dolduruldu. (B)Radius proksimali ve distali defekt korunarak 1.5 mm lik 6 delikli mini plak ve 2 adet vida(bir adet proksimale bir adet distale olacak şekilde) yardımıyla fiks edildi. (C) Grup II ve Grup IV'e hazırlanan CGF membran çimento üzerine örtüldü.



Resim 8. 4 hafta sonra Masquelet tekniğın ikinci aşamasında çimentonun üzerini kaplayan membrana zarar verilmeden çimento çıkarıldı.



Resim 9. Tavşanın kontrlateral taraf iliak kanadından alınan otolog kemik grefti kaviteye uygulandı.



Resim 10. Cerrahi işlem sonrası postop grafi

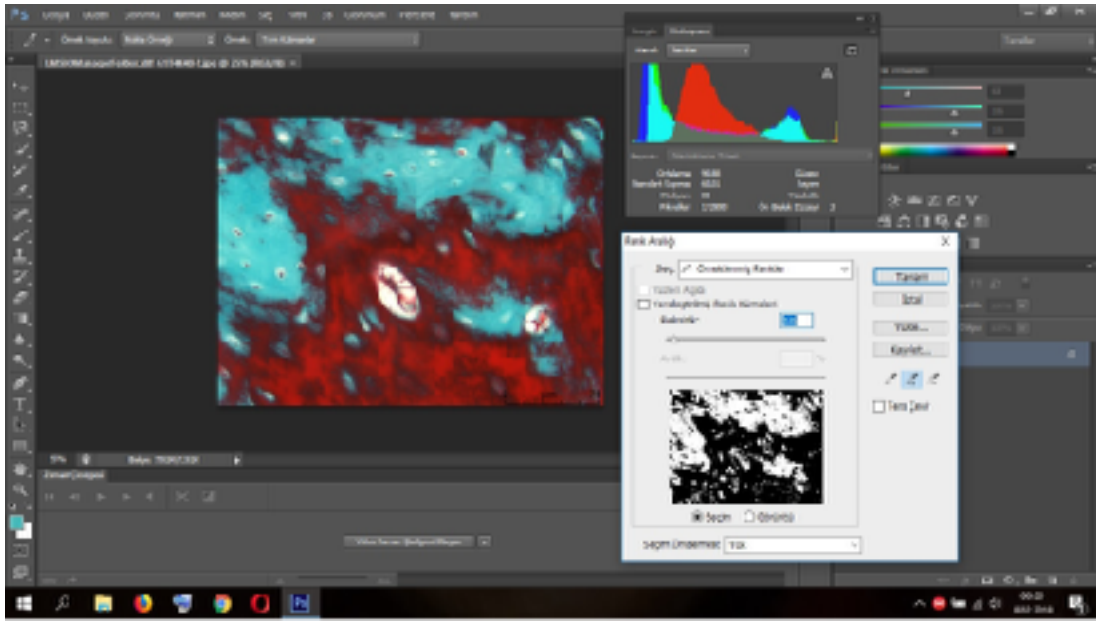
3.3 Histopatolojik Değerlendirme

Sakrifiye edilen 8-12 haftalık tavşanların, ön kol kemiği radius 48-72 saat %10 formaldehit ile fiksede edildi. Kemik örnekleri kesit alma öncesi dekalsifiye edilerek yumuşatıldı. Bu nedenle ortalama 20 gün (202 gün) 300 ml absolu etanol, 50 gr kloralhidrat, 670 ml distile su ve 30 ml %70 nitrik asit ile hazırlanan DeCastroR solüsyonu içinde, solüsyon üç günde bir değiştirilerek tutuldu. Dekalsifiye kemik örnekleri doku takip cihazına alındı ve daha sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan tüm kemiklerde yüzeyden yaklaşık 120 mm derine indikten sonra, 4 mm kalınlığında ve kemik boyuna paralel kesitler alındı. Kesitler boyama öncesi yaklaşık iki saat 65 derece etüvde deparafinize edildi, sırasıyla 30 dakika ksilol ve seri alkollerde muamele edildikten sonra genel histolojik

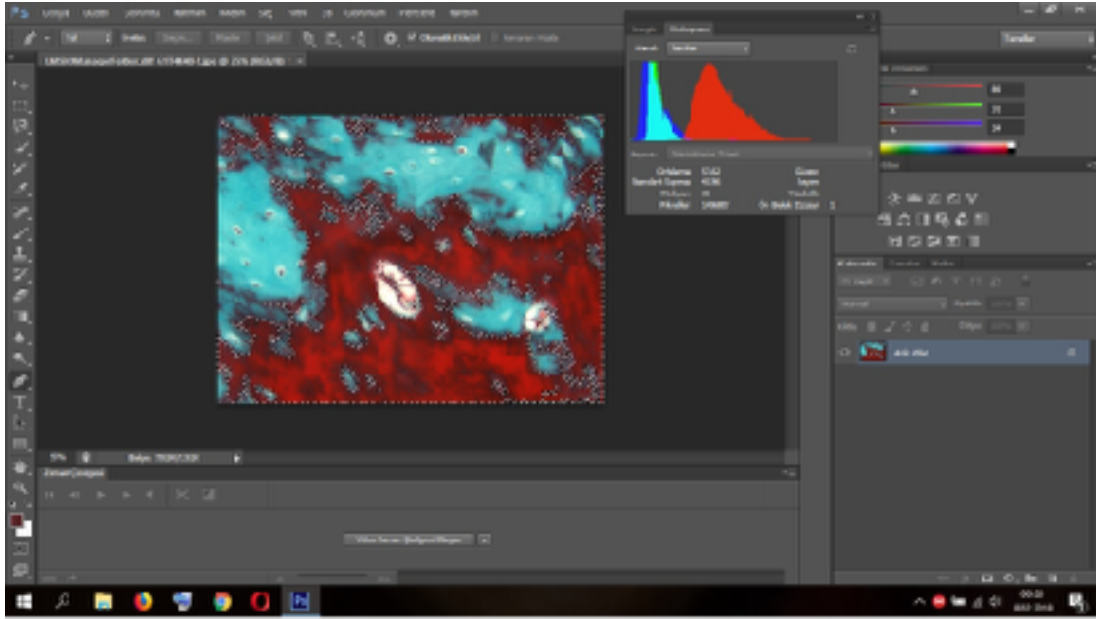
görüntüleme için hematoksilen-eosin (HE) ile boyandı. Yeni kemik oluşumunun değerlendirmesi için örnekler Masson trikrom boyası ile boyandı. Masson trikrom boyaması için 30 dakika ksilol ve seri alkollerde muamele edilen örnekler distile su ile yıkanıp 56 derece etüvde bir saat bouin solüsyonu (pikrik asit 75 cc, %37-40 formaldehit 25 cc, glasiyal 5 cc) içinde bekletilmiştir. Örnekler akarsuda yıkandıktan sonra hematoksilen ile boyanıp, tekrar yıkanmışlar ve sırasıyla asit-alkol ve amonyaklı sudan geçirilmişlerdir. Daha sonra trikrom boyası (kromatop 2R 0,6 gr, light green 0,3 gr, glasiyal 1 cc, fosfotungustik asit 0,8 gr, distile su 100 cc) ile 20 dakika boyanıp asetik asitte açılmış ve ters seri alkollerden geçirilerek kapama yapılmıştır. Örneklerin histolojik değerlendirmeleri Leica DMR (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) ışık mikroskobuyla, fotoğraf çekimleri de Leica Application System (LAS Version 4.2.0, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) programı kullanılarak yapılmıştır. Görüntü analizleri Adobe Photoshop CS6 fotoğraf programı (Resim 11 ve 12) kullanılarak yapılmıştır.

Bu çalışmada fraktür oluşturulan tavşan radiusunda kemik iyileşmesi morfolojisi incelenecektir. Çalışmaya 7 tane sekiz haftalık ve sadece masquelet tekniği ile fikse edilmiş, 7 tane masquelet ile CGF uygulanmış, 7 tane 12 haftalık sadece masquelet ve 7 tane de 12 haftalık masquelet ile CGF uygulanmış tavşan radius'u dahil edilmiştir.

Yeni kemik oluşumunun değerlendirmesinde x4, x10, x20 ve x40 büyütme objektiflerde fraktür alanı görüntülendi. Fraktür uçları arasında boşluk bulunmadığından ya da çok kısıtlı bir granulasyon sahası bulunduğundan; kallus aşamaları ve inflamasyon dokusu değerlendirmesi yapılamadı, yalnızca primer kemik iyileşmesi görüldü[163, 164] ve oluşan yeni kemiğin eski kemiğe oranı ölçüldü. Her örneğin fraktür hattında x40 büyütme ile çekilen beş fotoğrafı değerlendirildi ve yeni kemik/eski kemik oranı ölçümü yapılan beş alanın oranlarının ortalaması alındı[165]. Son değer her örnek için beş alanda yapılan ölçümün ortalamalarının sonucudur. Daha sonra bu ortalama değerler grupların değerlerini bulmak üzere tekrar toplanıp örnek sayısına bölündü.



Resim11. Fotoğraf analizi ile x40 büyütme (toplam piksel değeri: 2764800) olan bir alan görüntüsünün yeni kemik miktarını ölçmek için kullanılan konsol



Resim12. Yeni kemik miktarını ölçmek için kullanılan konsol

3.4.Radyolojik Değerlendirme

3.4.1 Mikro Bilgisayarlı Tomografi

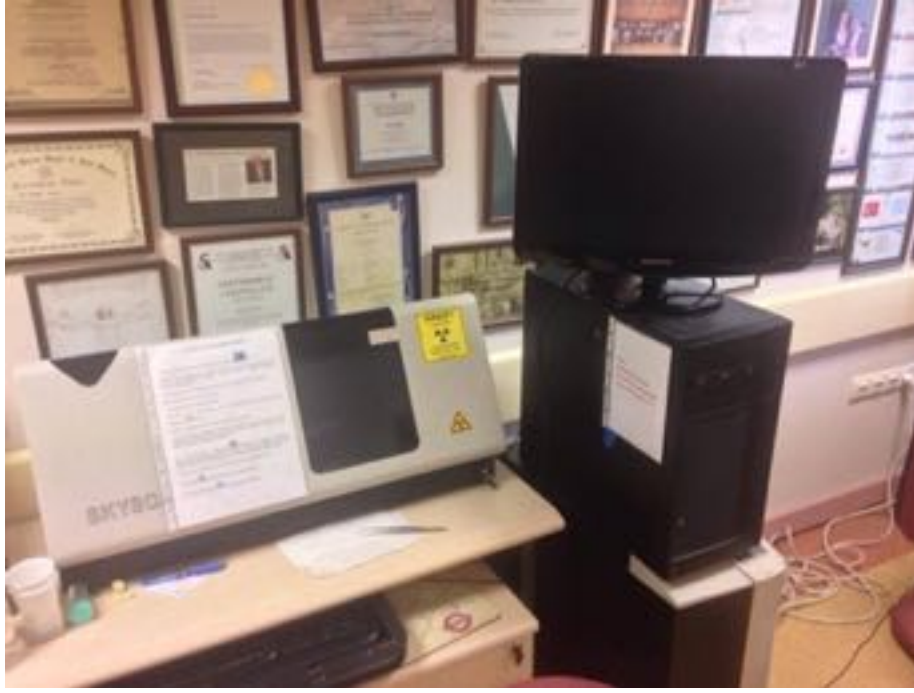
Hayvanlardan alınan örnekler % 5 formaldehit içinde 7 gün bekletildi ardından formaldehidi uzaklaştırmak için su ile durulandı.

Yüksek çözünürlüklü bir mikro-CT sistemi (SkyScan 1174; Bruker-micro-

CT, Kontich, Belgium) (Resim 13) 13.68532 mm piksel çözünürlüğe sahip 0.5 mm Al + Cu filtre kullanılarak 100 kV ve 100 mA'de çalıştırıldı. Kemiklerin taranmasında 360 derece rotasyon kullanılırken, rotasyon adımı 0,50 derece olarak belirlendi. Bu ayarlarda tarama süresi yaklaşık olarak her bir çekim için 80-90 dakika sürdü.

Numunelerin mikroCT taraması sırasında elde edilen veriler, NRecon v.1.6.3 yazılımı (Bruker-micro-CT) ile görüntülere dönüştürüldü (Resim 14). Görüntüler axial, koronal ve sagittal planlarda değerlendirildi (Resim 15). Tüm tavşanların kemiklerinde oluşturulan defektler plak vida uygulaması ile fiks edildi. Proksimal ve distal vida arasındaki saha tüm tavşan radiuslarında eşit uzunlukta, 25 mm olacak şekilde ayarlanarak standardize edildi (Resim 16) ve CTAn v.1.12 yazılımı (Bruker-micro-CT) ile üç planda yeni oluşan kemik dokusu analiz edildi (Resim 17,18,19). Üç boyutlu görüntüler oluşturmak için CTVol v.2.2.1 yazılımı (Bruker-mikro-CT) kullanıldı (Resim 20,21,22).

