

T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

KEMİK DEFEKTLERİNE UYGULANAN TİP I
KOLLAJENİN OSTEOGENEZE SPESİFİK GENLERE
ETKİSİ VE HİSTOPATOLOJİK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR YİĞİTER

DANIŞMAN: PROF. DR. FAHİR DEMİRKAN

DENİZLİ-2010

T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

KEMİK DEFEKTLERİNE UYGULANAN TİP I
KOLLAJENİN OSTEOGENEZE SPESİFİK GENLERE
ETKİSİ VE HİSTOPATOLOJİK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR YİĞİTER

DANIŞMAN: PROF. DR. FAHİR DEMİRKAN

DENİZLİ-2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
KEMİK DOKU ve HİSTOLOJİSİ	3
KEMİK MATRİKSİ	3
KIRIK TANIMI	4
KIRIK İYİLEŞMESİNİN EVRELERİ	5
Primer Kırık iyileşmesi	5
Gap İyileşmesi	6
Kontakt İyileşmesi	6
Sekonder Kırık İyileşmesi	7
İnflamatuar (Hematom, Yangı) Dönem	7
Onarım (Reperasyon) Dönemi	9
Kemiğin Yeniden Şekillenme (Remodeling) Dönemi	11
KIRIK TAMİRİ SIRASINDA GEN EKSPRESYONU	12
Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF-β)	12
Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)	13
Osteonektin	14
Osteokalsin	15
Osteopontin	15
Fibronektin	16
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	16
İnterlökinler (IL)	17
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)	17
Kemik Morfojenik Proteini Reseptörleri (BMPRs)	18
SMAD'lar	18
Kollajenler	19

KEMİK İYİLEŞMESİNDE KOLLAJEN	20
Kollajen Süperfamilyası	20
Normal Kemikte Kollajen	21
Kemik İyileşmesinde Kollajen	21
GEREÇ VE YÖNTEM	24
Çalışma planı	24
Cerrahi teknik	26
RNA izolasyonu	28
cDNA sentezi	28
Real-time PCR	29
Histopatolojik Değerlendirme	31
İstatistiksel Analiz	32
BULGULAR	33
Histopatolojik Bulgular	33
Birinci Hafta	33
Üçüncü Hafta	39
Altıncı Hafta	45
Mikroarray Gen Analizi	54
TARTIŞMA	59
SONUÇ	88
ÖZET	90
İNGİLİZCE ÖZET	92
KAYNAKLAR	94

TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo-1 Kırık iyileşmesinin Huo skorlama sistemi	32
Tablo-2 1. hafta hücre tipinin ratlardaki dağılımı	33
Tablo-3 1. hafta granülasyon dokusunun ratlardaki dağılımı	34
Tablo-4 1. hafta vasküler invazyonunun ratlardaki dağılımı	34
Tablo-5 1. hafta kırık oluşumunun ratlardaki dağılımı	35
Tablo-6 1. hafta osteoblastik aktivitenin ratlardaki dağılımı	36
Tablo-7 1. hafta yeni kemik oluşumunun ratlardaki dağılımı	37
Tablo-8 1. hafta fibröz doku varlığının ratlardaki dağılımı	37
Tablo-9 1. hafta yabancı cisim reaksiyonunun ratlardaki dağılımı	38
Grafik-1 1. haftada Huo evrelemesine göre ratların dağılımı	38
Tablo-10 3. hafta hücre tipinin ratlardaki dağılımı	39
Tablo-11 3. hafta granülasyon dokusunun ratlardaki dağılımı	40
Tablo-12 3. hafta vasküler invazyonunun ratlardaki dağılımı	41
Tablo-13 3. hafta kırık gelişiminin ratlardaki dağılımı	41
Tablo-14 3. hafta osteoblastik aktivitenin ratlardaki dağılımı	42
Tablo-15 3. hafta yeni kemik oluşumunun ratlardaki dağılımı	42
Tablo-16 3. hafta fibröz doku oluşumunun ratlardaki dağılımı	43
Tablo-17 3. hafta yabancı cisim reaksiyonunun ratlardaki dağılımı	43
Grafik-2 3. haftada Huo evrelemesine göre ratların dağılımı	45
Tablo-18 6. hafta hücre tipinin ratlara göre dağılımı	45
Tablo-19 6. Hafta granülasyon dokusunun ratlara göre dağılımı	46
Tablo-20 6. hafta vasküler invazyonunun ratlardaki dağılımı	46
Tablo-21 6. hafta kırık oluşumunun ratlardaki dağılımı	47
Tablo-22 6. hafta osteoblastik aktivitenin ratlardaki dağılımı	47
Tablo-23 6. hafta yeni kemik oluşumunun ratlardaki dağılımı	48
Tablo-24 6. hafta fibröz dokunun ratlardaki dağılımı	49
Tablo-25 6. hafta yabancı cisim reaksiyonunun ratlardaki dağılımı	49
Grafik-3 6. haftada Huo evrelemesine göre ratların dağılımı	50
Grafik-4 Hücre tipinin haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı	50
Grafik-5 Granülasyon dokusunun haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı	51

Grafik-6 Vasküler invazyonun haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı	51
Grafik-7 Kıkırdak dokusu gelişiminin haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı	52
Grafik-8 Osteoblastik aktivitenin haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı	52
Grafik-9 Yeni kemik oluşumunun haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı	53
Grafik-10 Fibröz doku varlığının haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı	53
Grafik-11 Yabancı cisim varlığının haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı	54
Tablo-26 Çalışmamızda değerlendirilen genler	55

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Resim-1 Tip I kollajen uygulanmış defekt	25
Resim-2 Boş bırakılan defekt	25
Resim-3 Defekt oluşturulması.....	27
Resim-4 Oluşturulan defekt ve uygulanacak tip I kollajen	27
Resim-5 Tip I kollajen ile doldurulmuş defekt	28
Resim-6 1. hafta kontrol grubu histopatolojik görünüm (HE×4)	35
Resim-7 Deney grubu 1. hafta histopatolojik görünüm (HE×4)	36
Resim-8 3. Hafta kontrol grubun histopatolojik görünüm (HE×4)	40
Resim-9 Deney grubunun 3. hafta histopatolojik görünüm (HE×10)	42
Resim-10 a) Kontrol grubunun 3. hafta histopatolojik görünümü (HE×4)	44
Resim-10 b) Deney grubunun 3. haftadaki histopatolojik görünümü (HE×10)	44
Resim-11 6. hafta kontrol grubunun histopatolojik görünüm (HE×4)	47
Resim-12 6. hafta deney grubu histopatolojik görünümü (HE×4)	48

KISALTMALAR

TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktör Beta
BMP	: Kemik Morfojenik Protein
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
Ca ⁺²	: Kalsiyum
PO ₄	: Fosfat
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
Bglap	: Osteokalsin, Kemik γ -Karboksiglutamat protein
BMPR	: Kemik Morfojenik Protein Reseptörü
Smad	: SMAD family member
IL	: İnterlökin
GMCSF	: Granülosit Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör
MCSF	: Monosit stimüle edici faktör
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
BDGF	: Kemikten türetilmiş büyüme faktörü
PG-E ₂	: Prostaglandin-E ₂
OP-1	: Osteogenik protein 1, Kemik Morfojenik Protein-7
Osf2/Cbfa1	: Core Binding Factor alpha-1
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
c-myc	: Selüler Myelositomatososis Onkogen
c-fos	: FBJ Osteosarkom Onkogen
NCSF	: Nötrofil Koloni Stimüle Edici Faktör
DBM	: Deminaralize Kemik Matris
cDNA	: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre

ng	: Nanogram
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
C°	: Santigrad Derece
ddH ₂ O	: İki Kez Distile Su
H-E	: Hematoksilen-Eosin
IGFBP	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
Col3 α 1	: Kollajen Tip III alfa 1
Cdkn1a/p21	: Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A
Fst	: Follistatin
Ltbp	: Latent Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Bağlayıcı Protein
Gdf	: Büyüme Başkalaşım Faktör
Col1 α 1	: Kollajen Tip I alfa 1
PDGF- β	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Beta Polipeptit
Col1 α 2	: Kollajen Tip I alfa 2
Serpine-1	: Serin peptidaz inhibitörü
Cst -3	: Cystatin C
Id-1	: DNA Bağlayıcı inhibitör 1
TGF- β R	: Dönüştürücü Büyüme Faktör Beta Reseptörü
AcvrI	: Aktivin Tip I Reseptör
AcvrIIA	: Aktivin A Tip II Reseptör
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa

Prof.Dr.A.Fahir DEMİRKAN danışmanlığında Dr. Özgür YİĞİTER tarafından yapılan "Kemik Defektlerine Uygulanan Tip I Kollajenin Osteogeneze Spesifik Genler Etkisi ve Histopatolojik İncelenmesi" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof.Dr. B.Alper KILIÇ



ÜYE Prof.Dr. A.Fahir DEMİRKAN



ÜYE Doç.Dr. A.Esat KITER



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

02.06.2010

Prof. Dr. Zafer AYBEK

T.C. Dekan

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANI

GİRİŞ

Günümüzde motorlu taşıt kazalarına, iş kazalarına, psödoartrozlara, osteomyelit ve tümöral oluşumlara bağlı olarak kemik defektlerine çok sık rastlanmaktadır. Kemik defektlerinin tedavisi oldukça zor ve maliyetli olması yanı sıra iş gücü kaybı ve sakatlık bırakması nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2004 yılında olan bütün yaralanmaların %60-67'si kas iskelet sistemine aitti. Bu yaralanmaların % 25'inde kırıklar için girişimde bulunulmuştur. Kırık hastalarının yıllık maliyeti ise yaklaşık 23,44 milyar dolar idi (1,2). Bununla birlikte; travma veya tümör rezeksiyonundan kaynaklanan geniş osseoz defektlerin olduğu kaynamamış kırıklar (3) ve uzun kemiklerin kaynamama insidansı %5-20 arasındadır ve bu vakalardaki hastane maliyetleri artmaktadır (1,2).

Kemik defektlerinin tedavisinde otolog kansellöz kemik greftleri, kaynamama olan bölgede lokal mikro çevrenin uyarılması yoluyla kaynamayı artırmak amacıyla kullanılan altın standart metottur. Bununla birlikte, klinik çalışmalar segmental kemik defektlerinin cerrahi tedavisi sonrasında % 30'a varan istenilmeyen sonuçlar olduğunu göstermiştir (3,4).

Otolog kemik greftlerinin sınırlı elde edilebilmesi, alınan bölgede ağrı, nörovasküler yaralanma veya enfeksiyon gibi sonuçların görülmesi biyolojik uyarma için alternatif yolların araştırılması gerektiğini ortaya çıkarmıştır (3-10). Otolog kemik greftlerinin yerini alacak maddenin ise hem osteokondüktif hem de osteoindüktif özelliğinin olması gerekmektedir. Ayrıca bu materyal immünolojik bir red oluşturmamalı ve reaksiyon yaratmamalıdır. Aynı zamanda kolay elde edilebilir olması ve maliyetininde düşük olması ile otolog kemik greftlerine üstünlük sağlamalıdır.

Biz bu amaçla özellikle omurgalıların hemen hemen bütün dokularında ekstraselüler matriksde bulunan ana bileşen olan kollajen ile çalışmayı uygun gördük (11). Özellikle kemikte ana protein olan Tip I kollajen ön plana çıkmaktadır.

Kollajen peptitlerinin çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu ve saklayıcı ve immünoterapetik ajanlar olarak kullanıldığı son zamanlarda gösterilmiştir (11). Kollajenler özellikle yapışmayı, çoğalmayı ve pek çok hücrenin farklılaşmasını teşvik ederler (12). Üç boyutlu tip I kollajen jelleri kemik defektlerindeki osteokondüksiyon için uygun bir ortam sağlayabilirler (12). Tip I kollajenin TGF- β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) ve BMP'leri (Kemik Morfojenik Protein) içeren TGF familyasının kemik indükleyen büyüme faktörlerine bağlandığı gösterilmiştir (12). Kollajen liflerinin; hücre migrasyonunu ve osteogenik farklılaşmayı nasıl sağladığı tam olarak bilinmemektedir. Genel olarak kollajen lifleri çeşitli hücre tiplerinin migrasyonu için iskelet görevi görürler. Ek olarak kollajen diğer matriks proteinlerine, bu moleküllerin kollajen bağlayan parçası aracılığıyla bağlanabilir. Kollajen hücre migrasyonunda, hücre-matriks ve matriks-matriks ilişkilerinde önemli rol oynar. Kollajen lifleri; BMP'ler, TGF'ler, IGF'ler (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü) ve FGF'ler (Fibroblast Büyüme Faktörü) gibi bazı osteoindüktif faktörleri saklayabilir. Bunların kemik matriksinden kolayca salgılanmasını sağlayabilir. Kollajenin kendisi bu osteoindüktif maddelere bağlanmasa da bu faktörlere yüksek afinitesi olan çeşitli ekstraselüler matrikslere bağlanabilir. Çeşitli osteoindüktif maddelerin kollajen lifleri tarafından tutunması mümkün olabilir ve daha önce göç eden hücrelerin osteoblastik hücrelere dönüşümünü sağlayabilir. İlave olarak tip I kollajen osteoblastik farklılaşmada direkt olarak önemli bir rol oynayabilir. Tip I kollajenin $\alpha 1$ zinciri osteogenik hücrelerde ki $\alpha 2\beta 1$ integrinine benzerdir (13).

Tip I kollajen ile ilgili yapılan bütün çalışmalar aynı sonucu vermemiştir. Bu yüzden biz Tip I kollajenin hem osteoindüktif etkisini hemde osteokondüktif etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Bunun için osteogeneze spesifik TGF- β ailesini üyesi olan gen ekspresyonlarına etkisini araştırdık. Aynı zamanda kırık iyileşmesi sırasında bu gen ekspresyonlarında ne gibi değişiklikler olduğunu da değerlendirmiş olduk.

GENEL BİLGİLER

Kırık; kemiğin anatomik bütünlüğünün tam veya kısmen bozulması şeklinde tarif edilebilir (14). Günümüzde artan trafik ve iş kazalarının yanı sıra, yaşlı nüfusun artması nedeniyle kırıkların sık görülmesi, kırık iyileşmesini önemli bir sağlık problemi haline getirmiştir. Bu konudaki çalışmalar kırık iyileşmesini hızlandırmak üzerine yoğunlaşmaktadır. Ortopedi kliniklerinde kırık tedavisindeki başlıca hedefler; hastanın ağrısız hale getirilmesi ve mümkün olan en hızlı şekilde kırık iyileşmesine yardımcı olunarak hastanın mobilizasyonun sağlanmasıdır.

KEMİK DOKU ve HİSTOLOJİSİ

Kemik insan vücudunun en sert dokularından biridir. En önemli iki özelliği dengeyi sağlayan destek dokusu olması ve metabolik olarak vücuttaki kalsiyum (Ca^{+2}) dengesi için bir banka görevi görmesidir. Hayati organların barındığı vücutun önemli boşluklarını dışarıdan kuşatarak korur (15). Kan hücrelerinin sentezi, kalsiyum, fosfat (PO_4) gibi minerallerin depolanması ve salınması kemik doku sayesinde olur (16,17). Kas kasılması ile oluşan kuvvetler kemiklerin oluşturduğu kaldıraç sistemleri sayesinde artarak vücutsal harekete dönüşür (17). Kemik dokuda; osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlar olmak üzere üç ayrı hücre izlenir (16,17). Osteositler matriksin lakuna adı verilen boşluklarında yer alırlar. Kabaca kemik dokuyu idame ettirirler. Matür iskeletteki hücrelerin %90'ını osteositler oluşturur. Osteoblastlar, matriksin organik kısımlarının sentezini yaparlar (18). Osteoklastlar ise çok çekirdekli dev hücreler olup, kemik dokusunun rezorpsiyonu ve yeniden şekillenmesini sağlarlar (16,17).

KEMİK MATRİKSİ

Kemik, özel bir bağ dokusudur. Kemik matriksi adı verilen hücreler arası madde kalsifiye olmuştur. Matriksi; kuru ağırlığının kabaca %40'ı oranında organik, %60 oranında da inorganik bileşenler oluşturur (16-20). Özellikle Ca^{+2} ve PO_4 başta olmak üzere bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum inorganik

maddeler arasında bulunur. Organik bileşenler arasında kollajen, proteoglikanlar, kollojen dışı matriks proteinleri, büyüme faktörleri ve sitokinler sayılabilir (18). Kollojen kısım primer olarak Tip 1 kollojenden oluşur ve bu molekülün sonlanma bölgelerinde bulunan boşluklara mineral birikimi olmasıyla kalsifikasyon sağlar (16,17,19). Hidroksiapatit ile kollajen lifler arasındaki bağlar, kemiğin karakteristik sertliğinden ve dayanıklılığından sorumludur (19).

Kemik, kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan zarlarla örtülüdür. Bu zarlardan dıştakine periosteum, içtekine de endosteum denir. Periosteumun dış tabakası kollajen lifler ve fibroblastlardan oluşmuştur. Hücreden daha zengin olan periosteumun iç tabakası, bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyeline sahip olan yassı hücrelerden zengindir. Bu hücreler kemiğin büyümesi ve onarımında başlıca rolü oynarlar. Endosteum, kemiğin içindeki bütün boşlukları örter ve tek katlı yassı osteoprogenitör hücreler ile çok az miktarda bağ dokusundan oluşur. Periosteum ve endosteumun temel işlevleri, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları kesintisiz olarak sağlamaktır (20-22). Bu nedenlerle kemik cerrahisinde periosteum ve endosteumun korunmasına çok dikkat edilir.

KIRIK TANIMI

Dıştan veya içten etki eden kuvvetlerle kemiğin anatomik bütünlüğünün ve devamlılığının bozulmasına “kırık” denir (23,24). Bu kuvvetlerin şiddetine ve kemiğin bu şoku absorbe edebilme yeteneğine göre kırıklar ufak bir çatlaktan (fissür), bir veya birçok kemiğin kırılmasına ve hatta komşu eklemlerde çıkık oluşturabilmesine (kırıklı-çıkık) kadar değişiklikler gösterebilir. Kırığı oluşturan kuvvetler sadece kemik dokuda ayrılma değil, beraberinde kemiğin etrafındaki yumuşak dokuları (deri, kaslar, tendonlar, ligamentler, damarlar ve sinirler) ve hatta komşuluğundaki organlarda da hasar oluşturabilirler (25,26).

KIRIK İYİLEŞMESİNİN EVRELERİ

Yumuşak dokudaki iyileşme sonrasında skar oluşumundan farklı olarak kırık iyileşmesi, sonuçta kemiğin anatomisinin yeniden oluştuğu ve tamamen fonksiyonunun geri döndüğü çok önemli bir süreçtir (25). Kırık sonrası ortaya çıkan fizyolojik reaksiyonlar, bozulan kemik bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yöneliktir. Kırık iyileşmesi, kırık oluştuğu anda başlar ve kırık uçlarının düzenli kemik dokusu ile birleşmesine kadar devam eder (27,28). Genel olarak kırık iyileşmesi yaralanmadan sonra 6 ila 8 haftada tamamlanır (25). Kırık iyileşmesi bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamış 2 ana katagoriye ayrılabilir (25):

1. primer (direkt veya kortikal)

2. sekonder (indirek spontan) kemik iyileşmesi

Bu iki durum pek çok biyolojik olayın ardışık koordinasyonunu içeren çok kompleks bir süreçtir. Moleküler biyolojideki son yılladaki gelişmelerle iyileşmenin spesifik evrelerinde, çeşitli sinyal moleküllerinin tanımlanması mümkün olmuştur (25).

Primer Kırık iyileşmesi

Genellikle ayrılmamış ve rijit osteosentez uygulanan kırıklarda görülür. Primer kemik iyileşmesi her iki ucun kompresyonuyla veya kompresyonsuz rijit stabilizasyonunu gerektirir (29). Sekonder kemik iyileşmesinden farklı olarak bu rijit stabilizasyon ya kansellöz ya da kortikal kemikte kallus oluşumunu baskılar (23,25). Radyolojik olarak kallus görülmez. Primer iyileşme nadirdir (25). Bazı araştırmacılar kırık tamirinin amacının bu tip bir iyileşme olduğunu kabul etmesine rağmen pek çok şekilde sekonder kemik iyileşmesine üstün bir avantajının olduğu gösterilememiştir (25,30). Ara evreler zayıftır ve anarebik ortamda gerçekleşmez (25). Kırıkta süreç yoktur. Bu nedenle intramembranöz kemikleşmeye benzetilir. Primer kemik iyileşmesi gap iyileşmesi ve kontakt iyileşmesi olmak üzere ayrılabilir.

Gap İyileşmesi

Gap iyileşmesi iki aşamada oluşur. İlk aşamada gapin genişliği direk kemik ile dolar (25). Ağsı kemiğin başlangıç yapı iskelesi döşenir ve takiben destek olarak paralel fiber ve/veya lameller kemik oluşumu ile desteklenir (23,31). Bu kemiğin oryantasyonu orijinal lameller kemik oryantasyonundaki gibi transversdir. Kemiğin üretiminden önce bu gapde konnektif doku veya fibrokartilaj yoktur. Birkaç hafta sonra oluşan ikinci fazda dikey haversiyen remodeling nekrotik kırık uçlarını ve yeni oluşan kemiği rekonstrükte eder ve kırık hattında orijinal yapısındaki osteonlarla yer değiştirir (25,31).

Kontakt İyileşmesi

Gap iyileşmesiyle karşılaştırıldığında kontakt iyileşmesi; fragmanların direk bir arada olduğu ve osteonların gerçekten kemiğin uzun aksına paralel bir şekilde, kırık hattını geçerek büyüebildiği zaman ortaya çıkar. Fakat kırık uçları arasında transvers kemik oluşumu işlemi gerçekleşmez. Bu durumlar altında kırığın bir tarafındaki osteoklastlar rezorbtif bir tünelleme yanıtına giderek kırık hattını geçen *cutting cones*'ları oluşturur. Gelişen bu rezorbtif kavite kapillerin penetrasyonuna izin verir ve sonuç olarak yeni haversiyen sistemleri kurulur. Kan damarları daha sonra endotel hücreleri ve osteoblastlar için osteoprogenitör hücreler ile birlikte kırık hattını geçecek şekilde osteonların oluşumuna neden olurlar (23,25). Normal kontakt iyileşmesinin sonucunda en son olarak normal kemik yapısının rejenerasyonu gelişir. Kemik kırığı tamirinin biyolojisi normal kemik yapısının rejenerasyonuna neden olan çok kompleks bir süreçtir. Normal kırık tamiri, iyileşme boyunca spesifik zamanlarda aktive olan ve kapanan çok farklı genlerin ekspresyonu yoluyla bir orkestra gibidir. Önemli gen ekspresyonları; TGF- β , FGF, PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü), IGF, BMP, osteonektin, osteokalsin (Kemik γ -Carboxyglutamat Protein, Bglab), osteopontin, fibronektin, BMPR (Kemik Morfojenik Protein Reseptörü), Smad'lar (Smad Family Member), IL-1 (İnterlökin), IL-6, GMCSF (Granülosit Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör), MCSF (Monosit Stimüle Edici Faktör) ve çeşitli kollajen izotiplerini içerir. Bu genlerin

ekspresyonunun iyi düzenlenmesi kemik morfolojisi ve fonksiyonundan sorumlu hücrel işlemlerin devam etmesini sağlarlar (25).

Sekonder Kırık İyileşmesi

Sekonder kırık iyileşmesi kırık bölgesinde sıkı tesbit olmadığında spontan kırık iyileşmesiyle karakterizedir ve kemik iyileşmesinin en sık görülen şeklidir. Radyolojik olarak kallus görülür (23). Kırık iyileşmesi, her birinin farklı hücrel özelliklerinin ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin bulunmasıyla karakterize basitçe 3 faza ayrılabilir (32,33). Bu dönemler inflamatuvar dönem, tamir dönemi (intramenbranöz kemikleşme) ve remodelizasyon dönemi (kondrogenез ve encondral kemikleşme) olarak isimlendirilirler (27). Histolojik olarak iyileşme süresindeki evreler birbirinden zaman olarak kesin sınırlarla ayrılamaz. Her evre daima kendinden bir önceki veya bir sonraki evre içinde bulunur. En uzun süren dönem, remodelizasyon dönemidir.