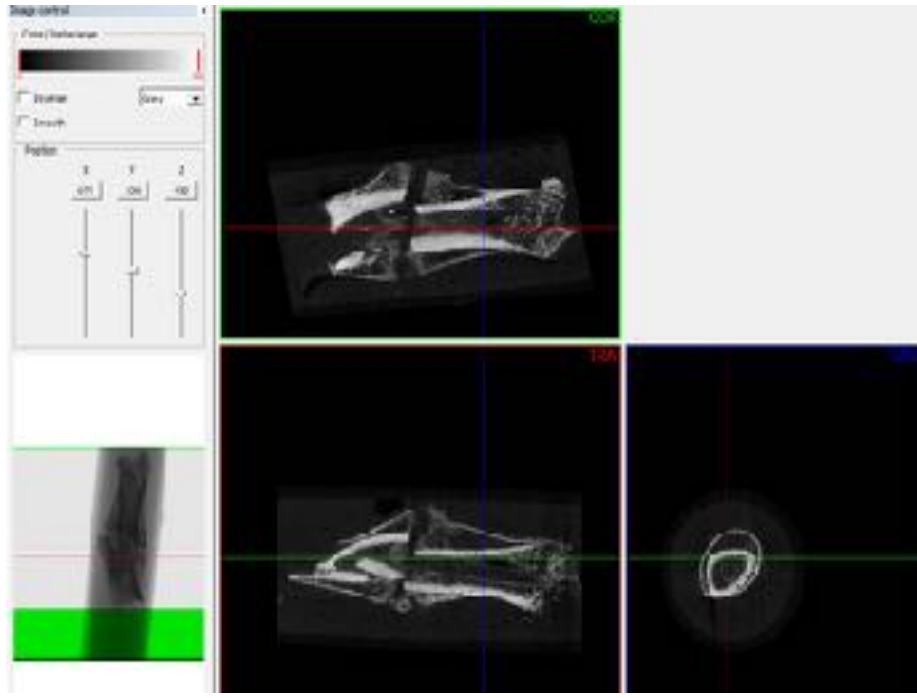
Standardize edilen inceleme bölgesinde Tissue Volume (TV), Bone Volume (BV), Tissue Volume (TV) / Bone Volume (BV) parametreleri değerlendirmeye alındı. Tissue Volume standardize edilen sahada mikroCT ile analiz edilen eski ve yeni kemik oluşumlarını birlikte gösteren total kemik hacimidir. Bone volume ise tavşan radiusundaki defektif sahada oluşan yeni kemik oluşumunu göstermektedir. TV / BV ise yeni oluşan kemik hacimi toplam hacim ile oranlanarak yüzde cinsinden gösteren parametredir.



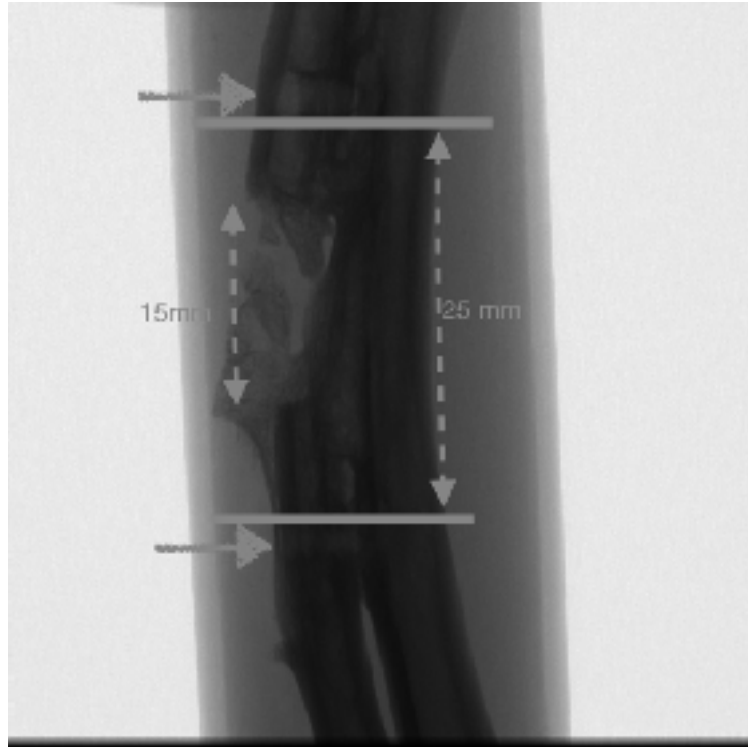
Resim 13. Yüksek çözünürlüklü bir mikro-CT sistemi (SkyScan 1174; Bruker-micro-CT, Kontich, Belgium)



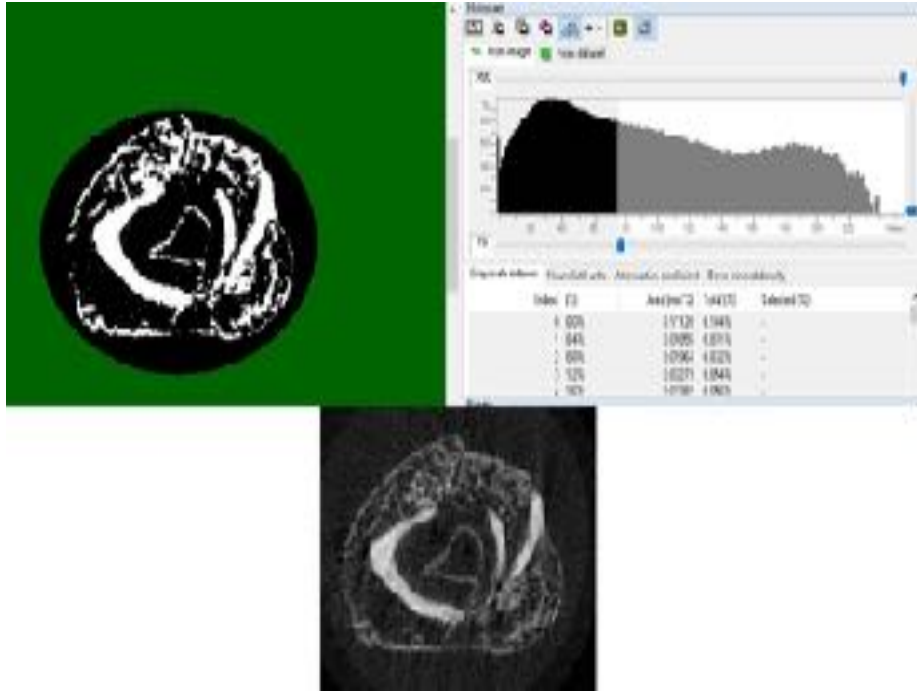
Resim 14. mikroCT taraması sırasında elde edilen veriler, NRecon v.1.6.3 yazılımı (Bruker-micro-CT) ile görüntülere dönüştürüldü



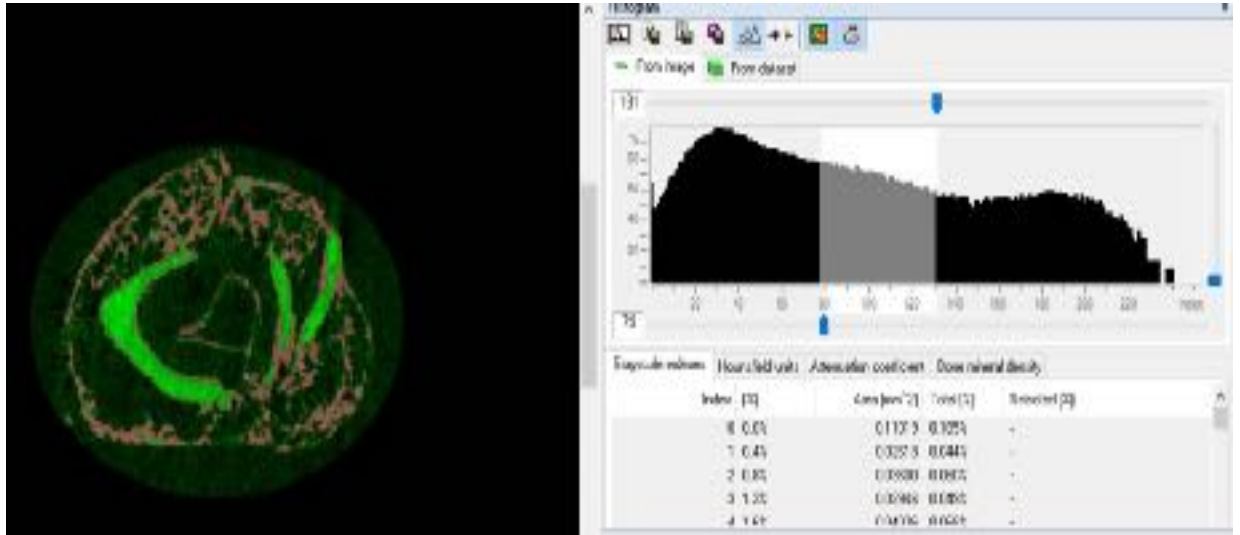
Resim 15. Axial, koronal ve sagittal planlarda değerlendirildi.



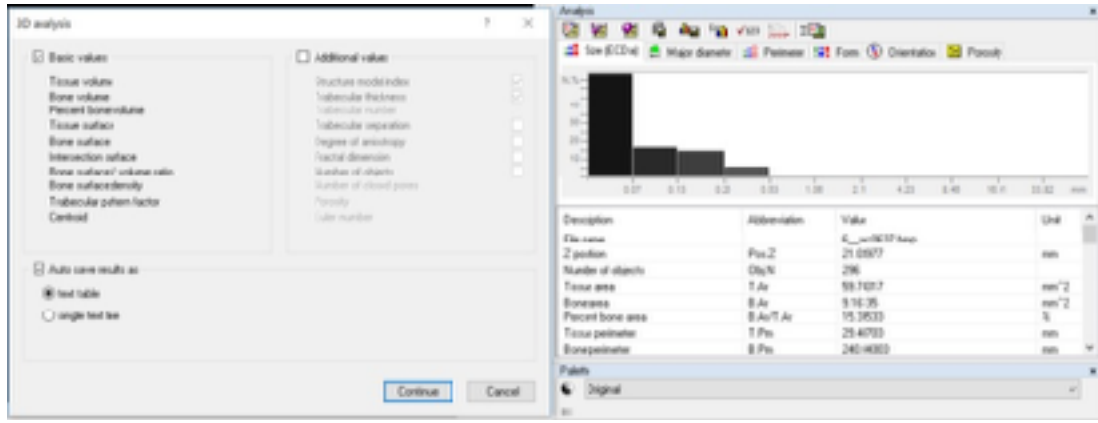
Resim 16. Proksimal ve distal vida arasında saha tüm tavşan radiuslarında eşit uzunlukta ayarlanarak standardize edildi



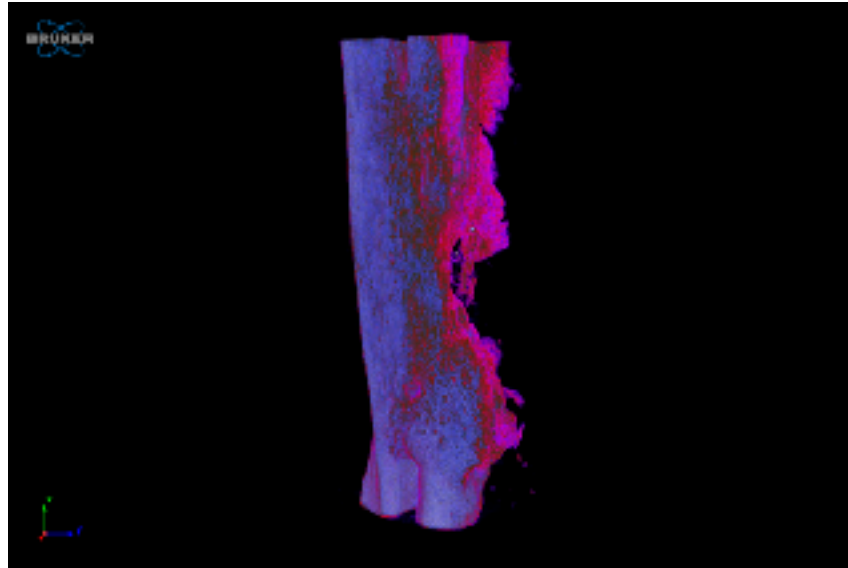
Resim 17. CTAn v.1.12 yazılımı (Bruker-micro-CT) ile analiz edildi