İnflamatuvar (Hematom, Yangı) Dönem

Kemikte kırığa neden olan bir yaralanma sadece hücrelere, damarlara ve kemik matriksine değil aynı zamanda kasları, damarları ve sinirleri içeren çevredeki yumuşak dokuyada zarar verir (34). Tüm doku travmalarında, dolayısıyla kırıklarda, ilk verilen yanıt “inflamasyon” yani “yangı”dır (35). Yaralanma sonrası hemen inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkar ve bu 48 saatte zirveye ulaşır (30). Bu dönem ilk 3–4 günlük süreyi kapsar ve kırıktan 1 hafta sonra hemen hemen tamamen yok olur (32). Kırık kemik uçları arasına ve kırık uçların etrafına kan ve lenf sıvısı toplanır. Bu birikintiyeye kırık hematomu denir. Yaralanma olan bölgede vasküler endotelial hasar kompleman yolağının aktivasyonuna, trombosit agregasyonuna ve bunların alfa granül içeriklerinin salınmasına neden olur. Bu trombosit degranülasyonu büyüme faktörlerini salıverir ve kemotaktik sinyalleri tetikler. Pıhtılaşma yolağının ileticileri hemostaz ve kemoatretkan büyüme faktörlerinin ayrıntılı mediyatör sinyal görevini üstlenen trombositlerdir. PMNL (Polimorfonükleer Lökosit), lenfositler, kan monositleri ve doku makrofajları yara bölgesine yönelirler ve anjiyogenezi uyarmak

için sitokinlerin salınımı için aktive olurlar (36). Erken dönemde kırık çevresi karakteristik olarak hipoksik ve asidik bir ortamdır, bu PMNL'lerin ve doku makrofajlarının aktivitesi için ideal ortamdır (37). Hematom oluşumu daha fazla kanamayı engellemek için hemostatik bir pıhtı ve aynı zamanda hücrel göç için yolak oluşumuna fibrin bir ağ ortamı sağlarlar (30,34,38). Kırık hematomu sekonder kırık iyileşmesi için çok önemlidir. Açık kırıklarda kırık hematomunun dışarıya boşalması nedeniyle kırık iyileşmesi gecikir veya hiç olmaz. Son çalışmalar hematoma kırık iyileşmesi için temel olaylardaki hücrel yanıtı başlatan sinyal moleküllerinin kaynağı olduğunu bildirir (39). Deneysel olarak hematoma organize olduktan sonra çıkarıldığında osteojenik uyarının büyük bir kısmının yok olduğu öne sürülmüştür (40). Muhtemelen, kırık hematoma onarım hücrelerinin aktivitelerini kolaylaştıracak fibrinden yapılmış bir iskelet rolü oynamaktadır. Ayrıca kırık hematoma ortamında bulunan trombositler ve ortamdaki diğer hücreler büyüme faktörü ile birlikte diğer başka proteinleri [Epidermal büyüme faktörü (EGF), FGF, PDGF, TGF- β , Kemikten türetilmiş büyüme faktörü (BDGF), IL-1] salarlar (32,35). Bu faktör ve proteinler, kırık iyileşmesinde önemli olan hücre göçü, periosteal hücre çoğalması ve onarım dokusu matriksinin sentezi için gereklidirler. Yani kırık hematoma prostaglandinler, büyüme faktörleri (IGF, TGF- β , BMP), sitokinler (IL-1, IL-6), kemik yapım ve yıkımı arasında kenetleyici faktörler bulunmaktadır (32,35).

Kırık oluştuktan hemen sonra vazokonstriksiyon izlenir. Bunu takiben arteriol ve venüllerin vazodilatasyonu görülür (34). Mast hücrelerinin kırık bölgesine histamin salgılaması, bu bölgede vazodilatasyona sebep olur. Ayrıca kılcıl damar permeabilitesi de artar (25,26,28,30). Vazodilatasyon ve beraberinde plazma eksudasyonu nedeniyle, kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur. Bu bölgeye polimorf nüveli lökositler, monosit ve lenfositler başta olmak üzere akut yangı hücreleri göç ederler (25).

Komşu haversiyen sistemler arasında fazla anastomoz bulunmadığı için, kırık uçları arasında iki tarafta da belirli bir mesafeye kadar olan alandaki dolaşım durur. Buradaki osteositler lizise uğrayarak yerlerini boş lakunalar alır. Sonuçta kırık alanında, kemik dokuda daha geniş olmak üzere nekroz bölgesi meydana gelir. Kırık

uçlarda 1–5 mm arasında nekroz gelişir. Kırık uçları ve çevre dokulardan prostoglandinlerin salınımı yanında ortamdaki nekrotik materyalin varlığı akut inflamasyonun başlatılmasında önemli rol almaktadır (32). Kırık bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Fibrinojen eklenen lizin, fenilalanin, gamaglobulin ve albuminle fibrine dönüşür. Polimorf nüveli lökositler ve makrofajların damar dışına göç etmeleri ile fibrin matriksi oluşur. Ayrıca makrofaj, histiosit ve fibroblastların yaptığı kollajen de fibrin matriksi oluşumuna etkilidir. Fibrin ağından da kemik yapımı için gerekli olan hücre çoğalması başlar. Bu dönemde fibrin matriksi içindeki öncü hücreler, lokal biyolojik etkilerle değişik dokuları oluşturmak için farklılaşmaya hazırdır. Kırık bölgesinde ortamın pH'sı asitken, daha sonra yavaş yavaş nötrale döner ve sonra hafif alkali seviyede kalır. Büyük kırıklarda makrofaj monositler, bütün vücudu etkileyen bir sitokin olan IL-1 salgılar. IL-1 yaralanma bölgesinde lenfositlerin göçü ile kemik geri emilimini (rezorbsiyon) sağlar ve orta beyin aracılığıyla ateş meydana getirir. IL-1 ayrıca kaslardan Prostoglandin-E₂ (PG-E₂) oluşumunu artırır (35). Bütün bu süreç reparatif bir granülom yaratır ve eksternal kallusa dönüşür (39).

Onarım (Reperasyon) Dönemi

Onarım evresi kırık iyileşmesinde en önemli kısımdır. Reparatif faz, inflamatuvar faz gerilemeden önce birkaç gün içinde başlar ve birkaç haftada sonlanır. Bu fazın sonucunda reparatif kallus dokusu kırık hattı ve çevresinde oluşacaktır ve bu sonunda kemik doku ile yer değiştirecektir. Kallusun rolü bölgenin lateralden desteklenerek mekanik stabilitesini kuvvetlendirmektir. Kırık uçlarında bulunan osteositlerin beslenmesi bozulur ve ölürlür. Bu durum kırık bölgesinden bir miktar uzağa boş lakünaların uzanmasıyla gözlenir (25). Hasar görmüş periost ile kemik iliği ve diğer çevreleyen yumuşak dokular, kırık bölgesine nekrotik dokunun katılmasına neden olabilirler (30). Bu faz sırasında kallus dokusu; fibröz bağ dokusu, kan damarları, kırıkta, ağsı (woven) kemik ve osteoitten oluşur. Tamir süreci ilerledikçe pH, yavaş yavaş nötral ve daha sonra hafifçe alkali olur. Bu durum alkalik fosfataz aktivitesi için ve bunun kallusun mineralizasyonundaki görevi için optimaldir (34). Erken kemik oluşumunun periostun kanbium tabakasındaki hücrelerden olduğu gösterilmiştir (25). Tamir dokusunun içeriği ve tamir hızı; kırığın

kemiğin neresinde olduğuna, yumuşak doku hasarının genişliğine ve kırık bölgesinin mekanik stabilitesine bağlı olarak değişebilir (34).

İntramembranöz kemikleşme kırığın ilk birkaç gününde başlar. Fakat proliferatif aktiviteler kırıktan sonraki ilk 2 hafta içinde durma eğilimindedir. Histolojik kanıtta ilk olarak, kırık bölgesinden birkaç mm içeride korteks karşısında ağsı kemik içerisinde osteoblastik aktivite gösterir (23). Bu bölgedeki kemik oluşumu ara basamaktaki kırıkta oluşumu olmaksızın osteoblastların öncü hücrelerden direkt olarak değişimi ile ortaya çıkar. Eksternal kallus içerisinde bu şekilde kemik oluşumu ortaya çıkan bölge sıklıkla sert kallus olarak adlandırılır (39).

İntramembranöz kemikleşme devam ederken düşük oksijen basıncının olduğu kallus periferinde kondrogenез meydana gelir (25). Periosttan ve komşu eksternal yumuşak dokulardan mezenkimal veya farklılaşmamış hücrelerde aynı zamanda kırık üzerindeki granülasyon dokusunda görülürler (23). Bu hücreler büyürler ve kırıkta görünümü almaya başlarlar. Büyüme plağının proliferasyon zonunda görülene benzer şekilde avasküler bazofilik bir matriks sentez etmeye başlarlar. Fibröz doku ve yeni kırıktağın bu bölgesi, yumuşak kallus olarak adlandırılır ve kırıktağın bütünüyle fibrotik dokuyla yer değiştirecektir (39).

Kırık iyileşmesinin 2. haftasının ortalarında, kırık bölgesi üzerinde bol miktarda kırıktağın vardır ve endokondral kemikleşme süreci ile kalsifikasyon başlar (23). Bu süreç hemen hemen büyüme plağında gözlenen ile benzerdir. Hipertrofik kondrositler ilk olarak glikozaminoglikanları yıkan nötral proteoglikonazları salgırlar, çünkü yüksek seviyelerdeki glikozaminoglikanların mineralizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (23). Daha sonra bu hücreler ve diğer osteoblastlar kalsiyum fosfat komplekslerini içeren membran kaynaklı vezikülleri matriks içine bırakırlar. Bunlar aynı zamanda nötral proteazları ve proteoglikandan zengin matriksi degrade eden ve kalsiyum ile çökmesi için fosfat iyonlarını sağlayan yüksek enerjili fosfat esterlerini hidrolize eden alkalen fosfataz enzimlerini taşırlar (26). Mineralizasyon süreci devam ederken kallusun kalsifikasyonu daha sert hale gelir ve kırık hattının iç taraftan immobil hale geldiği düşünülür (30). Komşu kemiklerden kapillerler kalsifiye olmuş kırıktağa invaze olarak oksijen basıncını arttırlar. Bu

durum osteoblastların invazyonuyla devam eder ve bu kırıkta ve ağsı kemiğin her ikisinden oluşan primer spongiyoz kemiği oluşturur (39). En sonunda kırık uçlarını birleştiren ağsı kemikten oluşan kallus oluşur ve remodeling fazı başlar.

Kemiğin Yeniden Şekillenme (Remodeling) Dönemi

Remodeling fazı kırık iyileşmesindeki son fazdır. Kemiğin yeniden şekillenmesi en uzun evre olup, aylar yıllar sürebilir. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümü olarak tarif edilebilir (26). Bu evrede kırık çevresindeki fazla kemik dokusu rezorbe olur, medüller kanallar açılır yani normal kemik yapısı kazanılır. Bir taraftan osteoklastik faaliyetle rezorbsiyon, diğer taraftan osteoblastik faaliyetle yeni kemikleşme olur. Onarım evresinin ortasında başlayıp, normalde insanlarda 4–16 hafta kadar sürerken, yıllar boyunca da devam edebilir. Yeniden şekillenme evresinde dört olay gerçekleşir:

a. Kalsifiye kırıkta, osteoid dokuyla değişerek bir çeşit birincil trabeküler doku oluşur.

b. Lameller kemik bu dokunun yerini alır.

c. Kompakt kemik uçlarındaki kallus, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur.

d. İlik kanalı dereceli olarak yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından geri emilir ve boşluklar yeniden düzenlenir.

Remodelizasyon Wolff kanunlarına göre olur. Wolff kanunu, kemiğin remodelizasyon döneminde normal şeklini sağlamasını açıklar. Wolff'a göre kemiğin işlevsel durumundaki değişiklik, dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır (32,41). Bu kanun günümüzde de kemiğin yeniden şekillenmesinde temel bir kural olarak kabul edilmektedir. Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü

pozitif, konkav yüzü ise negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin hâkim olduğu konveks yüzde geri emilim ve osteoblastik aktivitenin hâkim olduğu konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır. Yani, kırığın konkav tarafında kemikleşme, konveks tarafında geri emilim olur (19,32,41). Genel olarak iyi remodele olan bölgeler fizise yakın bölgedeki ve metafizer bölgedeki açılanmalar, eklemin hareket düzlemindeki açılanmalar; humerus proksimali, femur distali ve radius distalindeki açılanmalardır. Remodalizasyon kapasitesi, yani kusurlu kaynamanın zamanla düzelme miktarı, yaş ile ters orantılıdır. Ekleme yakın kırıklarda, eklemin yaptığı major hareketlerin istikametine aykırı kırıklarda düzelme daha zordur. Kemiğin tıraşlanıp yeniden eski haline döndüğü yeniden şekillenme evresi 1–2 yıl sürer. Fakat bu süre 6–9 yıla kadar uzayabilir (25).

KIRIK TAMİRİ SIRASINDA GEN EKSPRESYONU

Kırık oluştuğu anda ortamdaki osteoblast ve osteoklast yoğunluğu iyileşme için yeterli miktarlarda değildir. İyileşme için gerekli olan kırık iyileşmesi öncü ve destek hücreleri, kılcal damar, lenfatik sistem, sinir sistemi ve yerel aracılı mekanizmalarla sağlanır. Kırık sahasında yerel olarak üretilen ya da kan dolaşımıyla gelen, bölgesel seviyelerde kemik dengesini koruyabilen kenetleyici faktörlere ihtiyaç vardır (35,41-43). Kırık iyileşmesi sırasında, çok çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, reseptörler ve ara sinyal molekülleri yoluyla çok farklı hücreler arasında etkileşimler gerçekleşir. Moleküler biyolojide son yıllardaki gelişmeler ile bu etkileşimlerin pek çoğunun tanımlanması ve karakterizasyonu açığa kavuşturulmuştur (25).

Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β)

TGF- β ; kırık hattında trombositler, enflamatuvar hücreler (monositler, makrofajlar), osteoblastlar, osteoklastlar ve kondrositler tarafından üretilir (39). Bu, yaralanmaya erken yanıt (ilk 24 saat) sırasında, hematoma (kırık bölgesi ve periost) içerisinde ekstraselüler olarak bulunur. Enflamatuvar fazda, TGF- β 'nin mRNA'sı (Mesajcı Ribonükleik Asit) çoğalmakta olan mezenkimal ve endotel hücrelerinde zayıf ekspresyon olur. Bu ekspresyon intramembranöz kemikleşme sırasında çoğalan osteoblastlarda ve kondrogenез ve endokondral kemikleşme fazlarında çoğalan

kondrositlerde kuvvetli bir şekilde eksprese olur (44). Bu, ilk olarak inaktif bir peptid öncülüdür. Kallusun asidik ortamları veya proteazlar ile aktive edilerek makrofajlar için en etkili kemoatraktan haline gelir (45-48). TGF- β , kırık tamiri için temel olan anjiogenezi uyarmayı içeren pek çok farklı rollere sahiptir (39); periosteal mezenkimal hücrelerin kontroblast ve osteoblastlara farklılaşmasını indükleyerek kemik formasyonunu stimule eder. Kıkırdak matris kalsifikasyonunu düzenler ve osteoblast aktivitesini ve intraosseöz yara rejenerasyonunu stimule eder (49,50). Hücrenin integrin reseptörlerini uyarmak yoluyla hücre dışı matris bileşenlerinden olan kollajen, fibronektin ve proteoglikanların oluşumunu artırır. Bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılar. Sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna etki eder. Diğer etkileri osteoblast farklılaşmasının ve mineralizasyonun inhibisyonu, (51,52) osteoklast aktivitesinin ve osteoklast oluşumunun inhibisyonu, (53) ve aynı zamanda tip I, II, III, IV, VI, X kollajenler, fibronektin, osteopontin, osteonektin, trombospondin, proteoglikanlar ve alkalın fosfatazlar gibi kemik ve kıkırdak bileşenlerini artırır (50,54,55).

Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)

BMP'ler TGF- β süper familyasının üyesidirler ve osteoindüktif aktivitesi olan nonkollejenaz ve suda eriyebilen maddeler olarak keşfedilmişlerdir (56-58). Son yıllardaki çalışmalar BMP-2, 4 ve 7'nin primitif mezenkimal ve osteoprogenitör hücrelerde fibroblastlarda ve kırık bölgesinde bulunan çoğalmakta olan kondrositlerde artmış olduğunu açığa çıkarmıştır (58-60). Bir rat modelinde kırık gapine göçeden ve çoğalmaya başlayan mezenkimal hücrelerde BMP-2 ve 4'ün artmış yoğunluğu gösterilmiştir (59). Benzer bir rat kırık iyileşme modelinde BMP-2, 4 ve 7'nin yeni oluşan trabeküler kemikte ve multinükleer osteoklast benzeri hücrelerde bulunduğu kanıtlanmıştır (61). Daha spesifik olarak iyileşme fazlarındaki ekspresyondaki bir bozulma olduğu zaman BMP-2, 4 ve 7 enflamatuvar faz sırasındaki farklılaşmamış mezenkimal hücrelerde kuvvetli bir şekilde mevcuttur. İntramembranöz kemikleşme sırasında bu BMP'ler çoğalan osteoblastlarda kuvvetli bir şekilde bulunmaktadır. Kondrogenez ve endokondral kemikleşmede çoğalmakta olan kondrositlerde bulunur. Matür ve hipertrofik kondrositlerde zayıf, endokondral kemikleşme döneminde osteoblastlarda kuvvetli bir şekilde mevcuttur.

İyileşmenin bu ileri evrelerinde BMP-7 çoğalmakta olan kondrositlerde bulunur ve matür kondrositlerde zayıf olarak bulunur (44,61).

BMP'ler, kemik oluşumu üzerinde BMP'lerin etkilerini kolaylaştırmak için fonksiyon gören diğer büyüme faktörlerinin ekspresyonunu da etkilerler (48). BMP-2, rat osteoblastlarında IGF-1 ve 2 ekspresyonunu ve hobit hücrelerindeki TGF- β ve IL-6 ekspresyonunu artırır (62). BMP-4 monositlerdeki TGF- β ekspresyonunu stimüle eder (63). BMP-7 veya osteogenik protein 1 (OP-1), IGF tip 2 reseptör ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (64).

BMP'ler aynı zamanda kırık tamirinde diğer görevlere sahiptirler. BMP-4'ler; tip IV kollajen, Tip I kollajen ve heparine bağlanırlar (65). BMP-4 ile tip IV kolajen ve heparin arasındaki ilişki kırık iyileşmesinde olduğu gibi kemik gelişmesindeki vaskülojen ve anjiogenezin rolünü kısmen açıklayabilir (65,66). BMP-7 aynı zamanda erken osteoblast farklılaşmasıyla birlikte etki eden bir transkripsiyon faktörü olan *Osf2/Cbfa1*'in (Core Binding Factor alpha-1) ekspresyonunu indükleyerek normal insan osteoblast çoğalmasını stimüle eder (67). BMP'ler osteoindüktif aktivitelerinden dolayı tanımlanmış ve isimlendirilmiş olmalarına rağmen embriyonik ve postembriyonik gelişim sırasında çok geniş bir doku çeşitliliğinde sinyal molekülleri olarak pek çok zıt role sahiptirler (68,69). Sonuç olarak çok sayıda bulgu BMP-2, 4 ve 7'nin kırık iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunu uyardığını açıklamıştır (70).

Osteonektin

Kemik tamir ve rejenerasyonunda kullanılan pek çok ekstrasellüler matriks proteinlerinden bir tanesidir. Gerçekte osteonektin kemiğin en çok bulunan nonkollajen organik bir bileşimidir ve kalsiyuma bağlanmak için görev yapar (71). Osteonektin mRNA iyileşme süreci boyunca bulunur (72). Osteonektin ekspresyonu 9. günde yumuşak kallusda pik yapar ve 9-15 günler arasında sert kallusda uzamış bir pik ekspresyonu gözlenir (73). 4 ila 7. günler arasında intramembranöz ossifikasyonun olduğu dönemde osteoblastik hücrelerde osteonektin sinyali en güçlü olarak bulunur (23). 10. günde sinyal azalır ve sadece endokondral kemikleşmede

tespit edilir (23). Hipertrofik kondrositlerde osteonektin tesbit edilmemiştir. Proliferatif kondrositlerde ise zayıf olarak bulunmuştur (23). Tesadüfen tip I ve V kollajen benzer ekspresyon paternleri gösterdi ki bu osteonektinin doku morfogenezini düzenleyebileceğine işaret eder (23).

Osteokalsin

Osteoblast spesifik bir protein olup 3-gama-karboksiglutamik asit kalıntılarını içermekte olup kalsiyum bağlayıcı özelliklerini sağlar. Osteokalsinin, hidroksiapatit kristallerinin büyümesinin düzenlenmesine katıldığı ortaya atılmıştır (50) ve insan fetal dokularında eksprese olması gibi diğer fonksiyonlara sahiptir. Bir çalışmada osteokalsinin yumuşak kallusda tesbit edilmediği fakat sert kallus da tesbit edildiği gösterilmiştir. Osteokalsinin oluşması 9 ila 11. günler arasında başlar ve 15. günde ekspresyonu pik yapar (73). Plazmadaki osteokalsin seviyeleri yeni kemik oluşumuna bağlıdır ve konsantrasyonu osteoblastların bir indikatörü olabilir.

Osteopontin

Hücrelerin yapışmasında önemli olduğu bilinen ekstraselüler bir matriks proteindir. Osteopontin; hyalüronik asit, tip I kollajen ve fibronektine bağlanan bir hücre yüzey glikoproteini olan CD44 ile ilişki içerisindedir (74). İn stu çalışmalar ile bu protein, subperiosteal sert kallusdaki osteositlerde ve osteoprogenitör hücrelerde tespit edilmiştir. Bununla birlikte kırıktan 7 gün sonra kuboid osteoblastlarında daha az görülür. Osteopontin sert ve yumuşak kallus arasındaki bileşkede bulunur (23,75,76). Osteositlerde ve osteoklastlarda CD44 ve osteopontinin birlikte bulunması kemik tamirinde osteopontin/CD44 aracılı hücre-hücre etkileşiminin olduğunu ifade eder (23). Başka bir teori osteopontinin osteoklastların kemiğe vitronektin reseptörleri yoluyla bağlanmasına yardım ettiğini açıklar ve bu şekilde rezorbsiyon işlemine yardım eder (77).

Fibronektin

Adezyon ve hücre migrasyonuna yardım eden bir protein olup bu onu tamir süresince önemli kılar. Kırık kallusunda bu protein; fibroblastlar, osteoblastlar ve kondrositler tarafından üretilir. Kırıktan 3 gün sonra hematoma içerisinde tespit edilebilir ve geçici matriksin fibröz kısımlarında bulunur, kırıkta matriksinde daha az olarak görülür (23). İn situ hibridizasyon kullanılarak periostta, osteoblastlarda ve süngerimsi kemik periostunun osteositlerinde bu proteinin olduğuna dair bir kanıt yoktur. Northern hibridizasyon; sağlam kemikte düşük fibronektin mRNA seviyelerini gösterdi ve kırıktan 3 gün sonra yumuşak kallusta belirgin ekspresyonu mevcuttu, 14. günde pik seviyeye ulaştı. Tamirin erken dönemlerinde fibronektin üretiminin çok fazla olmasından dolayı bunun kırıkta geçici matriks içerisinde geçici liflerin oluşmasında önemli bir görevi olduğu düşünülür (23).

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF'ler kırık kallusundaki trombositler, monositler, aktive doku makrofajları ve endotel hücreleri tarafından üretilirler. Enflamatuvar fazda zayıf bir şekilde eksprese olduktan sonra PDGF'lerin ekspresyonu artar ve tamir boyunca sabit kalır (39). PDGF'ler pek çok göreve sahiptir. Bunlar; tirozin kinaz reseptör aktivitesi, mezenkimal hücre çoğalmasının uyarılması, kırık tamirinin başlatılması, kırıkta ve intramembranöz kemiğin oluşmasına yardım etme ve kallus oluşumunun başlamasıdır (39). PDGF uygulamasıyla kallus yoğunluğu ve hacmi artmıştır. Bunlar trombositlerin alfa granüllerinden salınırlar ve bağ dokusu hücreleri için etkili bir mitojen olurlar. Kemik hücre DNA (Deoksiribonükleik Asit) ve protein sentezini uyarırlar ve prostaglandin sentezi yoluyla rezorpsiyonu artırırlar (78). PDGF aynı zamanda hücrelerin diğer biyolojik mediyatörlere yanıtını sağlayan kompetans faktörü olarak iş görürler; in vitro tip I kolajeni artırır, kan akımını düzenlerler (37,79) ve bu etki kırık iyileşmesini etkiler. PDGF; hücre çoğalmasında, büyümesinde, farklılaşmasının düzenlenmesinde nükleer proteinleri kodlayan c-myc (Selüler Myelositomatosis Onkogen) ve c-fos (FBJ Osteosarkom Onkogen) protoonkogenlerin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (50).

İnterlökinler (IL)

IL-1, makrofajlar tarafından üretilen önemli bir sitokindir ve kırık iyileşmesi boyunca düşük seviyelerde eksprese olur. Fakat erken enflamatuvar fazda yüksek aktivitelere indüklenebilir (80). IL-1; IL-6, GMCSF ve NCSF'nin (Nötrofil Koloni Stimüle Edici Faktör) sekresyonunu indükler. IL-1, tamir ve remodelingi düzenleyen olayların bir yolağını başlatan tetik mekanizmayı çalıştırır (81). IL-1, selektif olarak kallus dokusunu yıkmak için nötral proteazların aktivitesini stimüle edebilir (25,80,82). Kollajen sentezinin artışı, kollajen çapraz bağlanmasının artışı ve anjiogenezin stimülasyonu IL-1 üretimine bağlanabilir (25,81).

IL-6; kırık tamiri sırasında osteoblastlar tarafından üretilen önemli bir sitokindir (83). IL-6, IL-1'in uyarmasına çok hassastır ve erken dönemde iyileşme sürecinde yüksek aktivite gösterir (80). Çeşitli kanıtlar bunun kemik rezorbsiyonun bir stimülatörü olduğunu işaret eder.

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

IGF'ler sıklıkla somatomedinler ya da sülfasyon faktörleri olarak tanımlanırlar. IGF ekspresyonu; gelişmekte olan periost ve büyüme plağı hücrelerinde, iyileşen kırık kallus dokusunda ve DBM (Deminaralize Kemik Matrisi) tarafından indüklenen gelişmekte olan ektopik kemik dokusunda yüksektir (50,55,84,85). Kemik hücreleri tarafından üretilen IGF'ler sadece otokrin ve parakrin düzenleyiciler olarak hareket etmezler, aynı zamanda kemik matriksi içine dahil olur ve daha sonra rezorbsiyon sırasında salınırlar. Bu osteoblast öncü hücre proliferasyonunu artırır (48). IGF'ler aynı zamanda kondrositler tarafından salınabilirler ve kırıkta matriks sentezini uyaran otokrin bir yanıt verebilirler (37). Bununla birlikte, IGF'ler sadece kemik oluşumuna katılmayıp osteoklast fonksiyonunu düzenleyebilirler ve kırık tamiri sırasında kemik remodelingine neden olurlar (44).