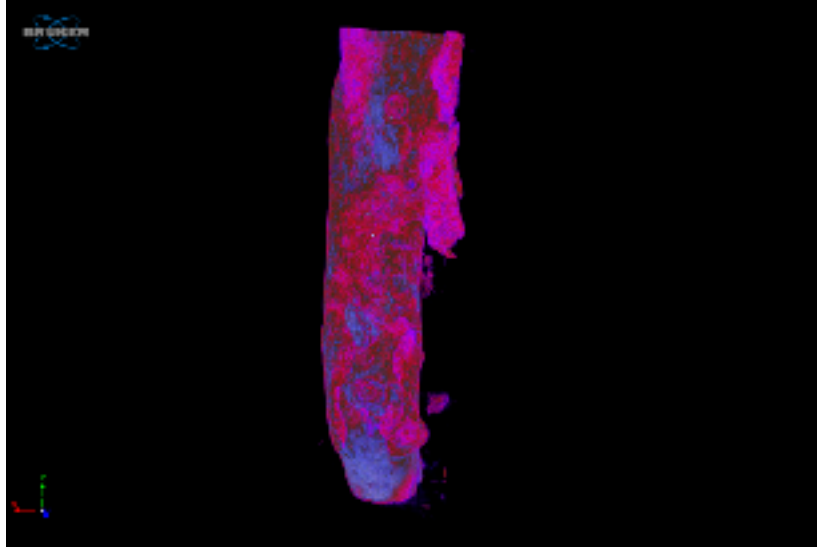
Resim 18. CTAn v.1.12 yazılımı (Bruker-micro-CT) ile yeni oluşan kemik dokusu analiz edildi



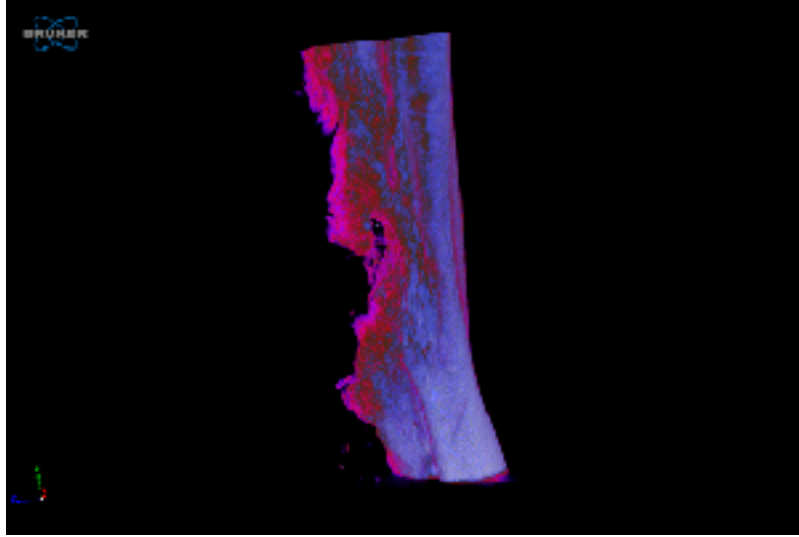
Resim 19. Yeni oluşan kemik dokusu analiz edildi.



Resim 20. Üç boyutlu görüntüler oluşturmak için CTVol v.2.2.1 yazılımı (Bruker-mikro-CT) kullanıldı



Resim 21. Üç boyutlu görüntüler oluşturmak için CTVol v.2.2.1 yazılımı (Bruker-mikro-CT) kullanıldı



Resim 22. Üç boyutlu görüntüler oluşturmak için CTVol v.2.2.1 yazılımı (Bruker-mikro-CT) kullanıldı

3.5 İstatiksel Yöntem

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 20 yazılımı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı analizler ortalama, standart sapma, ortanca, quartile 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

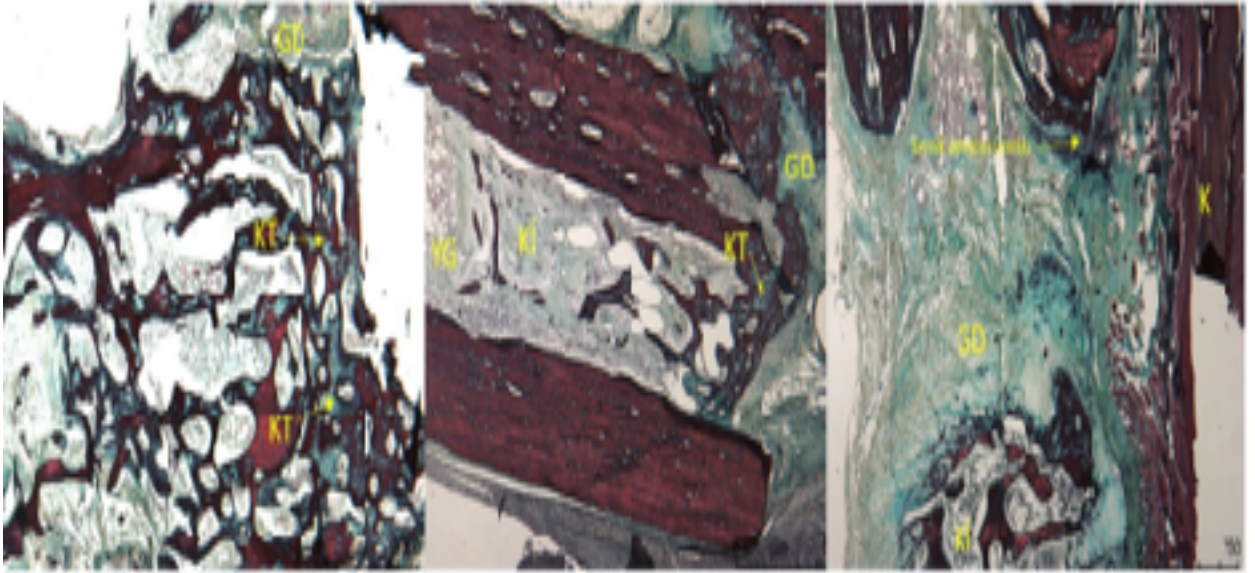
4.1 Histopatolojik Değerlendirme

Tüm gruplarda genel değerlendirmeler x4 büyütmede, hücresel değerlendirmeler ise x10, x20 ve x40 objektif büyütmelerinde yapılmıştır. Masson trikro boyamada kollajen doku yeşil, yeni kemik yeşil ve kompakt eski kemik ile kas dokusu kırmızı olarak izlenmektedir. Bu nedenle yeni(immatür) -eski(matür, kompakt) kemik ayrımı kolaylıkla yapılabilmektedir. Tavşanlarda immobilizasyon sonrası yeni kemik oluşumunun sekiz haftada tamamlanmasını beklediğimizden[164] gruplar arası yeni kemik oluşumun aşamaları açısından fark izlenmemiş, tüm gruplarda kompakt lameller kemik arasında yeni trabeküler kemik oluşumuna rastlanmıştır. Kemik korteks grupların hiçbirinde tam olarak izlenmemiş, kortikal iyileşmenin az olması kemik periost izlenmemesine bağlanmıştır. Yalnızca 4. grupta kısıtlı alanda kemik periost ve hemen altında kortikal yeni kemik oluşumu izlenmiştir. Aynı nedenle endotel aktivitesi de gruplararası değerlendirmeye alınamamıştır.

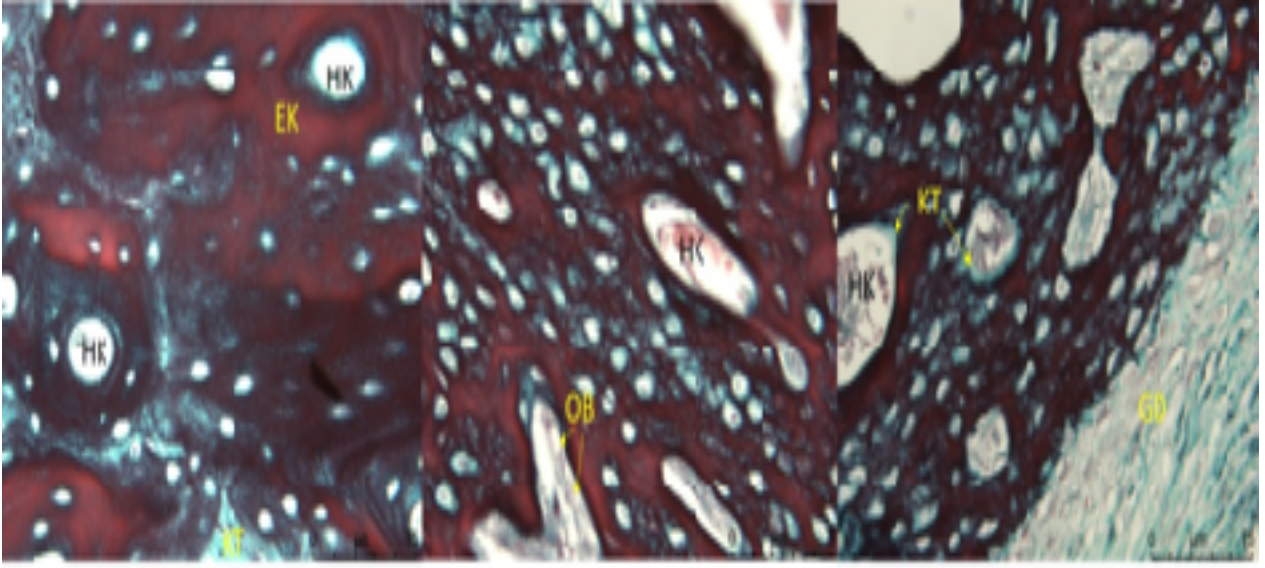
4.1.1 Grup 1 Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Bu grup örneklerinin genel değerlendirmesi x4 büyütme ile yapıldı ve örnekler fotoğraflandı. Tüm gruplarda granulasyon dokusunun azlığı (minimal kallus formasyonu) dikkat çekti ve bunun nedeninin deneydeki fraktür immobilizasyon tekniği olduğu düşünüldü. Örnekler arasında granulasyon dokusunun miktarı açısından fark izlenmemekle birlikte, dokudaki hücre sayıları arasında fark gözlemlendi. Granulasyon dokusu bu grupta hiposellüler olarak değerlendirildi. Endokondral kemik oluşumunun miktarını göstermek açısından granulasyon dokusu içinde kondrosit araştırıldı, bu grupta rastlanmadı. Kemik defektin kenarlarından içeriye doğru granulasyon dokusunun ilerleyerek az miktarda yeni kemik trabekülleri oluşturduğu izlendi (Şekil 1). Ayrıca defekt çevresindeki havers kanalları çevresinde de minimal kemik oluşumu gözlemlendi. Bu örneklerde kemik periost ve oradan defekt

içine uzanan yeni kemik trabekülleri (primer kortikal iyileşme) izlenmedi. Yeni kemik oluşumunun en az olduğu ve havers kanalları çevresine yerleşmiş osteoblast adacağı yoğunluğu en az bu grupta olduğu gözlemlendi (Resim 23). Yeni kemik oluşumunun eski kemik oluşumuna oranı 0,182 (0,1090 - 0,2140) olarak bulundu (Grafik 1). Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,153$). Fakat Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde Grup 3 de daha yüksek oranda yeni kemik oluştuğu görülmüştür ($p=0,008$) (Tablo 2).



Resim 23. Kemik defekti kenarlarından içeriye uzanan yeni kemik trabekülleri (KT), az miktarda ve hiposelüler granulasyon dokusu (GD), kemik iliği (Kİ) ve içindeki yağ globülleri (YG), kemiğe yapışan kas dokusu (K). Masson trikrom, x4.

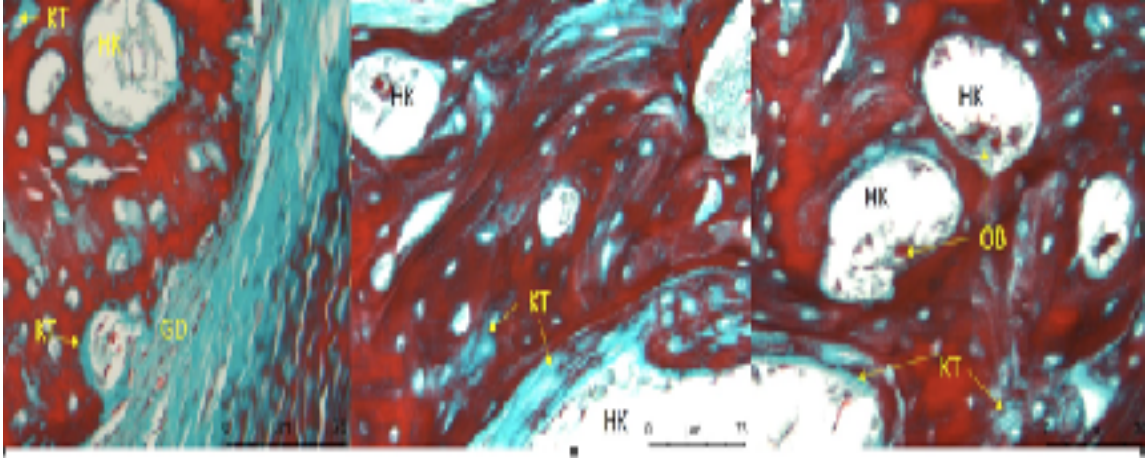


Resim 24. Lameller eski kemik (EK) içine uzanan ve havers kanalları (HK) çevresinde bulunan az miktarda yeni kemik trabekülleri (KT), az sayıda osteoblast (OB) adacığı, hiposelüler granulasyon dokusu (GD). Massom trikrom, x40.

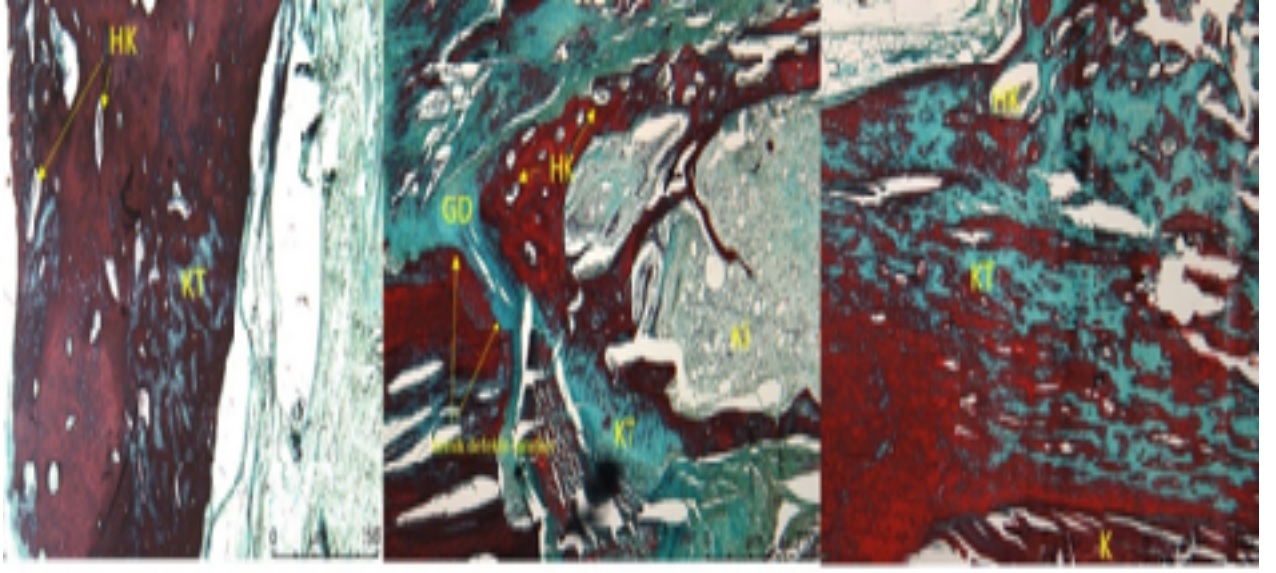
4.1.2 Grup 2 Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Grup 2 sonuçları açısından Grup 3'e benzerlik göstermiştir. Kırık hattının ve granulasyon dokusunun genel değerlendirmelerinde, diğer gruplara benzer şekilde az miktarda granulasyon dokusu izlendi. Ancak granulasyon dokusunun hücre yoğunluğu birinci gruba göre daha artmış olarak görüldü. Bununla uyumlu şekilde kırık hattından içeriye uzanan kemik trabeküllerinde de birinci gruba göre artma izlendi (Resim 25, 26). Yeni kemik oluşumunun eski kemik oluşumuna oranı 0,312 (0,183-0,396) olarak bulundu (Grafik 1). Grup 2 ile grup 1 yeni kemik oluşumu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilememiştir ($p=0,153$). Fakat Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında yeni kemik

oluşumunun Grup 4 te istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,007$) (Tablo 2).



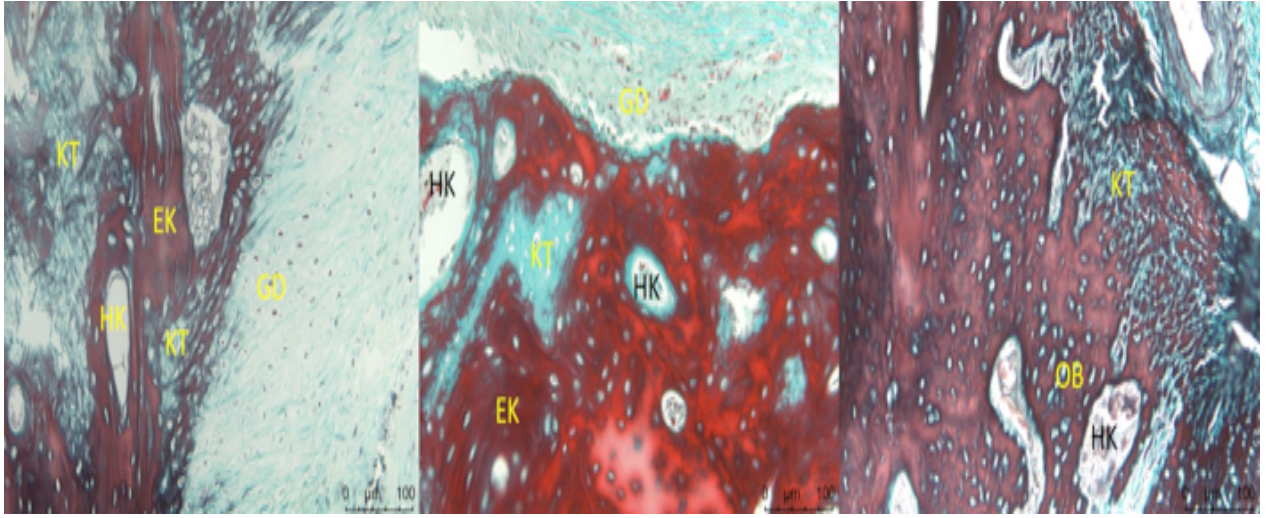
Resim 25. Fraktür kenarları arasında minimal granulasyon dokusu (GD), yeni kemik trabekülleri (KT), havers kanalları (HK), kemik iliği (Kİ) ve kas dokusunun genel görünümü. Masson trikrom, x4.



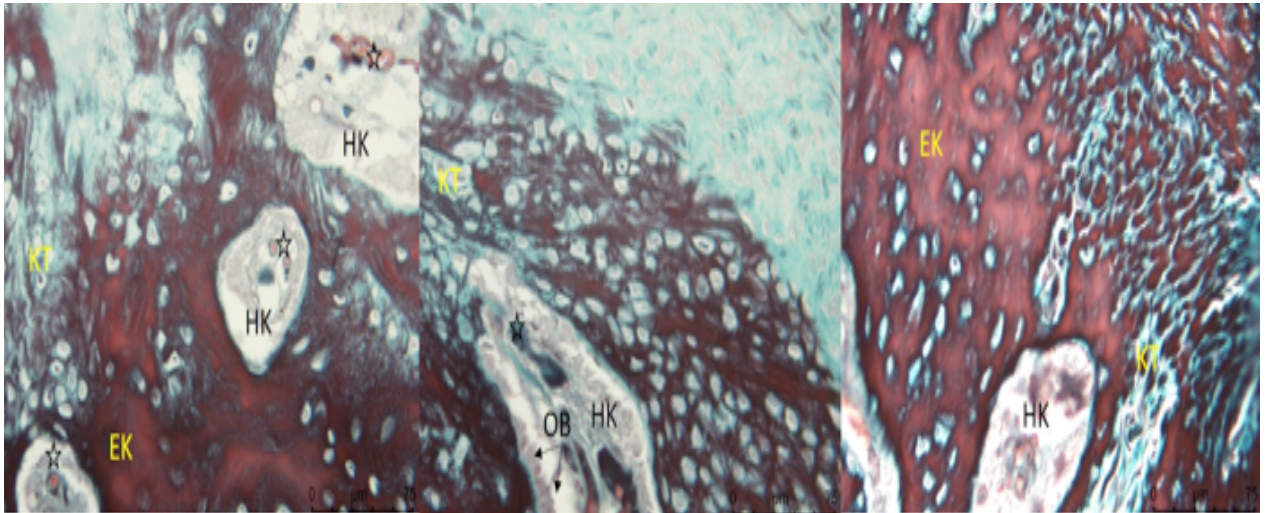
Resim 26. Eski kemik (EK) içinde ve havers kanalları (HK) çevresinde oluşan sınırlı yeni kemik trabekülleri (KT), havers kanalları çevresine yerleşmiş osteoblast (OB) adacıkları, hiposelüler granulasyon dokusu (GD). Masson trikrom, x40.

4.1.3 Grup 3 Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Grup 3'te bazı örneklerde granulasyon dokusu içinde kondrosite rastlandı. Bu grupta, diğer gruplardan farklı olarak, endokondral kemik yapımını provoke eden bir faktör olduğu düşünüldü. Artmış kemik trabekülleri ile uyumlu olarak osteoblast yoğunluğu da birinci gruptan fazlaydı. Yeni kemik trabekülleri defektin içine doğru ve havers kanalları çevresinde yoğunlaşmıştı (Resim 27, 28). Yeni kemik oluşumunun eski kemik oluşumuna oranı 0,281 (0,274-0,356) olarak bulundu(Grafik 1). Yeni kemik oluşumunun Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında Grup 3 de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,008$). Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında Grup 4'te yeni kemik oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gözlenmiştir($p=0,007$) (Tablo 2).



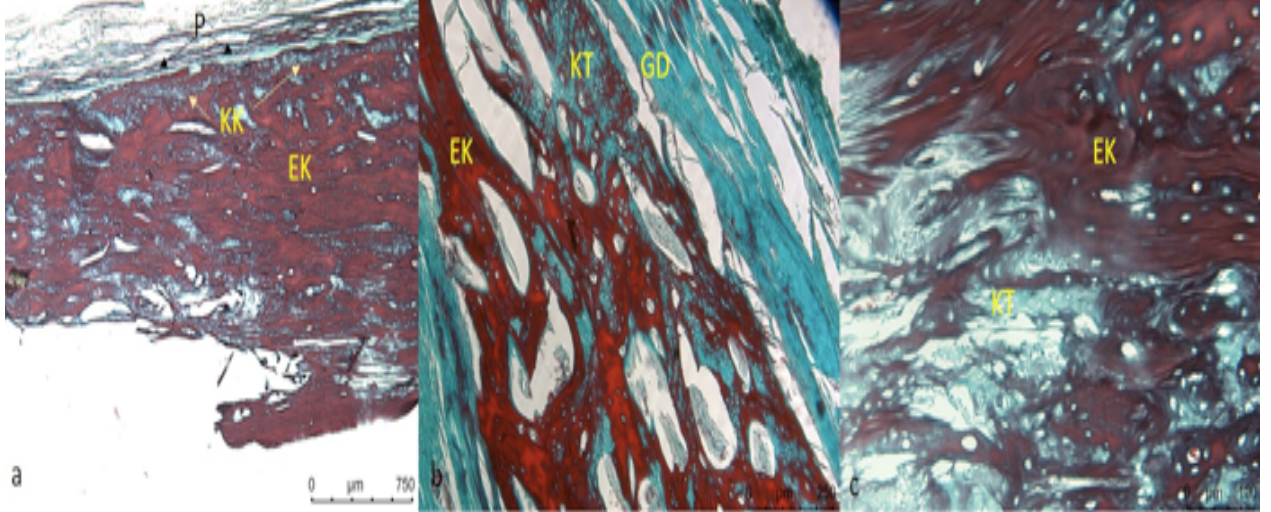
Resim 27. Hücre yoğunluğu artmış granulasyon dokusu (GD), granulasyon dokusundan eski kemik (EK) içine uzanan ve havers kanalları (HK) çevresinde oluşan yeni kemik trabekülleri (KT), yoğunluğu birinci gruba göre artmış osteoblast adacıkları. Masson trikrom, x20.