IGF-1 mRNA tamirin enflamatuvar fazında eksprese olmaz. Bununla birlikte, mRNA ekspresyonu intramembranöz kemikleşme fazı sırasında osteoblastlarda ve aynı zamanda prehipertrofik kondrositlerde mevcuttur (84). Gerçekten mRNA

seviyesi kırıktan sonra 8. günde pik yapar (86). IGF-1 kırık tamirinin kondrogenез evresindeki benzer şekilde otokrin bir mekanizma yoluyla proliferatif zondaki kondrositlerin klonal genişlemesini stimüle eder (25). IGF-1 aynı zamanda preosteoblastik hücrelerin replikasyonunu stimüle eder ve farklılaşmış osteoblastlar tarafından kollajen üretimini indükler (78). IGF-1'in kallus ekstresinde kırıktan 13 hafta sonra arttığına dikkat edilmelidir (86). Bunun fare osteoklast prekürsörlerinden osteoklast oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir ve bu remodelinge etki eder (87,88). Ek olarak IGF-2; mRNA fetal rat prekıkırdaklarında, perikondriumda ve çoğalan kondrositlerde gözlenir. IGF-2, mRNA kırık iyileşme modelinde aynı zamanda IGF-2'yi eksprese eden osteoblastların komşuluğundaki bazı osteoklastlarda tesbit edilmiştir. Halbuki kemik remodelindeki çoğu diğer osteoblastlarda IGF-2 negetiftir (84). IGF-1 ve IGF-2'nin kollajen sentezini arttırdığı ve kollajen yıkımını azalttığı gözlenmiştir (50).

Kemik Morfojenik Proteini Reseptörleri (BMPR)

BMP'ler için reseptörler, enflamatuvar faz sırasında farklılaşmamış mezenkimal hücrelerde kuvvetli bir şekilde mevcuttur. Daha sonra bunlar intramembranöz kemikleşmenin çoğalan osteoblastlarında yoğun bir şekilde bulunur. BMPR-I/II çoğalmakta olan kondrositlerde bulunur, matür ve hipertrofik kondrositlerde zayıf olarak, kondrogenез ve endokondral kemikleşme sırasında endokondral kemikleşmenin yakınındaki kondroblastlarda kuvvetli şekilde bulunur (89). Mezenkimal hücrelerin kondroblastik ve osteoblastik serilere dönüşümünde bu reseptörlerin birlikteliğine işaret eder (44).

Smad'lar

BMP'ler ile başlayan karmaşık intraselüler sinyal yolağının temel bileşenleridirler (90,91). Enflamatuvar süreç sırasında Smad-2,3,4 için mRNA eksprese olmaz ve Smad-2 proteini mevcut değildir. İntramembranöz kemikleşme fazı sırasında Smad-2 henüz hala mevcut değildir. Kondrogenез ve endokondral kemikleşmede Smad-2,3,4 için mRNA upregüle olur ve Smad-2 proteini kondroblast ve kondrositlerde mevcuttur (44). Smad-2 ve 3 TGF- β 'nın sinyalinin

kolaylaştırılmasına yardım eder (90). Smad-4; diğer pathway sınırlı Smad'lar ile heterodimerik bir kompleks oluşturur ve önemli BMP yanıtı veren genleri ayarlamak için nükleus veya çekirdek içerisine transloke olur (92).

Kollajenler

Kollajenin tipi ve miktarının kallus oluşumunu ve kırık iyileşmesini etkilediği ve bunların ekstraselüler matriks proteinlerinin ekspresyonu etkilediği yayınlanmıştır (93). Kollajenin en az 18 izotipi vardır: Tip I kemik, Tip II kırıkta, Tip III ve V granülasyon dokusu, Tip IV ve VI endotelial matriks ile ve tip X hipertrofik kırıkta ile ilgilidir (25). Mekanik stabil kırıklarda tip II ve V yanında baskın olarak tip I kolajen üretimi vardır. Mekanik olarak unstabil kırıklar başlangıçta tip III ve V kollajen üretimi ile karakterizedir ve tip II ve IX kollajen ile ve çok az miktarda tip I kollajen ile yer değiştirir (93).

Kemikte ana kollajen olarak bulunan tip I kollajen çapraz bağlanmaların gelişmesine yardım eder. Bu zincirler, kollajen lifleri olgunlaştıran kollajen fibrilleri üreterek kırıktan yaklaşık 10 gün sonra hidroksiapatit kristallerinin çökmesi ve büyümesine izin veren bölgeler oluşmasına izin verir (37). Tip II kollajen kırığın ana yapısal proteini. Sıçan ve farelerde kırıktan yaklaşık 9 gün sonra pik ekspresyona ulaşır. Pro-alfa 2 kollajen mRNA'sı çoğalan kondrositlerde gözlenir. Kırıktan 14 gün sonra tip II kollajen için mRNA yok olur. Hemen hemen bütün kondrositler hipertrofiye olur ve tip II prokollajen zincirinin ekspresyonu mevcut değildir. Tip II mRNA, kırık sonrası 5. günde erken dönemde tespit edilebilir (23,73,94). Tip III kollajen mRNA'sı özellikle kemikte kırık iyileşmesinin ilk haftası sırasında hızlı bir şekilde artar ve üretimindeki kesintiler gecikmiş kaynama veya kaynamamaya neden olabilir. Tip I, tip IV ve tip X mezenkimal seri hücrelerini osteoblastlara çevirmede yardımcı olabilir (95). Tip V ve XI yakından ilişkili yapılardır. Tip I ve II kollajenin kırıkta ve kırıkta dışı dokulardaki büyüme ve oryantasyonunu düzenlediği ifade edilir (96). Tip V kollajen; iyileşme süreci boyunca yumuşak ve sert kallusda eksprese olur. Tip V kollajenin en yüksek birikmesi intramembranöz kemikleşmenin gerçekleştiği subperiostal kalusta tespit edilir (75). Tip V kollajen aynı zamanda granülasyon dokusundaki kan damarları ile birlikte. Tip XI kollajen kırıkta

bulunur ve kollajen fibrillerin küçük bir bileşenidir fakat bu kollajen tipinin ekspresyonu kıkırdak ile sınırlı değildir (50). Tip IX kollajenin ekspresyonu ve toplanması tip II'nin ekspresyonu ile aynı zamana uyar. Tip IX kollajen kıkırdakta görülür ve kollajen fibrilleri ile proteoglikanlar arasındaki ilişkilere yardımcı olabilir (50,97). Endokondral kemikleşme sırasında hipertrofik kondrositler için bir markır olan Tip X kollajenin ekspresyonu diğer kıkırdak spesifik genlerden daha sonra ortaya çıkar ve kıkırdağın mineralizasyonunda rol oynayabilirler (50).

KEMİK İYİLEŞMESİNDE KOLLAJEN

1970'den önce araştırmacılar organizmalardaki kollajenlerin aynı olduğuna inanıyorlardı. Genetik olarak 18 farklı kollajen morfolojisi, aminoasit içeriği ve fiziki özelliklerine göre tarif edilmiştir (98-101). Farklı kollajen tipleri bağ dokusunun fizyolojik ve mekanik yüklenmelerine müsaade eden gerekli olan çeşitli yapıları sağlarlar.

Kollajen Süperfamilyası

Kollajen tipleri yapısal özelliklerindeki farklılıklara göre sınıflandırılabilirler (98,100-103). Kollajen tip I-II-III-V ve XI çizgili fibril oluşturan kollajenlerdir. Tip I-II-III konnektif doku matriksinde bulunan ana kollajenlerdir. Tip I kollajen tendonlarda, ligamanlarda, kemikte, organ kapsüllerinde, deride, fibröz kıkırdakta ve fasyada bulunabilir. Tip II, çoğunlukla hiyalin ve elastik kıkırdakta mevcuttur ve kondrositler için marker olarak kullanılır. Tip III arterleri, karaciğer, dalak ve granülasyon dokusunu içeren pek çok dokuda bulunur. İyileşme işleminde tip III kollajen en erken ortaya çıkan kollajendir (98).

Kollajen tip IV, VI-X ve XII-XIX nonfibriler kollajenlerdir. Tip IX,XII,XIV,XVI ve XIX kendi üzerlerinde supramoleküler yapılar oluşturmazlar fakat sıklıkla diğer sınıflardaki kollajenler ile fibriller içerisine integre olarak bulunurlar (98,100,103-105). Diğer kollajen tipleri yapraklar (tip IV, VIII ve X), mikrofıamanlar (tip VI) ve bağlayıcı fibriller gibi bazal membrana (tip VII) tutunmasını sağlayan nonfibril birlikler oluştururlar (98,101,106-109). Tip XV ve

XVIII; normal kollajen triple heliks dizisinde geniş kesilmeler ile karakterizedir (98,103,110-112). Tip XIII ve XVII tek zincirden oluşurlar (98,113).

Normal Kemikte Kollajen

Kollajen insan vücudunda en çok bulunan protein olup bütün proteinin yaklaşık %30' unu içerir (98,114). Tip I kollajen kemiğin mekanik gücünün büyük kısmını sağlar. Sekonder osteonlardaki kollajenin organizasyonu, ağırlıklı olarak osteon ve kemik uzun aksına paralel olarak tarif edilmiştir (98). Ascenzi ve Bonucci çoğunluk olarak longitudinal kollajen lifleri içeren osteonların en yüksek tensil kuvvette sahip oldukları sonucuna varmışlardır. Bu bulgular Martin ve İshida (98) tarafından genişletilmiştir. Sığır kortikal kemiğindeki longitudinal olarak düzenlenmiş kollajen miktarının, kemik tensil kuvvetinin tek ve en iyi göstergesi olduğunu bulmuşlardır. Kemiğin kollajen lifleri aynı zamanda mineralizasyon için bir ortam sağlar ve kemiğe karakteristik fiziksel özelliklerini verirler.

Kemik İyileşmesinde Kollajen

Lane ve arkadaşları, rat tibia kırığı tamiri sırasında üretilen kollajenin doku tamirinin ihtiyaçlarını nasıl değiştirdiğini göstermiştir (98). Temel kollajen tipleri, immünflorasan monospesifik poliklonal antikor kullanılan çalışmalarda, tip I kollajen matür kemikte ve tip II ve III kırık kallusunda ki spesifik bölgelerde mevcuttu. Enflamatuvar fazda, primitif mezenkimal elemanlar kollajen tip II ve III üretirler. Reparatif faz sırasında, periosteal yüzey boyunca osteoprogenitör hücrelerin migrasyonu ve kapiller invazyonu için tip III kollajen liflerine substrat olarak görev yapan bir matriks proteini salgılanır (98,115). Bu aynı zamanda daha ileride fibroblastların yönelebileceği genişleyebilen bir ağ olarak hizmet görür (98). Sonra, fibröz doku içerisinde kemiğin trabekülü geliştikçe tip I kollajen salgılanır. Son olarak tip II kollajen endokondral kemikleşme boyunca, tamir devam ettikçe üretilir (98,115). Lane ve arkadaşları (98); aynı zamanda tip I kollajenin erken kollajen matriksinde süperimpoze olduğunu ve tip II ile III'ün immatür ağı kemik olarak ayrıldığını ve tamirin diğer aşamalarında lameller kemiğe remodele olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sandberg ve arkadaşları; rat kırık kalluslarında tip I ve II kollajen üretimini lokalize etmek için in situ hibridizasyon kullandılar (98). Sandberg ve arkadaşları tip II prokollajen mRNA'sının 5. gün kadar erken bir zamanda kortikal kemiğe komşu hücrelerde tespit edildiğini gösterdiler (98). Bu kondrositler aynı zamanda farklılaşma yoluyla kalsiyum tabakasının periosteal hücrelerinden orjin aldığını işaret eden tip I prokollajen mRNA içermektedir. Yazarlar; kırıkta ekspansiyonunun genellikle kondrosit çoğalmasından ziyade mezenkimal hücrelerin farklılaşmasından kaynak aldığını iddia ettiler. Çünkü eksternal kallusun total miktarı 7. günden 15. güne kadar değişmedi. Kırıkta matriksinin çökmesinden sonra tip II prokollajen mRNA seviyeleri aşamalı olarak düştü. Kırık kallusunun birimi başına düşen en yüksek tip I prokollajen mRNA'sı, 15. ve 28. günler arasında tespit edildi. Bu kırıkta ağsı kemiğe osteoblastlar tarafından transformasyonu ile uyumludur. Diğer araştırmacılar rat kırık kallusunda benzer sonuçlar buldular (73, 98).

Hiltunen ve arkadaşları; farelerde kırık iyileşmesi sırasında tip I, II, III, IX, X kollajen tiplerinin düzenlenmesini değerlendirmek için Northern analizini kullandılar (94,98). Bunlar Lane ve arkadaşlarınıninkine benzer sonuçlar gözlemlediler. Kırıktan 5 gün sonra enflamatuvar faz sırasında tip III kollajen sentezinin pik yaptığını ve daha sonra azaldığını gözlemlediler. Tip II kollajen üretimi kırıkta repartatif fazı sırasında kırıktan 7 gün sonra pik yaptı ve 14. günde minimal olarak mevcuttu. Tip I kollajen yaralanmadan sonra ki ilk 2 haftada düşük seviyelerde mevcuttu. Fakat aşamalı olarak kırık tamirinin remodeling ve kemikleşmesine karşılık gelen 14. günde artarak pik yaptı. Yazarlar tip IX kollajenin, tip II kollajen ile birlikte eksprese olmasına şaşırmadılar çünkü tip IX kollajen çoğunlukla tip II kollajenden oluşan, kollajen fibrillerinin yüzeyinde yerleşmekteydi. Sonuç olarak endokondral kemikleşme sırasında, hipertrofik kondrositlerle sınırlı olan tip X kollajen ekspresyonu kırıktan 9 gün sonra pik yapar (98).