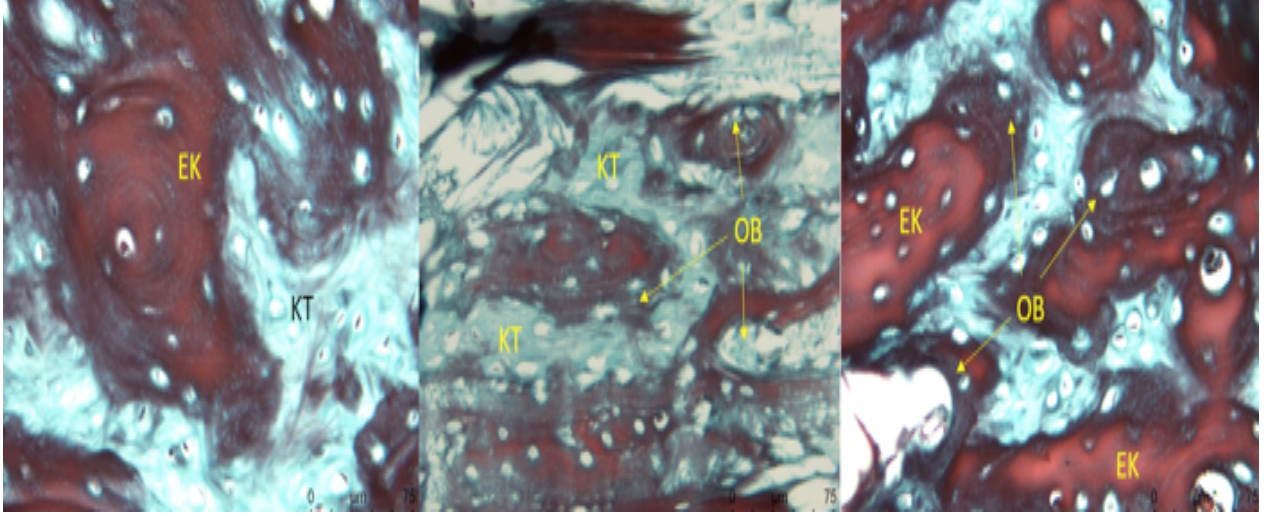
Resim 28. Granulasyon dokusunda (GD) artmış hücre yoğunluğu, eski kemik (EK) içine uzanan yeni kemik trabekülleri (KT), havers kanalı (HK) çevresinde artmış osteoblast (OB) yoğunluğu ve kanalın içindeki damar (yıldız) görünümü. Masson trikrom, x40.

4.1.4 Grup 4 Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

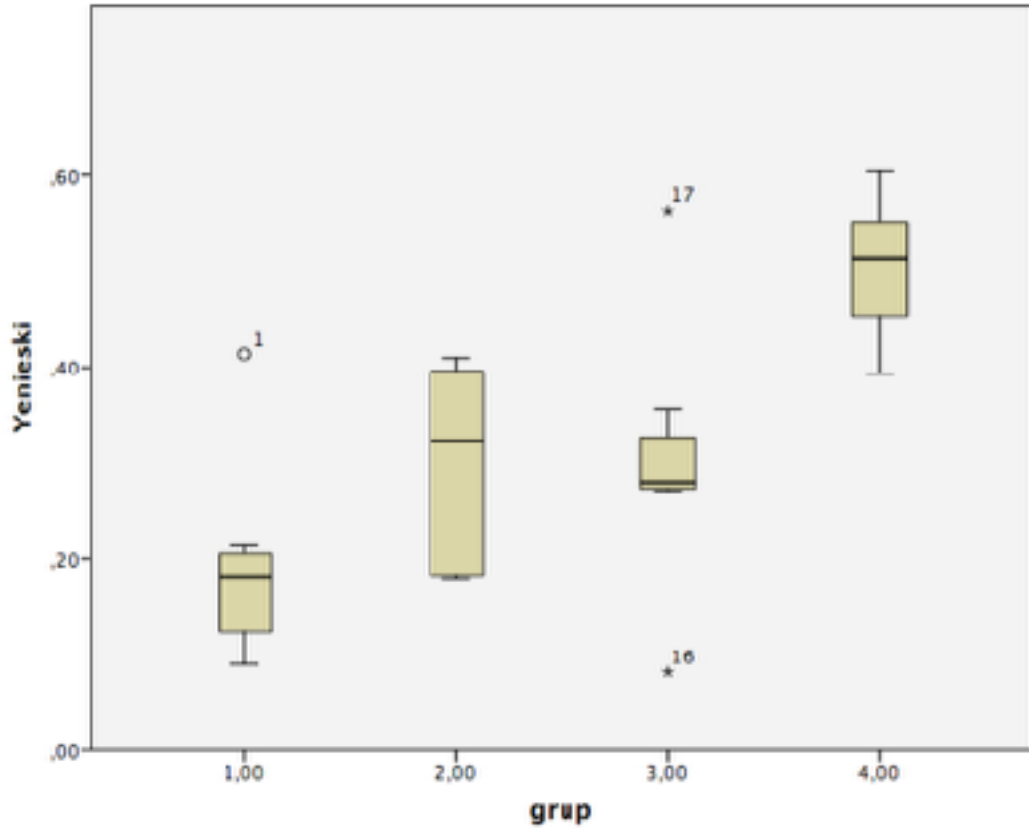
Deney grupları içinde en yoğun kemik sayımı bu grupta yapıldı. Genel değerlendirmede defekt alanında az granülasyon dokusu vardı, ancak hücre sayısı en fazla bu grupta izlendi. Defektin içine uzanan yeni kemik trabekülleri her x40 büyütmede %50 oranında ölçüldü ve havers kanalları çevresinde de diğer gruplardan daha fazla miktarda kemik oluşumu izlendi. Bu grupta sınırlı alanda kemik periost ve hemen altında kortikal yeni kemik oluşumu da izlenmiştir. Osteoblast adacığı diğer gruplardan daha yoğun olarak izlendi. Hiperselüler granülasyon dokusu oluşumu, yer yer gözlenen kortikal kemik oluşumu, artmış trabeküler kemik ve osteoblast yoğunluğu nedeniyle, en iyi iyileşme bu grupta izlenmiştir (Resim 29, 30). Bu grupta yeni kemik oluşumunun eski kemik oluşumuna oranı 0,513 (0,423-0,583) olarak bulundu (Grafik 1). Grup 4 ‘ün; sırasıyla Grup 3 ve Grup 2 ile karşılaştırmalarında yeni kemik oluşumunun her iki gruba oranla Grup 4’te istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,008$, $0,007$, sırasıyla) (Tablo 2).



Resim 29. Lamellar kemik (EK) içine doğru uzanan yoğun kemik trabekülleri (KT), periost (P) altında oluşan kortikal kemik (KK). Massom trikrom, a: x4, b: x10, c: x20.



Resim 30. Tüm örneklerde lameller kemik (EK) aralarına uzanan ve havers kanalı çevresinde yoğun trabeküler kemik (TK) ve osteoblast adacıkları. Masson trikrom, x40.



Grafik 1. Histopatolojik olarak yeni kemik oluşumunun eski kemik oluşumuna oranının gruplar arası karşılaştırması

4.2 Radyolojik Değerlendirme

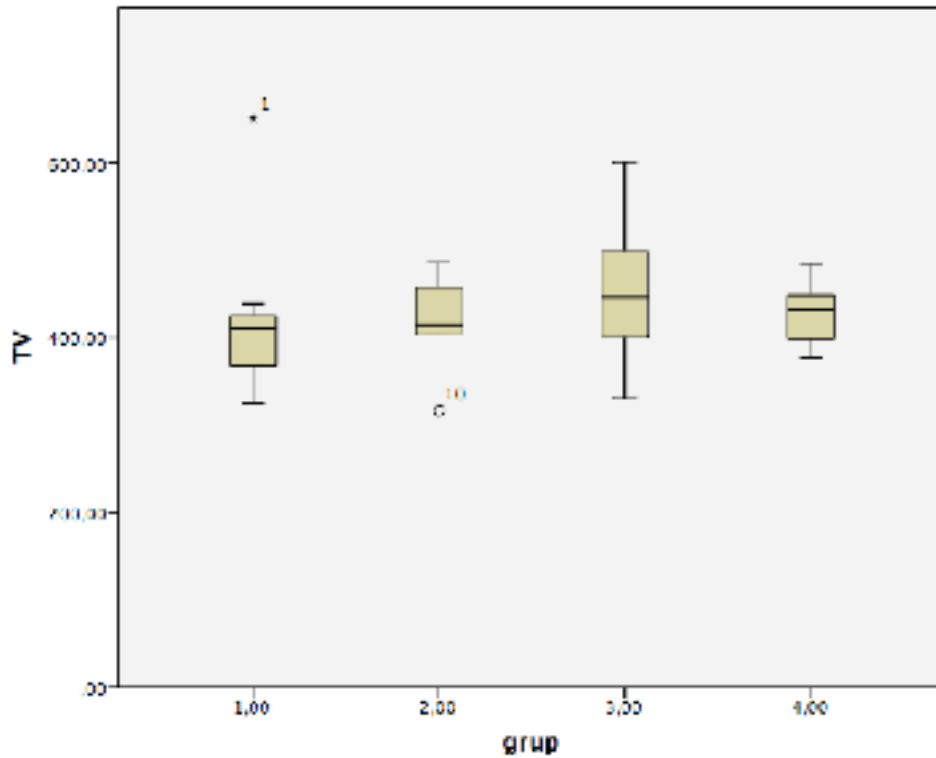
4.2.1 MikroCT Sonuçlarımız

4.2.1.1 Tissue Volume

Bu çalışmada proksimal ve distal vida sahaları tüm tavşan radiuslarında eşit uzunlukta ayarlanarak standardize edilen sahanın toplam kemik hacimi tespit edildi.

Total kemik hacimi parametresi olan Tissue Volume (TV)'nin gruplara göre dağılımı Grafik 2'de gösterilmiştir.

Gruplar arası karşılaştırma da Grup 1 ve Grup 2 arasında total kemik hacimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p=0,775$). Yine Grup 1 ile Grup 3 karşılaştırıldığında total kemik hacimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,298$). Grup 2 ile Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,886$). Grup 3 ile Grup 4 arasında total kemik hacimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p=0,028$) (Tablo 2).



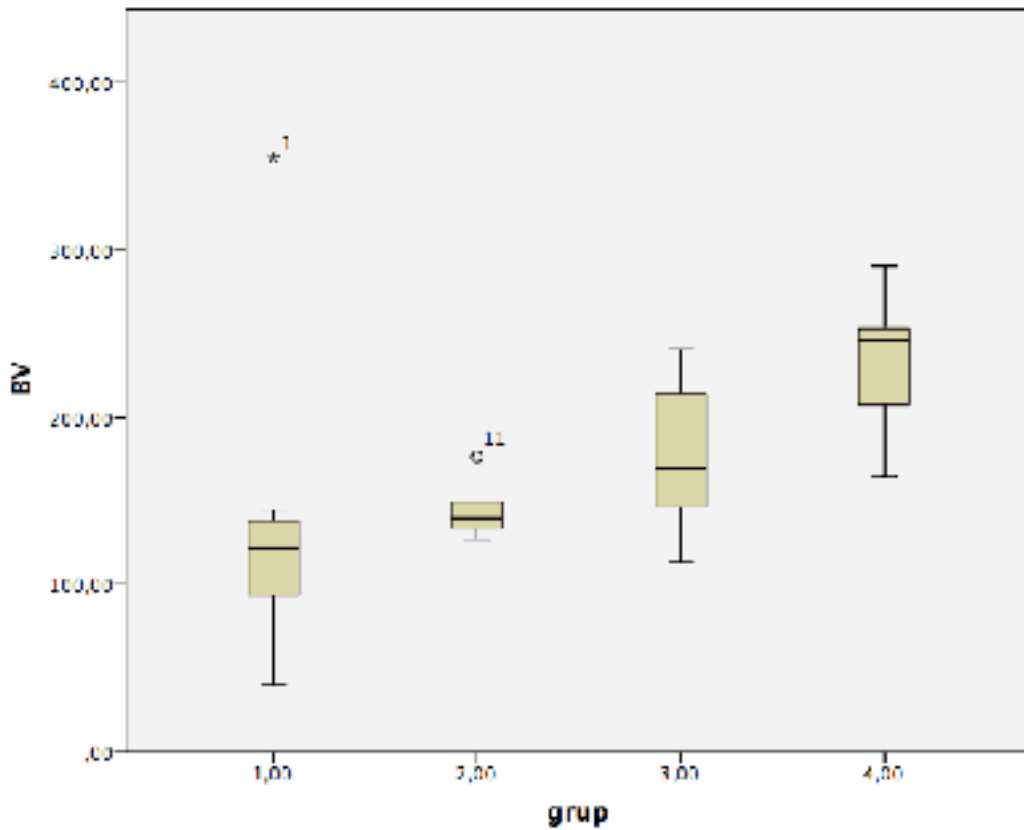
Grafik 2. Total kemik hacimi parametresi olan Tissue Volume (TV)'nin gruplara göre dağılımı

4.2.1.2 Bone Volume

Bu çalışmada tavşan radiusuna uygulanan plağın proksimal ve distal vidaları arasındaki alan tüm tavşan kemiklerinde eşit uzunlukta ayarlanarak standardize edilerek sahanın yeni kemik oluşumu tespit edilmiştir.

Yeni kemik oluşumu parametresi olan Bone Volume (BV) 'nin gruplara göre dağılımı Grafik 3'de belirtilmiştir.

Gruplar arası karşılaştırma da Grup 1 ve Grup 2 arasında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel anlamlı fark tespit edilememiştir ($P=0,153$). Fakat Grup 1 ile Grup 3 arasında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0,0064$). Grup 2 ile Grup 4 arasında yapılan karşılaştırmada yeni kemik oluşumunun Grup 4'te istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,004$). Grup 3 ile Grup 4 arasında yapılan karşılaştırmada yeni kemik oluşumunun Grup 4'te istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,028$) (Tablo 2).



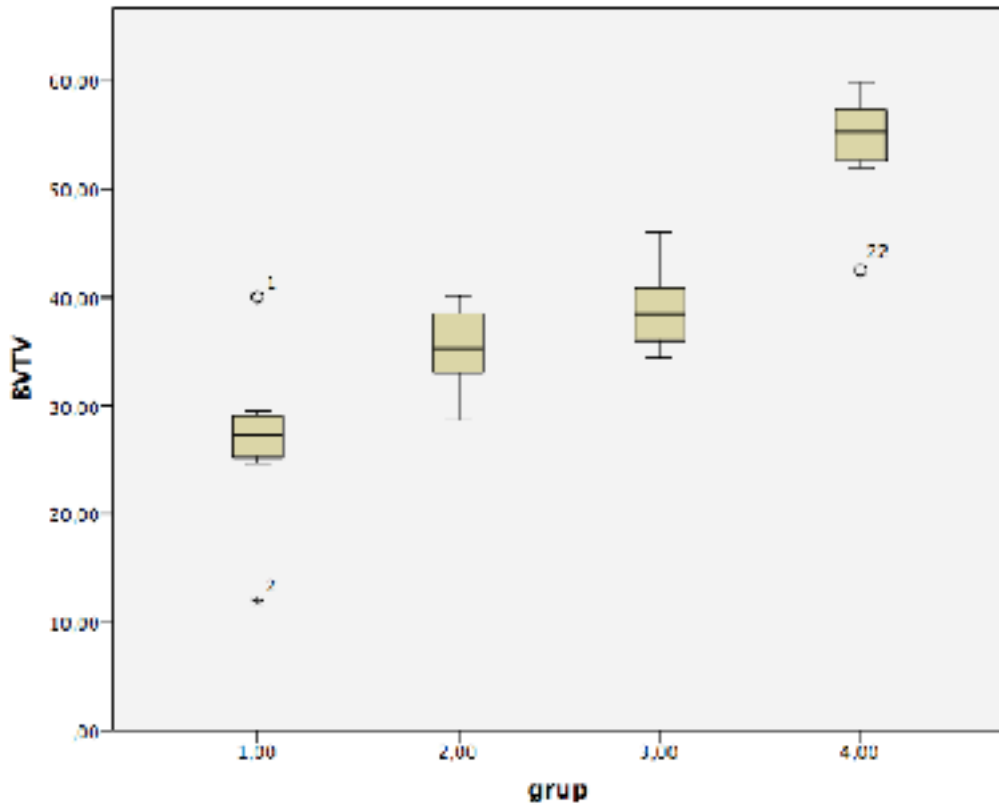
Grafik 3. Yeni kemik oluşumu parametresi olan Bone Volume (BV) 'nin gruplara göre dağılımı

4.2.1.3 Bone Volume (BV) / Tissue Volume (TV)

Yeni oluşan kemik hacimi toplam hacim ile oranlanarak yüzde cinsinden hesaplanarak elde edildi.

BV / TV oranı gruplara göre dağılımı Grafik 4’ de belirtilmiştir.

Grup 1 ile Grup 2 karşılaştırıldığında yeni oluşan kemik dokunun toplam kemik hacimine oranının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,032$). Yine Grup 1 ile Grup 3 arasından BV / TV oranının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,008$). Grup 2 ile Grup 4 karşılaştırıldığında BV / TV oranının istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p=0,003$). Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında BV / TV oranının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,002$) (Tablo 2).



Grafik 4. BV / TV oranı gruplara göre dağılımı

		Kontrol Grupları	CGF	p*
Tissie Volume (TV)	8.hafta	410,6735 (337,8036-439,2837)	412,9587 (403,7172-457,7034)	0,775
	12.hafta	462,49696 (388,3879-512,4677)	431,92842 (386,6015-450,5719)	0,028
	p*	0,298	0,886	
Bone Volume (BV)	8.hafta	121,8572 (88,8634 - 144,3827)	139,18587 (133,2127 -149,2983)	0,153
	12.hafta	169,64602 (154,2938-235,8667)	246,2873 (196,055 -257,9715)	0,028
	p*	0,064	0,004	
Bone Volume / Tissue Volume	8.hafta	27,30928 (24,6719-29,5605)	35,28376 (32,9965-38,5411)	0,032
	12.hafta	39,72673 (36,6805-41,5937)	55,2873 (51,9832-57,4670)	0,002
	p*	0,008	0,003	
Histopatoloji Yeni Kemik / Eski Kemik	8.hafta	0,182 (0,1090 - 0,2140)	0,312 (0,183-0,396)	0,153
	12.hafta	0,281 (0,274-0,356)	0,513 (0,423-0,583)	0,008
	p*	0,008	0,007	

Tablo 2. MikroCT ve histopatoloji sonuçları ve p değerlerinin gruplar arasındaki karşılaştırması

5. TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada Masquelet tekniğe CGF eklenmesi ile yeni kemik oluşumunun arttığı ve kemik iyileşme süresinin kısalttığı histopatolojik ve mikroBT ile değerlendirilen parametrelerde gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında Masquelet tekniğin CGF ile birleştirilmesinin büyük diyafizer kemik defektlerinde kemik iyileşmesinin arttırılması için önemli bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

Kemik kaybının etyolojisine bakılmaksızın, uzun kemiklerin büyük diyafiz defektlerinin rekonstrüksiyonu, ekstremitte kurtarma için en büyük zorluklardan biridir. 5 cm'den büyük defektlerde otolog kemik greftlenmesi tek başına tavsiye edilmemektedir[6]. Masquelet, büyük defektlerdeki bu problem için yeni bir teknik tanımlamıştır[1, 2]. Giannodis ve ark.[10], Masquelet tekniğini uyguladıkları çalışmalarında sonuçlarının son derece tatmin edici ve umut verici olduğunu bildirmişlerdir. Güncel literatürde kemik defekt rekonstrüksiyonu ile alakalı en büyük klinik serilerden birisi olan; Azi ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada, indüklenen membran tekniği ile tedavi edilen 34 kritik segmental kemik defekti (ortalama 6.7 cm boyutunda) olan femur ve tibia vakalarının % 90' ının ortalama 8,5 ayda tam iyileşme gösterdiği bildirilmiştir. 2016 yılında Mauffrey ve arkadaşlarının[166] yayınladıkları makalelerinde; Masquelet tekniğin başarılı sonuçlar verdiğini gösterse de tedavi sürecinin uzunluğu, otolog kemik greftlemesine bağlı komplikasyonların görülmesinin[167] tekniğin geliştirilmeye ihtiyacı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda büyük kemik defektlerinde Masquelet tekniğinin başarısının arttırılmasını ve tedavi süresinin kısaltılmasını hedefledik.

Yara iyileşme süreci birçok intraselüler ve ekstraselüler mediatör tarafından yönetilir. Klinikte kemik ve yumuşak dokuların iyileşmesini hızlandırmak için trombosit konsantrasyonları kullanılmaktadır. Trombositlerin doku tamiri ve vasküler yeniden şekillenmede daha önceden bilinmeyen bir rolü olduğu, inflamatuvar ve immün yanıtın aktif oyuncularını olduğu belirtilmektedir[148]. Trombositler doku iyileşmesini stimüle eden büyüme faktörlerini yüksek miktarda ihtiva eder. Bu mediatörlerin etkinliklerini kullanarak kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için

platelet zengin plazma (PRP), trombositten zengin fibrin (PRF) ve konsantre büyüme faktörü (CGF) gibi trombosit konsantreleri kullanılmıştır. PRP ilk jenerasyon konsantre trombosit elde etme yöntemidir. Doku iyileşmesini hızlandırmak için uzun zamandır kullanılmaktadır. 1998'de Marx ve arkadaşları, jel-tip PRP ile yapılan kemik greftinin, mandibular kusurlu hastalarda ossifikasyona neden olduğunu bildirmiştir[13]. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda PRP'nin hücre proliferasyon ve diferansiyasyonuna olan etkileri çelişkili olarak bulunmuştur[14]. Son yıllarda araştırmacılar PRP'den farklı ve büyüme faktörleri içeren PRF ve CGF'i ve üretim yöntemlerini tanıtmışlardır. Choukroun tarafından tanıtilen ikinci kuşak trombosit yöntemi olarak adlandırılan PRF'nin; üretim yöntemi PRP'den daha basittir, trombin ve kalsiyum klorür ilavesi gerektirmez[15]. PRP'nin aksine PRF katı fibrin pıhtıdır ve yüksek miktarda konsantre trombositler olan; trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü b (TGF-b), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve kemik morfojenik proteinleri (BMP) içerir. Konsantre Growth Faktör (CGF) 2006 yılında Sacco tarafından tanımlanan konsantre trombosit yöntemidir. Trombositler yüksek miktarda büyüme faktörlerini ihtiva eder. Bu fibrin matrisin hücrelerin migrasyonunu, proliferasyonunu, osteoblastik diferansiyasyonunu desteklediği, anjiyogenezi indüklediği, özellikle kemik iyileşmesinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir[156, 157]. Kemik iyileşmesini hızlandırma amacıyla CGF in kullanıldığı bir çok çalışma mevcuttur [159, 160]. Ayrıca CGF'nin kemik iyileşmesine etkisini araştıran in vitro çalışmalar da yapılmıştır[161, 162]. 2016 yılında Topkara ve arkadaşlarının[168] yaptıkları tavşan çalışmasında kemik greftleri ile birlikte kullanıldığında CGF'nin yeni kemik oluşumunu arttırdığını göstermişlerdir. 2016 yılında Durmuşlar ve arkadaşlarının[169] yaptıkları çalışmalarında, tavşan tibialarına diş peri-implant defekti yaratılmış ve otojen kemik ile CGF'nin bir kombinasyonu kullanılarak defektin iyileşmesini değerlendirmişlerdir. CGF uygulanan gruplarda dikkat çekici düzeyde iyileşme olduğunu belirtmişlerdir. Güncel literatür tarandığında CGF'nin oral ve maksillofasiyal cerrahide artan sıklıkta kullanılmaya başlandığı, ortopedik cerrahi için ise henüz yeni bir teknik olduğu değerlendirilebilir.

Kemik defekt rekonstrüksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde köpek, domuz, koyun, tavşan ve rat türlerinin kullanıldığı görülmektedir[170]. Rat ve tavşan türlerinin üretimi ve bakımı diğer türlere göre daha kolay olup ayrıca daha düşük maliyetlidir. Bu sebepten dolayı çalışmalarda rat ve tavşan türleri sıklıkla tercih edilmektedir. Çalışmamızda ratlardan CGF için yeterli miktarda kan elde edilemeyeceğinden deney modeli olarak tavşan türü tercih edilmiştir.

Kemik iyileşmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda immünohistokimya ,histopatoloji ve son yıllarda da popülerize olan mikroBT değerlendirme sonuçları kullanılmaktadır[171, 172]. Histomorfometrik ve histopatolojik analiz kemik hücreleri ve aktivitelerini in situ olarak değerlendirebilen tek yöntemdir. Bu yüzden histomorfometrik ve histopatolojik inceleme yöntemi kemik dokusunun değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir[171]. Kemik metabolizmasını değerlendirmede diğer hiçbir yöntem histomorfometrik ve histopatolojik inceleme yöntemi kadar etkili değildir[173]. Çalışmamızda yeni kemik oluşumunu ve defekt bölgesinde iyileşme sırasında görülen hücreleri incelemek için histopatolojik değerlendirme yöntemleri kullanılmıştır.