Distraksiyon osteogenezi sırasında iyileşme sürecinin ilginç bir özelliği, kollajen paketlerinin lineer bir şekilde organize olarak erken dönemde oluşmasıdır. Vauhkonen ve arkadaşları; (98,116) kemik distraksiyonun ilk 4 haftası sırasında kollajenin total proteine oranının %53'den %88'e arttığını ve bu değer normal

kemik ile karşılaştırılabilir bir değer olduğunu bildirdiler. Tip I kollajen; sentezlenen bütün kollajenin hemen hemen tamamını yansıtır. Tip II saptanamadı ve tip III kollajenin farklı bir fazı görülmedi. Bu sonuçlar şunu gösteriyor ki; kallus tip kemik iyileşmesi veya endokondral kemikleşmeden farklı olarak distraksiyon osteogenezi tip II kollajen üretimi fazında veya tip III sentezinin farklı bir fazında devam etmez. Oysa tip I kollajenden oluşan matür fibröz organik matriksin direk sentezi mevcuttur.

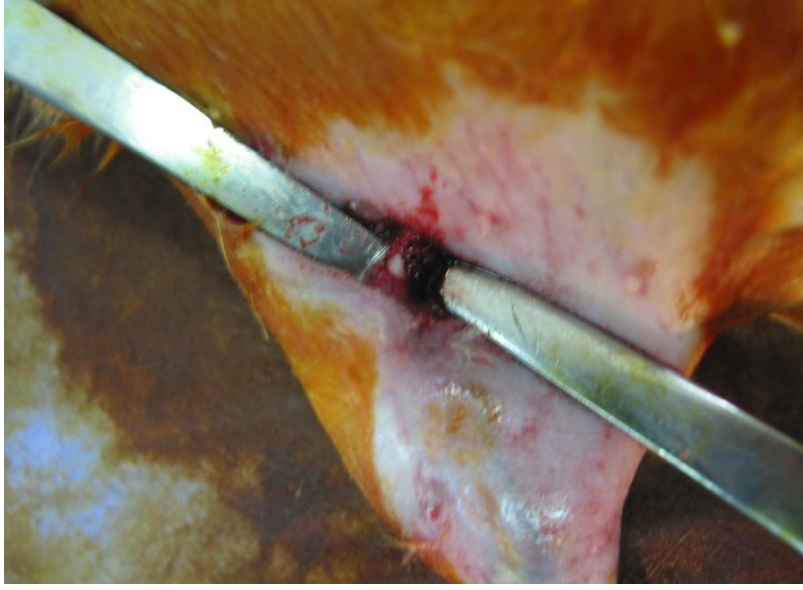
GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Planı

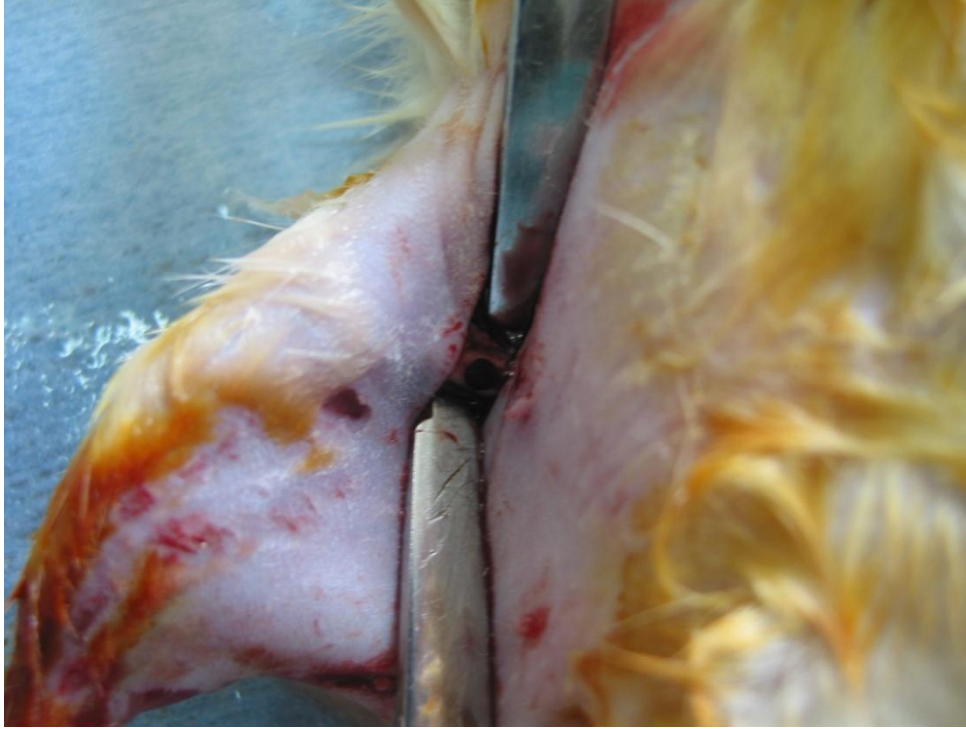
Bu çalışmada 56 adet Spraque dawley tipi dişi rat (Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı, Denizli) kullanıldı. Çalışma öncesi Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik kurulundan 09/01/2009 tarih ve B.30.2.PAÜ.0.01.00.00.400-1/04 sayılı çalışma için gerekli izin alındı. Çalışma; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında yapıldı.

Çalışmaya dahil edilen ratların ortalama yaşı 2,9 ay (2,5–3,2 ay) ve ağırlıkları 250 gram (213-276 gram). Her grup 28 adet rattan oluşacak şekilde ratlar rastgele olarak iki gruba ayrıldı.

Birinci grubun (deney grubu) sağ femur shaftında oluşturulan defekte rat kuyruğundan elde edilen tip I kollajen (Sigma Aldrich™, United Kingdom) (4 mg) uygulandı (**Resim-1**). İkinci grubun (kontrol grubu) sağ femur shaft bölgesinde oluşturulan defekt boş bırakıldı (**Resim-2**). Ratlar her kafeste 4 rat olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Çalışma süresince ratlara limitsiz olacak şekilde musluk suyu (ad libitum) ve standart kemirgen yemi verildi. Hayvanlar 22 santigrad derece (°C) sıcaklıkta, 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta kalacak şekilde takip edildiler.



Resim-1: Tip I kollajen uygulanmış defekt



Resim-2: Boş bırakılan defekt

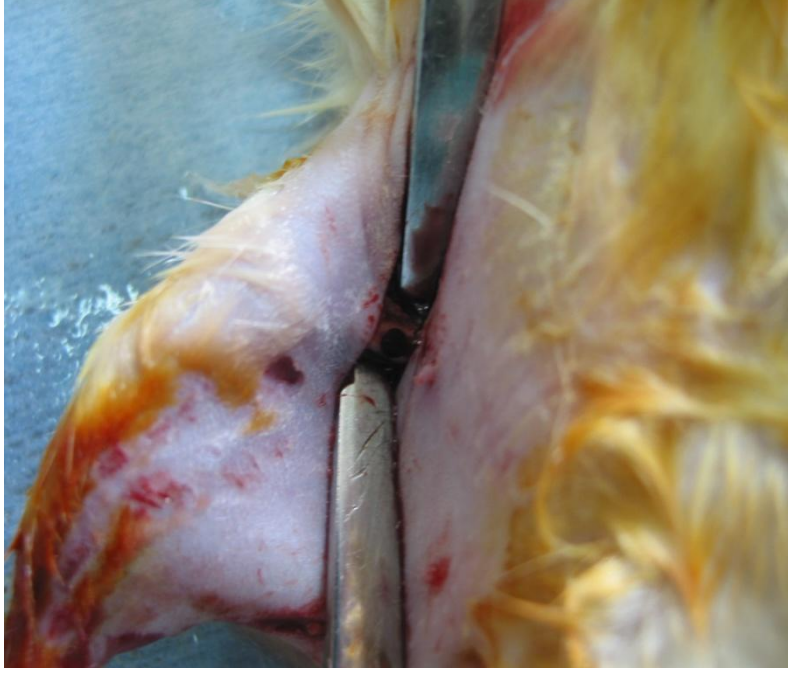
Deney grubundaki tüm hayvanlar aynı gün aynı cerrah tarafından ameliyat edildiler. Kontrol grubundaki tüm hayvanlar deney grubundan bir gün sonra olmak üzere aynı cerrah tarafından opere edildiler. Operasyon esnasında veya sonrasında antibiyotik profilaksisi yapılmadı. Takiplerde hiçbir sıçanda yara yeri enfeksiyonu izlenmedi. Operasyon sırasında tam kırık oluşan iki adet rat itlaf edildi.

Bunların yerine yeni ratlar alındı. Ötenazi yöntemi olarak servikal dislokasyon kullanıldı. Birinci ve ikinci gruptan yedişer adet rattan birinci saat, yedişer adet rattan birinci hafta, yedişer adet rattan üçüncü hafta, yedişer adet rattan altıncı hafta intrakardiyak olarak bir ml kan alındı. Daha sonra ratlar öldürüldükten sonra sağ femurları kalça ve diz ekleminden dezartiküle edildi. Femur üzerindeki yumuşak dokular kallus dokusuna zarar verilmeden nazikçe kemikten sıyrıldı. Tüm sağ femurlar histolojik olarak incelendiler. Alınan kanlar soğuk zincir ile Pamukkale Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı. Aynı gün içinde kanlardan cDNA (Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit) izolasyonu yapıldı.

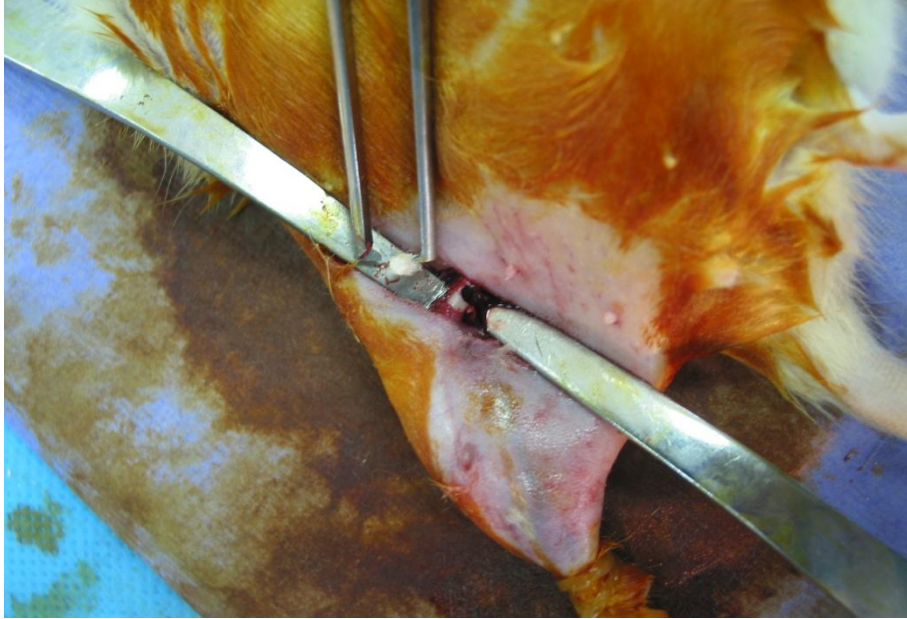
Cerrahi Teknik

Gerekli takip ve hazırlıkları yapılan hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında ameliyata alındı. Her bir sıçanın ağırlığı elektronik tartı ile tartılarak anestezi ilaç dozu hesaplandı. Anestezi olarak Ketamin (Ketalar®, Pfizer, Türkiye) 50 mg/kg ve Xylazine (Rompun®, Bayer, Türkiye) 10 mg/kg kombinasyonu kullanıldı. Anestezi kombinasyonu intraperitoneal olarak sol kasık bölgesinden uygulandı.

Sıçanların sağ femur medial bölümü traş edildikten sonra povidon iyodür (Batticon®, ADEKA, Türkiye) ile boyandı. Daha sonra ratların ayakları sabitlendikten sonra sağ femur medial yüzü orta kısmında yaklaşık 2 cm.'lik insizyon uygulandı. Kaslar künt diseksiyonla geçilerek kemiğe ulaşıldı. Kemiğin medial yüzünde şaft ortasında elektrikli matkap kullanılarak 2 mm'lik Kirschner teli (Ortopro AŞ. İzmir/Türkiye) ile tek korteks olacak şekilde defekt oluşturuldu (**Resim-3**). Defektler yaklaşık 20 cc izotonik sodyum klorür solüsyonu ile yıkandı. Birinci gruptaki ratlarda oluşturulan defekte rat kuyruğundan elde edilen tip I kollajen 4 mg olacak şekilde uygulanarak defekt dolduruldu (**Resim-4, Resim-5**). İkinci grupta oluşturulan defekt 20 cc izotonik sodyum klorür solüsyonu ile yıkandı. Cilt 2/0 ipek (Sterisilk®, Türkiye) ile kapatıldı. Yara yeri povidon iyodür ile silinerek sıçan ameliyat masasından alındı.



Resim-3: Defekt oluşturulması



Resim-4: Oluşturulan defekt ve uygulanacak tip I kollajen



Resim-5: Tip I kollajen ile doldurulmuş defekt

RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu; izolasyon materyaline uygun bir RNA izolasyon kiti ile yapılabilir. Bizim çalışmamızda RNA izolasyonu için 11828665001 katalog numaralı High Pure RNA Isolation (Roch Mannheim, Almanya) kiti kullanıldı. İzolasyon üretici firma tarafından önerilen manüel izolasyon önerilerine uyularak yapıldı. RNA izolasyonu sonrası aynı gün cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA Sentezi

cDNA sentezi için RT2 First Strand Kit (SABioscience, USA) kullanıldı. 25 ng ile 5 µg arasındaki RNA başlangıç için kullanıldı.

Sentez iki aşamada yapıldı;

Birinci aşamada aşağıdaki protokole göre miks hazırlandı;

RNA	2-8 µl
GE	2 µl
H ₂ O	6-0 µl

Hazırlanan mikse Thermal Cycler’da aşağıdaki protokol uygulandı;

42°C de 5 dakika

Ardından hemen buza alındı ve buzda 1 dakika bekletildi.

İkinci aşamada aşağıdaki protokole göre miks hazırlandı;

BC3	4 µl
P2	1 µl
RE3	2 µl
H ₂ O	3 µl

Hazırlanan mikse buzda bekleyen ilk miksin içine eklendi.

Thermal Cycler’da aşağıdaki protokol uygulandı;

42 °C de 15 dakika

95 °C de 5 dakika tutuldu.

Real-time PCR

Elde edilen cDNA (20 µl) üzerine 91 µl ddH₂O (İki Kez Distile Su) eklenerek dilue edilip aşağıdaki protokole göre mix hazırlandı;

2X SuperArray PCR Master Mix	1275 µl
Diluted cDNA	102 µl
ddH ₂ O	1173 µl
Total Volume	2550 µl

Master Mix plate’in kuyucuklarında 25 µl olacak şekilde dağıtıldı. Pipetleme yaparken kabarcık oluşmamasına dikkat edildi.

CAPH-09409 protokol numaralı Custom Arrayler ise 2 örnek için 48'er bölüme ayrılmış olarak hazırlandı. Master mix oranları da 2'ye bölünerek hazırlandı.

Biz Master mix oranlarını aşağıdaki protokole göre hazırladık:

2X SuperArray PCR Master Mix	637,5 µl
Diluted cDNA	51 µl
ddH ₂ O	586,5 µl
Total Volume	1275 µl

Kuyucuklara yüklenecek miktarda bir değişiklik olmayacaktır. Yine 25 µl karışımdan kuyucuklara eklenecektir. Buradaki hacimsel azalmanın nedeni toplamda kullanılacak kuyucuk sayısının örnek başına yarıya düşmesinden kaynaklanmaktadır.

Real-Time PCR'da aşağıdaki protokol uygulandı;

Dönem	Süre	Isı
Denatürasyon	10 dakika	95 °C
Amplifikasyon	15 saniye	95 °C
	1 dakika	60 °C
Melting Curves	1 dakika	95 °C
	2 dakika	65 °C
	0 dakika	65 °C

Data Analizi $\Delta\Delta CT$ metoduyla yapıldı. Metod iki ekspresyon sonucunun karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bu ekspresyonlardan biri kontrol grubu diğeri de deney grubudur. Böylelikle gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda arttığını mı, azaldığını mı yoksa aynı mı kaldığını relatif olarak belirleyebiliriz.

Histopatolojik Değerlendirme

Histolojik değerlendirme Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Manuel muayeneyi takiben total ampute edilen femurlar % 10'luk formaldehit solüsyonunda bir gece tespit edildi. Daha sonra 2 gün süre ile dekalsifiye (DECAL : ½ %10 formik asit, ½ %8 HCL) edildi. Ankalsifiye örnekler kırık hattına uyan alandan ve etrafından 3 mm aralıklarla 3 parça halinde transvers olarak kesilerek örneklendi. Bu üç parça doku örneği, doku takip işlemi sonrası parafine gömüldü. Mikrotomla 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eosin (H-E) ve Masson Trikrom ile boyandı.

H-E ve Masson Trikrom ile boyalı kesitlerin histopatolojik değerlendirilmesinde şu kriterler göz önünde bulundurulmuştur:

1. İnflamasyon
 - Hücre tipi ve yoğunluğu
 - Granülasyon gelişimi
 - Vaskülarite
2. Konnektif doku gelişimi
 - Fibroblast proliferasyonu
3. Osteogenezis
 - Kıkırdak gelişimi
 - Osteoblastik aktivite
 - Yeni kemik oluşumu
4. Yabancı cisim reaksiyonu

İnflamasyon, konnektif doku gelişimi, osteogenezis ve yabancı cisim reaksiyonu başlıkları altında incelenen parametrelerde; yok, hafif, orta, şiddetli; sırasıyla -, +, ++, +++ olarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca, iyileşmenin histolojik olarak sınıflaması, Huo ve ark.'larının yayınladığı (117-119) histolojik iyileşme skalasına göre yapılmıştır (Tablo-1).

Tablo-1: Kırık iyileşmesinin histolojik değerlendirilmesinde kullanılan Huo skorum sistemi

Skor	Kırık bölgesi histolojik bulguları
1	Fibröz doku
2	Ağırlıklı fibröz doku ve az oranda kıkırdak doku
3	Eşit miktarda fibröz doku ve kıkırdak doku
4	Kıkırdak doku
5	Ağırlıklı olarak kıkırdak ve az miktarda immatür (woven) kemik
6	Eşit oranda kıkırdak ve immatür kemik
7	Ağırlıklı olarak immatür (woven) kemik ve az oranda kıkırdak
8	Tamamen immatür (woven) kemik
9	İmmatür (woven) kemik ve az miktarda matür kemik
10	Matür (lameller) kemik

İstatistiksel Analiz

Histopatolojik incelemede kullanılan inflamasyon, konnektif doku gelişimi, osteogenezis ve yabancı cisim reaksiyonun karşılaştırılmasında ki-kare analizi kullanıldı. Ki-kare testi SPSS 10.0 programı ile yapıldı.

İyileşmenin histolojik olarak sınıflaması Huo ve arkadaşlarının yayınladığı histolojik iyileşme skalası, karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. Mann Whitney U testi SPSS 10.0 programı ile yapıldı.

Microarray yöntemi ile izole edilen genlerin data analizi $\Delta\Delta CT$ methoduyla yapıldı.

BULGULAR

Histopatolojik Bulgular

Birinci Hafta

Kontrol grubunda oluşturulan kaviteilerin 1. hafta histopatolojik incelemesinde kavite içerisinde 2 ratta (%28,6) herhangi bir enflamatuvar hücreye ratlanmazken 5 ratta (%71,4) monositik hücre infiltrasyonu mevcuttu. Kollajen uygulanan defektlerde 2 ratta (%28,6) enflamatuvar hücre tespit edilmezken 5 ratta (%71,4) mononükleer hücreler tespit edildi (Tablo-2). Kontrol grubu ve deney grubu enflamatuvar hücre tipi bakımından birbirine benzerdi (**Grafik-4**).

Tablo-2: 1. hafta hücre tipinin ratlardaki dağılımı

		HÜCRE TİPİ		TOPLAM
		yok	var	
DENEY	Rat Sayısı	2	5	7
	Grup içi %	%28,6	%71,4	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	2	5	7
	Grup içi %	%28,6	%71,4	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	4	10	14
	Grup içi %	%28,6	%71,4	%100,0

Granülasyon dokusu kontrol grubunda 2 ratta (%28,6) hafif şiddette, 3 ratta (%42,9) orta şiddette ve 2 ratta (%28,6) şiddetli olarak değerlendirildi. Deney grubunda ise 1 ratta (%14,3) hafif şiddette, 2 ratta (%28,6) orta şiddette ve 4 ratta (%57,1) şiddetli idi (Tablo-3). Deney grubunda granülasyon varlığının şiddetli olması kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat kadar fazlaydı. Aynı şekilde hafif şekilde granülasyon varlığı kontrol grubunda deney grubuna göre 2 kat fazlaydı. Kontrol grubundaki ratların büyük çoğunluğunda (3 rat %42,9) orta şiddette granülasyon dokusu gelişirken deney grubunun büyük çoğunluğunda (4 rat %57,1) şiddetli granülasyon dokusu gelişimi izlendi (**Grafik-5**).

Tablo-3: 1. hafta granülasyon dokusunun ratlardaki dağılımı

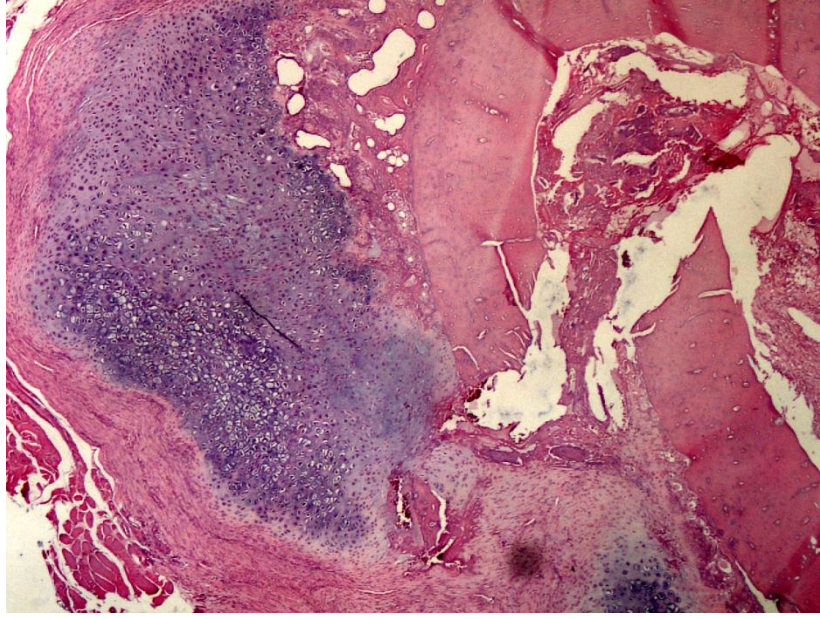
		GRANÜLASYON			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	1	2	4	7
	Grup içi %	% 14,3	%28,6	%57,1	% 100,0
KONTROL	Rat Sayısı	2	3	2	7
	Grup içi %	%28,6	%42,9	%28,6	% 100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	3	5	6	14
	Grup içi %	%21,4	%35,7	%42,9	% 100,0

Vasküler invazyon kontrol grubunda 4 ratta (%57,1) hafif şiddette, 2 ratta (%28,6) orta şiddette, 1 ratta (%14,3) şiddetli olarak değerlendirildi. Deney grubunda 1 ratta (%14,3) hafif, 6 ratta ise orta şiddeteydi (Tablo-4). Deney grubunda orta şiddette vasküler invazyon kontrol grubunun yaklaşık 3 katı kadar fazlaydı. Buna karşılık kontrol grubunda 1 ratta şiddetli vasküler invazyon mevcutken deney grubunda herhangi bir ratta şiddetli vasküler invazyona ratlanmadı. Kontrol grubunda ki ratlarda vasküler invazyon yüksek oranda (%57,1) hafif şiddette iken deney grubu orta şiddette vasküler invazyon gelişti (%85,7) (**Resim-6, Grafik-6**).

Tablo-4: 1. hafta vasküler invazyonunun ratlardaki dağılımı

		VASKÜLER			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	1	6		7
	Grup içi %	% 14,3	% 85,7		% 100,0
KONTROL	Rat Sayısı	4	2	1	7
	Grup içi %	%57,1	%28,6	% 14,3	% 100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	5	8	1	14
	Grup içi %	%35,7	%57,1	%7,1	% 100,0

Kıkırdak gelişimi kontrol grubunda 1 ratta (%14,3) yok, 3 ratta (%42,9) hafif şiddette, 1 ratta (%14,3) orta şiddette, 2 ratta (%28,6) şiddetli olarak değerlendirildi. Deney grubunda 3 ratta (%42,9) hafif şiddette, 4 ratta (%57,1) şiddetliydi (Tablo-5). Kontrol grubunda kıkırdak gelişimi açısından çoğunluk (3 rat %42,9) hafif şiddetteyken deney grubunda çoğunluk (4 rat %57,1) şiddetli kıkırdak gelişimi gösterdi (**Grafik-7**). Şiddetli kıkırdak oluşumu deney grubunda kontrol grubuna göre 2 kat daha fazlaydı (**Resim-6**).