Histopatolojik olarak değerlendirdiğimiz parametre olan *yeni oluşmuş kemiğin eski kemiğe oranı*; kallus dokusunun eski kemiğe olan oranı sonucu tespit edilir. Bu parametre kemik iyileşmesini göstermektedir[165]. Masquelet tekniğe CGF'nin eklendiği 12.hafta kemik iyileşmesinin değerlendirildiği 4.Grup'un, diğer gruplara kıyasla en yüksek yeni kemik oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Rodella ve arkadaşları[13] yaptıkları çalışmada, CGF'nin yüksek konsantrasyonda VEGF içerdiğini bildirmişlerdir. VEGF'nin osteoblastik diferansiyasyonunu desteklediği, anjiyogenezi indüklediği, özellikle yeni kemik oluşumunda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir[156, 157]. Grup 4 ile CGF'nin kullanılmadığı uzun dönem kontrol grubu olan Grup 3 kıyaslandığında, Grup 4'ün kemik iyileşmesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekliği dikkat çekicidir($p=0,008$). Bu sonuç ışığında Masquelet tekniğe CGF eklenmesinin kemik iyileşmesine katkısı kadar iyileşme sürecinin de kısaltılması açısından da faydalı olabileceği gözlenmiştir. Kısa dönem Masquelet teknik uygulanan kontrol grubu olan Grup 1 ile kısa dönem Masquelet tekniğine CGF eklenen Grup 2'nin karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark

tespit edilemedi($p=0,153$). Ancak histopatolojik değerlendirmelerde Grup 2 de Grup 1'e kıyasla yeni kemik oluşunun dikkat çekici düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi(0,312; 0,182, sırasıyla). 2014 yılında Kim ve arkadaşlarının[162] tavşan parietal kemiğinde defekt yaratarak; defekti PRP, PRF ve CGF ile doldurup kemik iyileşmesini karşılaştırdıkları çalışmalarında CGF grubunun diğer gruplara göre 4. ve 6. haftada immünohistokimyasal incelemesinde CGF yüksek konsantrasyonda VEGF içermesi sonucunda vaskülarizasyonun ve osteoblastik aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. VEGF'nin anjiyogenezi indüklediği ve vaskülogenezin düzenlenmesinde kritik rol oynadığı bunun sonucunda osteoblastik aktivitenin indüklendiği bilinmektedir. 6. haftada vaskülarizasyonun hala devam etmesi CGF içerisindeki VEGF ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir[174]. 2016 yılında Henrich ve arkadaşlarının[175] yaptıkları çalışmada, kemik defektinden aldıkları membranda vaskülarizasyonun 2. haftadan 4. haftaya geçerken arttığını, 4. Haftadan 6. haftaya geçerken değişmediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda benzer olarak 1.Grup'un histopatolojik incelemesinde kemik periost ve oradan defekt içine uzanan yeni kemik trabekülleri (primer kortikal iyileşme) izlenmedi, yeni kemik oluşunun, vaskülarizasyonun ve havers kanalları çevresine yerleşmiş osteoblast adacığı yoğunluğunun en az; Grup 2 de ise granülasyon dokusunun, vaskülarizasyonun ve hücre yoğunluğunun birinci gruba göre daha artmış olduğu görüldü. Bununla uyumlu şekilde kırık hattından içeriye uzanan kemik trabeküllerinde de birinci gruba göre artış izlendi(Resim 25, 26). Bu bilgiler ışığında Grup 1 ve Grup 2 karşılaştırıldığında histopatolojik farklılığın istatistiksel anlamlı fark yaratmamasının, çalışmamızın gruplardaki hayvan sayısı kısıtlılığı nedeniyle olduğunu düşünüyöruz.

MikroBT ile doku mineral yoğunluğu, kemik mineral yoğunluğu ve kemik hacmi hesaplanabilir[172]. Ayrıca trabeküler kemiğin üç boyutlu yapısını değerlendirmede altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat kortikal kemiğin mikro yapısını değerlendirmede sınırlıdır[176].

Yapılan çalışmalarda mikroBT ile kemik dokusunun incelenmesinde histolojik inceleme yöntemi gibi güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmiştir[177]. Cowan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mikroBT görüntüleri kullanılarak yapılan yeni kemik alanı ölçümleri ile histolojik analiz yöntemiyle yapılan ölçümlerin

birbirleriyle uyumlu olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada elde ettikleri sonuçlar neticesinde mikroBT analizinin kemik iyileşmesinin değerlendirilmesinde faydalı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir[177]. Marechal ve ark.(2005) kemik augmentasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada kemik oluşumunu incelemek için histolojik kesitleri ve mikroBT görüntülerini kullanmışlardır. Çalışmada her iki yöntemden elde edilen sonuçlar arasında korelasyon bulunduğu belirtilmiştir[178]. Yaptığımız çalışmamızda yeni oluşan kemik hacminin hesaplanması ve histopatolojik sonuçlarıyla korele edilebilmesi için mikroBT kullanılmıştır.

Tissue Volume; MikroBT ile tespit edilen, tüm tavşanlarda 25 mm olarak belirlenen alandaki yeni oluşan kemik ve eski kemiğin toplam hacmidir. Grup 1 ve Grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Ancak Grup 3 ile Grup 4 kıyaslandığında Grup 4 de istatistiksel olarak anlamlı yükseklik dikkat çekmiştir($p=0,028$).

Bone Volume; MikroBT tespit edilen, belirlenen sahadaki oluşan yeni kemiğin mineral yoğunluğunu, hacmini ve trabeküler kemiğin üç boyutlu yapısını gösteren parametredir[172]. Masquelet tekniğe CGF'nin eklendiği 12.hafta kemik iyileşmesinin değerlendirildiği 4.Grup'un, diğer gruplara kıyasla en yüksek yeni kemik hacimine sahip olduğu gözlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırma sonucunda 12.hafta sacri fiye edilen sadece Masquelet tekniğin uygulandığı Grup 3 ile 12.hafta sacri fiye edilen Masquelet tekniğe CGF eklenen Grup 4 arasında yeni kemik hacimi açısından istatistiksel fark dikkat çekicidir($p=0,028$). CGF'in çalışmamızda uzun dönem grupların karşılaştırmasında kemik iyileşmesini dikkat çekici düzeyde arttırdığı söylenebilir. 8.hafta sacri fiye edilen yalnızca Masquelet tekniğin uygulandığı Grup 1 ile 8.hafta sacri fiye edilen Masquelet tekniğe CGF eklendiği Grup 2 arasındaki karşılaştırma da yeni kemik hacimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir($p=0,153$). 2014 yılında Kim ve arkadaşlarının[162] tavşan parietal kemiğinde defekt yaratarak, defekti PRP, PRF ve CGF ile doldurup kemik iyileşmesini karşılaştırdıkları çalışmalarında 6. ve 12.hafta mikroBT ile değerlendirmelerinde; PRP, PRF ve CGF kullanımı kemik greft iyileşmesinin erken safhasında yeni kemik oluşumunu kolaylaştırdığı, 6.hafta en yüksek Bone Volume

oranının CGF grubunda olduğunu belirtmişlerdir. 2017 yılında Pirpir ve arkadaşlarının[179] maxiller peri-implant kemik defektli 12 hastanın defekti CGF ile doldurarak panoramik BT ile inceledikleri çalışmalarında, Konsantre büyüme faktörünün implant stabilizasyonunda (ISQ skoru) pozitif etkileri olduğu, 4. haftada yapılan panoramik BT ile osseointegrasyonun ve ossifikasyonun kontrol grubuna göre arttığını tespit etmişlerdir. Masquelet tekniğe CGF eklenen Grup 2 ve Grup 4 karşılaştırıldığında Grup 4'te Bone Volume değerinin istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir($p=0,008$). Bu yükseklik Grup 4'de Grup 2'e göre ossifikasyon süresinin daha uzun olmasıyla açıklanabilir. Ancak kontrol grupları arasındaki karşılaştırmada Grup 3 ile Grup 1'in karşılaştırmasında Bone Volume değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark tespit edilmemiştir($p=0,064$) .

BV / TV, MikroBT ile tespit edilen, belirlenen sahadaki oluşan yeni kemiğin hacmini toplam hacim ile oranlanarak yüzde cinsinden gösteren parametredir. 2012 yılında Verdelis ve arkadaşlarının fare kemiği morfometrik yapısını mikroBT ile inceledikleri çalışmada 'Skyscan' sisteminde kansellöz kemiğin *BV / TV* parametresi ile en iyi tespit edildiğini belirtmişlerdir[180]. Masquelet tekniğe CGF eklendiği 12.hafta kemik iyileşmesinin değerlendirildiği 4.Grup diğer gruplara göre *BV / TV* oranı en yüksek grup olarak dikkat çekmiştir. Grup 4'ün Masquelet tekniğe CGF eklenmeyen Grup 3 ile karşılaştırmasında *BV / TV* oranının istatistiksel olarak Grup 4'te yüksekliği gözlenmiştir($p=0,002$). Yine Masquelet tekniğe CGF eklenen 8.hafta kemik iyileşmesinin değerlendirildiği Grup 2 ile CGF eklenmeyen kontrol grubu Grup 1 karşılaştırıldığında; Grup 2'nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek *BV / TV* oranına sahip olduğu tespit edilmiştir($p=0,032$).

Çalışmamızın limitasyonları, gruplarda kullanılan denek sayısının az olması, kemik iyileşmesi değerlendirilmesi için histopatolojik ve radyolojik inceleme ile beraber yeni kemik oluşumu immünohistokimyasal olarak da incelenebilirdi. Çalışmamızdaki bir diğer sınırlama da hayvan çalışması olması nedeniyle klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak; kısa dönem grupların karşılaştırmasında CGF eklenen grubun radyolojik olarak mikroBT ile değerlendirmesinde yeni kemik oluşumunun istatistiksel anlamlı yüksekliği dikkat çekmiştir. Uzun dönem grupların karşılaştırmasında CGF eklenen grubun; histopatolojik ve radyolojik olarak mikroBT ile değerlendirmesinde yeni kemik oluşumunun çarpıcı yüksekliği istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında Masquelet tekniğın CGF ile birleştirilmesinin büyük diyafizer kemik defektlerinde kemik iyileşmesinin arttırılması ve iyileşme süresinin kısaltılması için önemli bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

1. Masquelet, A., et al. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. in *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2000.
2. Pelissier, P., et al., Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes. *British journal of plastic surgery*, 2002. **55**(7): p. 596-598.
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. Weiland, A.J., Current concepts review: vascularized free bone transplants. *JBJS*, 1981. **63**(1): p. 166-169.
5. 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.
6. 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**(e rkunion annuelle): p. 109-110.
7. Pelissier, P., et al., Bone reconstruction of the lower extremity: complications and outcomes. *Plastic and reconstructive surgery*, 2003. **111**(7): p. 2223-2229.
8. 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.
9. 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.

10. Giannoudis, P.V., et al., The synergistic effect of autograft and BMP-7 in the treatment of atrophic nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 2009. **467**(12): p. 3239.
11. 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.
12. Choukroun, J., et al., Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*, 2001. **42**(55): p. e62.
13. 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.
14. Miller, J., et al., *Form and function of bone*. Orthopaedic Basic Science: foundations of clinical practice, 2007. **3**: p. 129-157.
15. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 1998. **355**: p. S7-S21.
16. Gerstenfeld, L.C., et al., Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006. **54**(11): p. 1215-1228.
17. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. *Injury*, 2011. **42**(6): p. 551-555.
18. Gerber, H.-P., et al., VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature medicine*, 1999. **5**(6): p. 623.
19. Miclau, T., et al., *Bone injury, regeneration, and repair*. Orthopedic basic science: foundations of clinical practice. Rosemont, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons, 2007: p. 331-48.
20. 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.
21. 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.
22. Kumar, G. and B. Narayan, The biology of fracture healing in long bones, in *Classic Papers in Orthopaedics*. 2014, Springer. p. 531-533.
23. Wray, J.B., Acute changes in femoral arterial blood flow after closed tibial fracture in dogs. *JBJS*, 1964. **46**(6): p. 1262-1268.

24. Chung, R., et al., Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *Journal of leukocyte biology*, 2006. **80**(6): p. 1272-1280.
25. Bastian, O., et al., Systemic inflammation and fracture healing. *Journal of leukocyte biology*, 2011. **89**(5): p. 669-673.
26. Alexander, K.A., et al., Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *Journal of bone and mineral research*, 2011. **26**(7): p. 1517-1532.
27. Xing, Z., et al., Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Disease models & mechanisms*, 2010. **3**(7-8): p. 451-458.
28. Glynne Andrew, J., et al., Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1994. **65**(4): p. 462-466.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Perren, S.M., Evolution of the internal fixation of long bone fractures: the scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *Bone & Joint Journal*, 2002. **84**(8): p. 1093-1110.
34. Einhorn, T.A., The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 1998. **355**: p. S7-S21.
35. Sandberg, M., H.T. Aro, and E.I. Vuorio, *Gene expression during bone repair*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1993(289): p. 292-312.
36. Buckwalter, J., et al., Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instructional course lectures*, 1996. **45**: p. 387-399.
37. Green, D.P., *Rockwood and Green's fractures in adults*. Vol. 1. 2010: Lippincott Williams & Wilkins.
38. Keramaris, N., et al., Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*, 2008. **39**: p. S45-S57.

39. Kanczler, J. and R. Oreffo, Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*, 2008. **15**(2): p. 100-114.
40. 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.
41. 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.
42. Panjabi, M. and W. Southwick, *The four biomechanical stages of fracture repair*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1977. **59**(2): p. 188-192.
43. Van der Wiel, H., et al., Loss of bone in the proximal part of the femur following unstable fractures of the leg. *JBJS*, 1994. **76**(2): p. 230-236.
44. 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.
45. Browner, B.D., *Skeletal trauma: basic science, management, and reconstruction*. Vol. 1. 2009: Elsevier Health Sciences.
46. 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.
47. Praemer, A., et al., *Musculoskeletal conditions in the United States*. 1992.
48. 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.
49. Claes, L., et al., Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *Journal of orthopaedic research*, 1997. **15**(4): p. 577-584.
50. Perren, S. and J. Cordey, *The concept of interfragmentary strain*. Current concepts of internal fixation of fractures, 1980: p. 63-77.
51. Hulth, A., *Current concepts of fracture healing*. Clinical orthopaedics and related research, 1989(249): p. 265-284.
52. 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.
53. Adams, C. and J. Keating, Cigarette smoking and open tibial fractures. *Injury*, 2001. **32**(1): p. 61-65.
54. Daftari, T.K., et al., Nicotine on the Revascularization of Bone Graft: An Experimental Study in Rabbits. *Spine*, 1994. **19**(8): p. 904-911.

55. 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.
56. 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.
57. Fang, M., et al., Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone*, 1991. **12**(4): p. 283-286.
58. Schmitz, M.A., et al., Effect of smoking on tibial shaft fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 1999. **365**: p. 184-200.
59. Brown, C.W., T.J. Orme, and H.D. Richardson, The rate of pseudarthrosis (surgical nonunion) in patients who are smokers and patients who are nonsmokers: a comparison study. *Spine*, 1986. **11**(9): p. 942-943.
60. Brown, K.M., et al., Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. *JBJS*, 2004. **86**(1): p. 116-123.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. Kurmis, A.P., et al., The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drug administration on acute phase fracture-healing: a review. *JBJS*, 2012. **94**(9): p. 815-823.
67. Waters, R.V., et al., Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 2000. **71**(3): p. 316-321.
68. Bogoch, E.R., G. Ouellette, and D.E. Hastings, Intertrochanteric fractures of the femur in rheumatoid arthritis patients. *Clinical orthopaedics and related research*, 1993(294): p. 181-186.

69. Huddleston, P., et al., Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*, 2000. **82**(2): p. 161-73.
70. Karladani, A., et al., The influence of fracture etiology and type on fracture healing: a review of 104 consecutive tibial shaft fractures. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2001. **121**(6): p. 325-328.
71. Reed, A., et al., Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *Bone & Joint Journal*, 2003. **85**(4): p. 604-610.
72. Uthoff, H. and B. Rahn, *Healing patterns of metaphyseal fractures*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1981(160): p. 295-303.
73. Calori, G., et al., Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury*, 2007. **38**: p. S11-S18.
74. Court-brown, C. and M. McQueen, Compartment syndrome delays tibial union. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1987. **58**(3): p. 249-252.
75. Chapman, M.W., R.M. Szabo, and R.A. Marder, *Chapman's orthopaedic surgery*. Vol. 10. 2001: Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
76. Marsh, D., Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clinical orthopaedics and related research*, 1998. **355**: p. S22-S30.
77. Frölke, J.P.M. and P. Patka, Definition and classification of fracture non-unions. *Injury*, 2007. **38**: p. S19-S22.
78. Guarniero, R., et al., Study of fracture healing in protein malnutrition. *Revista paulista de medicina*, 1991. **110**(2): p. 63-68.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Guarniero, R., et al., Study of fracture healing in protein malnutrition. *Revista paulista de medicina*, 1992. **110**(2): p. 63-68.

84. Kyrö, A., et al. Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures? in *Annales chirurgiae et gynaecologiae*. 1993.
85. Schmitz, M.A., et al., *Effect of smoking on tibial shaft fracture healing*. Clinical orthopaedics and related research, 1999(365): p. 184-200.
86. Beam, H.A., J.R. Parsons, and S.S. Lin, The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002. **20**(6): p. 1210-1216.
87. Bennett, M.H., R. Stanford, and R. Turner, Hyperbaric oxygen therapy for promoting fracture healing and treating fracture non-union. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005. **1**.
88. Friedenber, Z. and C.T. Brighton, *Bioelectric potentials in bone*. *J Bone Joint Surg Am*, 1966. **48**(5): p. 915-923.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. Mayo, K. and S. Benirschke, Treatment of tibial malunions and nonunions with reamed intramedullary nails. *The Orthopaedic clinics of North America*, 1990. **21**(4): p. 715-724.
93. 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.
94. 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.
95. Bellabarba, C., W.M. Ricci, and B.R. Bolhofner, Results of indirect reduction and plating of femoral shaft nonunions after intramedullary nailing. *Journal of orthopaedic trauma*, 2001. **15**(4): p. 254-263.
96. Hierholzer, C., et al., Plate fixation of ununited humeral shaft fractures: effect of type of bone graft on healing. *JBJS*, 2006. **88**(7): p. 1442-1447.
97. Richmond, J., et al., Nonunions of the distal tibia treated by reamed intramedullary nailing. *Journal of orthopaedic trauma*, 2004. **18**(9): p. 603-610.

98. 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.
99. 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.
100. Grundnes, O., S.E. Utvåg, and O. Reikerås, Restoration of bone flow following fracture and reaming in rat femora. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1994. **65**(2): p. 185-190.
101. Whittle, A.P., W. Wester, and T.A. Russell, *Fatigue failure in small diameter tibial nails*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1995(315): p. 119-128.
102. Frölke, J.P.M., et al., Viable osteoblastic potential of cortical reamings from intramedullary nailing. *Journal of orthopaedic research*, 2004. **22**(6): p. 1271-1275.
103. Wenisch, S., et al., Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. *Bone*, 2005. **36**(1): p. 74-83.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. Templeman, D., et al., Exchange reamed intramedullary nailing for delayed union and nonunion of the tibia. *Clinical orthopaedics and related research*, 1995(315): p. 169-175.
109. Schwartzman, V., S.H. Choi, and R. Schwartzman, Tibial nonunions. Treatment tactics with the Ilizarov method. *The Orthopedic clinics of North America*, 1990. **21**(4): p. 639-653.
110. Madanagopal, S.G., D. Seligson, and C.S. Roberts, The antibiotic cement nail for infection after tibial nailing. *Orthopedics*, 2004. **27**(7): p. 709-712.
111. 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.
112. Papakostidis, C., et al., Femoral-shaft fractures and nonunions treated with intramedullary nails: the role of dynamisation. *Injury*, 2011. **42**(11): p. 1353-1361.

113. 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.
114. 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.
115. Başbozkurt, M., B. Demiralp, and V. Kırdemir, *Psödoartrozların ilizarov Yöntemi ile Tedavisi*. 2004.
116. Atkins, R.M., Principles of management of septic non-union of fracture. Injury, 2007. **38**: p. S23-S32.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. Cierny 3rd, G. and K.E. Zorn, Segmental tibial defects. Comparing conventional and Ilizarov methodologies. Clinical orthopaedics and related research, 1994(301): p. 118-123.
121. Marsh, D., et al., The Ilizarov method in nonunion, malunion and infection of fractures. J Bone Joint Surg Br, 1997. **79**(2): p. 273-279.
122. Ilizarov, G.A., Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. Clinical orthopaedics and related research, 1990(250): p. 8-26.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. Chapman, M.W. and C.G. Finkemeier, Treatment of supracondylar nonunions of the femur with plate fixation and bone graft. JBJS, 1999. **81**(9): p. 1217-28.
127. Ikeda, K., et al., Long-term follow-up of vascularized bone grafts for the reconstruction of tibial nonunion: evaluation with computed tomographic scanning. The Journal of trauma, 1992. **32**(6): p. 693-697.

128. Banic, A. and R. Hertel, Double vascularized fibulas for reconstruction of large tibial defects. *Journal of reconstructive microsurgery*, 1993. **9**(06): p. 421-428.
129. Han, C.-S., M. Wood, and A.T. Bishop, *Vascularized bone transfer*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1992. **74**(10): p. 1441-1449.
130. Bielecki, T., T. Gazdzik, and T. Szczepanski, Benefit of percutaneous injection of autologous platelet-leukocyte-rich gel in patients with delayed union and nonunion. *European Surgical Research*, 2008. **40**(3): p. 289-296.
131. Mariconda, M., et al., Platelet gel supplementation in long bone nonunions treated by external fixation. *Journal of orthopaedic trauma*, 2008. **22**(5): p. 342-345.
132. Beresford, J.N., *Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1989(240): p. 270-280.
133. Sen, M. and T. Miclau, Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*, 2007. **38**(1): p. S75-S80.
134. Ueng, S.W., et al., Bone healing of tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 1999. **46**(1): p. 110-115.
135. 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.
136. Paley, D. and D.C. Maar, Ilizarov bone transport treatment for tibial defects. *Journal of orthopaedic trauma*, 2000. **14**(2): p. 76-85.
137. Yasui, N., et al., *Factors affecting callus distraction in limb lengthening*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1993(293): p. 55-60.
138. Aronson, J., et al., The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clinical orthopaedics and related research*, 1989(241): p. 106-116.
139. Hertel, R., et al., 10. Cancellous bone graft for skeletal reconstruction Muscular versus periosteal bed—Preliminary report. *Injury*, 1994. **25**: p. SA59-SA70.
140. 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.
141. Masquelet, A., et al. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. in *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2000.
142. Masquelet, A.C. and T. Begue, The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthopedic Clinics*, 2010. **41**(1): p. 27-37.

143. 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.
144. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang. *Foreign body reaction to biomaterials. in Seminars in immunology*. 2008. Elsevier.
145. Patel, J., et al., Foreign body-induced granulation tissue is a source of adult stem cells. *Translational Research*, 2010. **155**(4): p. 191-199.
146. 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.
147. 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.
148. von Hundelshausen, P. and C. Weber, Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circulation research*, 2007. **100**(1): p. 27-40.
149. Anitua, E., et al., New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends in biotechnology*, 2006. **24**(5): p. 227-234.
150. Intini, G., The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*, 2009. **30**(28): p. 4956-4966.
151. 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.
152. 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.
153. Fürst, G., et al., Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. *Clinical Oral Implants Research*, 2003. **14**(4): p. 500-508.
154. Gerard, D., et al., Effects of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone-grafted mandibular defects in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2007. **65**(4): p. 721-727.
155. Metzler, P., et al., The effect of current used bone substitution materials and platelet-rich plasma on periosteal cells by ectopic site implantation: an in-vivo pilot study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2012. **40**(5): p. 409-415.
156. Eyrich, D., A. Göpferich, and T. Blunk, *Fibrin in tissue engineering*, in *Tissue Engineering*. 2006, Springer. p. 379-392.

157. 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.
158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. Mescher, A.L., Junqueira's basic histology: text and atlas. 2013: Mcgraw-hill.
164. Bumbu, B.A., et al., Histological evidence concerning the osseointegration of titanium implants in the fractured rabbit femur. Journal of Histotechnology, 2016. **39**(2): p. 47-52.
165. Cakir, M., et al., Experimental Evaluation of the Effects of Ankaferd Blood Stopper and Collagenated Heterologous Bone Graft on Bone Healing in Sinus Floor Augmentation. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2014. **72**(9): p. e63-e64.
166. Mauffrey, C., et al., Masquelet technique for the treatment of segmental bone loss have we made any progress? Injury, 2016. **47**(10): p. 2051-2052.
167. Dimitriou, R., et al., Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. Injury, 2011. **42**: p. S3-S15.
168. Topkara, A., et al., Effect of concentrated growth factor on survival of diced cartilage graft. Aesthetic surgery journal, 2016. **36**(10): p. 1176-1187.
169. Durmuslar, M.C., et al., Histological evaluation of the effect of concentrated growth factor on bone healing. Journal of Craniofacial Surgery, 2016. **27**(6): p. 1494-1497.
170. Toker, H., et al., Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. Archives of oral biology, 2012. **57**(11): p. 1545-1550.

171. Iwaniec, U.T., T.J. Wronski, and R.T. Turner, *Histological analysis of bone*, in *Alcohol*. 2008, Springer. p. 325-341.
172. Shim, J.-H., et al., Stimulation of healing within a rabbit calvarial defect by a PCL/PLGA scaffold blended with TCP using solid freeform fabrication technology. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012. **23**(12): p. 2993-3002.
173. Kulak, C.A.M. and D.W. Dempster, Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2010. **54**(2): p. 87-98.
174. Ferrara, N., H.-P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nature medicine*, 2003. **9**(6): p. 669.
175. 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*, 2016. **10**(10).
176. Britz, H., et al., 3D visualization and quantification of rat cortical bone porosity using a desktop micro-CT system: a case study in the tibia. *Journal of microscopy*, 2010. **240**(1): p. 32-37.
177. Cowan, C.M., et al., MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue engineering*, 2007. **13**(3): p. 501-512.
178. Maréchal, M., et al., Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clinical oral implants research*, 2005. **16**(6): p. 708-714.
179. Pirpir, C., et al., Evaluation of effectiveness of concentrated growth factor on osseointegration. *International journal of implant dentistry*, 2017. **3**(1): p. 7.
180. Verdelis, K., et al., MicroCT morphometry analysis of mouse cancellous bone: intra- and inter-system reproducibility. *Bone*, 2011. **49**(3): p. 580-587.
181. 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.
182. 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.
183. 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.
184. Panagiotis, M., Classification of non-union. *Injury*, 2005. **36**(4): p. S30-S37.

185. 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.
186. Ruedi, T.P. and W.M. Murphy, *Principles of fracture management*. 2000: Thieme Stuttgart.
187. Schenk, R., *Histology of fracture repair and non-union*. 1978: Swiss Association for the Study of Internal Fixation.