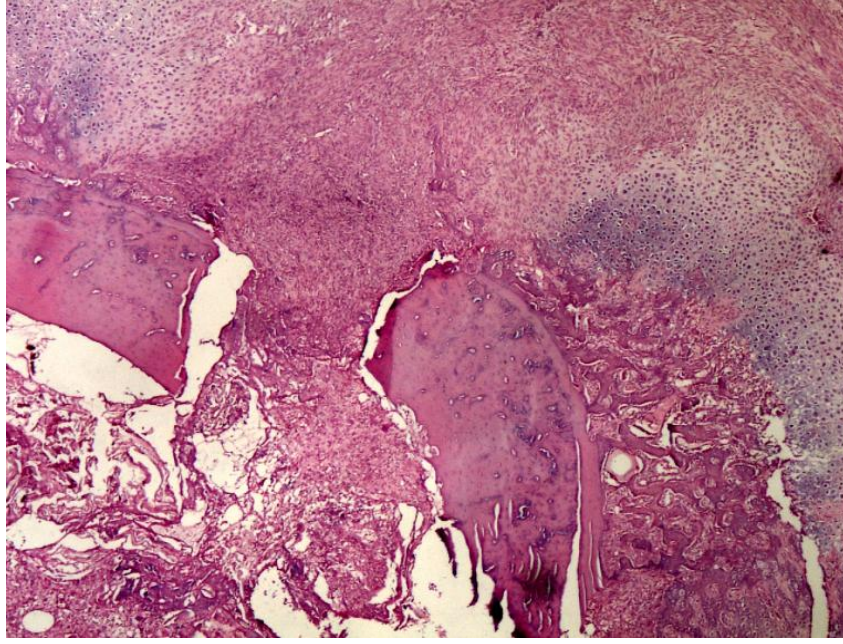


Resim-6: 1. hafta kontrol grubu histopatolojik görünüm (HE×4)

Tablo-5: 1. hafta kıkırdak oluşumunun ratlardaki dağılımı

		KIKIRDAK				TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı		3		4	7
	Grup içi %		%42,9		%57,1	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	1	3	1	2	7
	Grup içi %	%14,3	%42,9	%14,3	%28,6	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	1	6	1	6	14
	Grup içi %	%7,1	%42,9	%7,1	%42,9	%100,0

Osteoblastik aktivite kontrol grubunda 1 ratta (%14,3) hafif şiddette, 5 ratta (%71,4) orta şiddette, 1 ratta (%14,3) şiddetli olarak değerlendirildi. Deney grubunda ise 1 ratta (%14,3) hafif şiddette, 4 ratta (%57,1) orta şiddette, 2 ratta (%28,6) şiddetli olarak değerlendirildi (Tablo-6). Kontrol grubundaki ratların büyük çoğunluğu (5 rat %71,4) orta şiddetli osteoblastik aktivite gösterdi (**Grafik-8**). Deney grubundaki ratların büyük kısmı (4 rat %57,1) orta şiddetli osteoblastik aktivite gösterdi (**Resim-7**).



Resim-7: Deneş grubunun 1. hafta histopatolojik görünüm (HE×4)

Tablo-6: 1. hafta osteoblastik aktivitenin ratlardaki dağılımı

		OSTEOBLAST			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	1	4	2	7
	Grup içi %	% 14,3	%57,1	%28,6	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	1	5	1	7
	Grup içi %	% 14,3	%71,4	%14,3	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	2	9	3	14
	Grup içi %	% 14,3	%64,3	%21,4	%100,0

Yeni kemik oluşumu kontrol grubunda 2 ratta (%28,6) hafif şiddette, 5 ratta (%71,4) orta şiddette olarak değerlendirildi. Deneş grubunda 2 ratta (%28,6) hafif şiddetli, 3 ratta (%42,9) orta şiddetli, 2 ratta (%28,6) şiddetli osteoblastik aktivite mevcuttu (Tablo-7). Kontrol grubundaki ratların çoğunluğu 5 rat (%71,4) orta şiddetli osteoblastik aktivite göstermesine rağmen deneş grubunda ratların çoğunluğu 3 rat (%42,9) orta şiddetli osteoblastik aktivite gösterdi (**Grafik-9**). Fakat deneş grubunda 2 rat (%28,6) şiddetli osteoblastik aktivite gösterirken kontrol grubunda hiçbir ratta şiddetli osteoblastik aktiviteye rastlanmadı.

Tablo-7: 1. hafta yeni kemik oluşumunun ratlardaki dağılımı

		YENİ KEMİK			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	2	3	2	7
	Grup içi %	%28,6	%42,9	%28,6	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	2	5		7
	Grup içi %	%28,6	%71,4		%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	4	8	2	14
	Grup içi %	%28,6	%57,1	%14,3	%100,0

Fibröz doku oluşumu kontrol grubunda 2 ratta (%28,6) hafif şiddete, 3 ratta (%42,9) orta şiddette, 2 ratta (%28,6) şiddetli olarak değerlendirildi. Deney grubunda 3 ratta (%42,9) orta şiddetli, 4 ratta (%57,1) şiddetli fibröz doku oluşumu gözlemlendi (Tablo-8). Kontrol grubunda dağılım birbirine çok yakın olmakla birlikte orta şiddetli fibröz doku oluşumunda dağılım bir miktar fazlaydı. Deney grubunda ise belirgin olarak ratların büyük bölümü şiddetli fibröz doku gelişimi gösterdi (**Grafik-10**). Özellikle şiddetli fibröz doku gelişimi açısından deney grubu kontrol grubuna göre 2 kat daha fazlaydı.

Tablo-8: 1. hafta fibröz doku varlığının ratlardaki dağılımı

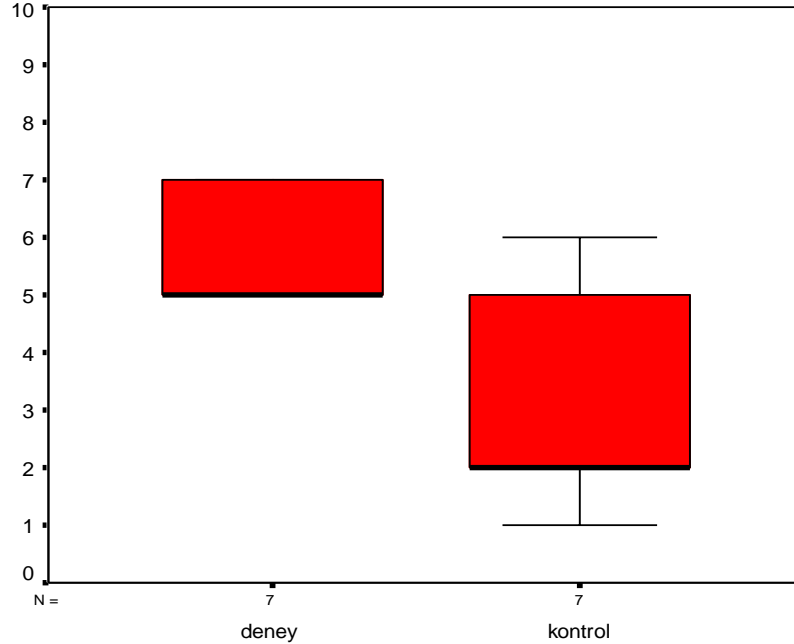
		FİBRÖZ DOKU VARLIĞI			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı		3	4	7
	Grup içi %		%42,9	%57,1	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	2	3	2	7
	Grup içi %	%28,6	%42,9	%28,6	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	2	6	6	14
	Grup içi %	%14,3	%42,9	%42,9	%100,0

Yabancı cisim reaksiyonu kontrol grubunda 5 ratta (%71,4) yokken, 2 ratta (%28,6) hafif şiddette mevcuttu. Deney grubunda 3 ratta (%42,9) yabancı cisim reaksiyonu yokken, 2 ratta (%28,6) hafif şiddetli, birer rattada (%14,3) orta şiddetli ve şiddetli yabancı cisim reaksiyonu gözlemlendi (Tablo-9). Kontrol grubunun büyük çoğunluğunda (5 rat %71,4) yabancı cisim reaksiyonu yoktu fakat deney grubunun %57,1'inde yabancı cisim reaksiyonuna rastlandı (**Grafik-11**).

Tablo-9: 1. hafta yabancı cisim reaksiyonunun ratlardaki dağılımı

		YABANCI CİSİM REAKSİYONU				TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	3	2	1	1	7
	Grup içi %	%42,9	%28,6	%14,3	%14,3	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	5	2			7
	Grup içi %	%71,4	%28,6			%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	8	4	1	1	14
	Grup içi %	%57,1	%28,6	%7,1	%7,1	%100,0

Huo ve arkadaşları tarafından yapılan histopatolojik evrelemeye göre kontrol grubunda 1 rat (%14,3) evre 1, 3 rat (%42,9) evre 2, 2 rat (%28,6) evre 5 ve 1 rat (%14,3) evre 6 olarak sınıflandırıldı. Deney grubunda ise 4 rat (%57,1) evre 5 ve 3 rat (%42,9) evre 7 olarak değerlendirildi. Kontrol grubunda median değer 2 iken deney grubunda median değer 5 olarak saptandı. Deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı ($p=0,027$) farklılık saptandı (**Grafik-1**).



Grafik-1: 1. haftada Huo evrelemesine göre ratların dağılımı

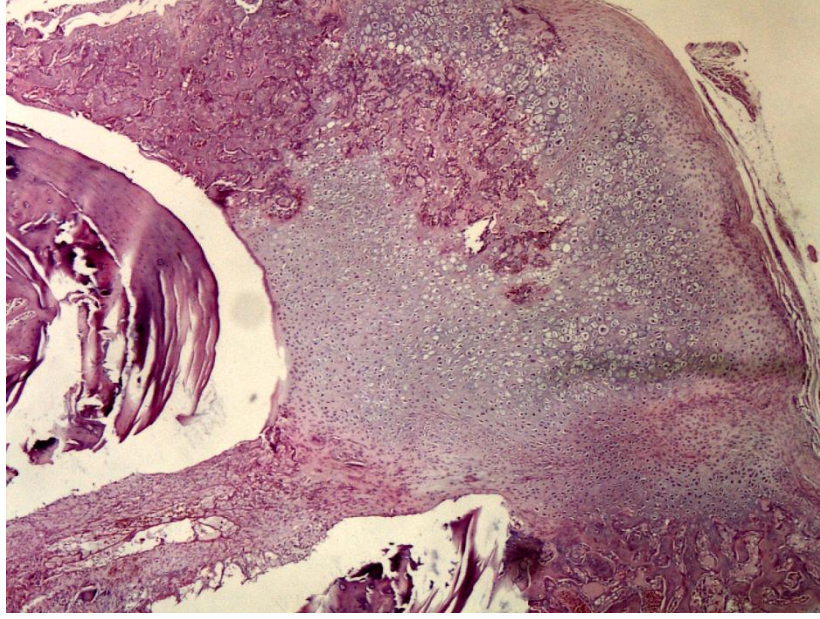
Üçüncü Hafta

Kontrol grubunda 6 ratta (%85,7) enflamatuvar hücelere rastlanmazken 1 ratta (%14,3) mononükleer hücreler saptandı. Deney grubunda da kontrol grubuna benzer değerler mevcuttu (**Grafik-4**). Deney grubunda 5 ratta (%71,4) enflamatuvar hücre yokken 2 ratta (%28,6) mononükleer hücre infiltrasyonu mevcuttu (Tablo-10).

Tablo-10: 3. hafta hücre tipinin ratlardaki dağılımı

		HÜCRE TİPİ		TOPLAM
		Yok	Var	
DENEY	Rat Sayısı	5	2	7
	Grup içi %	%71,4	%28,6	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	6	1	7
	Grup içi %	%85,7	%14,3	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	11	3	14
	Grup içi %	%78,6	%21,4	%100,0

Kontrol grubunda 2 ratta (%28,6) granülasyon dokusu yokken 1 ratta (%14,3) hafif şiddetli, 2 ratta (%28,6) orta şiddetli ve 2 ratta (%28,6) şiddetli olarak saptandı. Deney grubunda 3 ratta (%42,9) hafif şiddetli, 2 ratta (%28,6) orta şiddetli ve şiddetli granülasyon dokusu mevcuttu (Tablo-11). Orta şiddetli ve şiddetli granülasyon dokusu hem deney hem de kontrol grubunda benzerdi fakat deney grubunda kontrol grubuna göre 3 kat fazla hafif şiddetli granülasyon dokusu gösteren rat mevcuttu (**Resim-8, Grafik-5**).



Resim-8: 3. Hafta kontrol grubun histopatolojik görünümün (HE×4)

Tablo-11: 3. hafta granülasyon dokusunun ratlardaki dağılımı

		GRANÜLASYON				TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı		3	2	2	7
	Grup içi %		%42,9	%28,6	%28,6	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	2	1	2	2	7
	Grup içi %	%28,6	%14,3	%28,6	%28,6	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	2	4	4	4	14
	Grup içi %	%14,3	%28,6	%28,6	%28,6	%100,0

Vasküler invazyon kontrol grubunda hemen hemen eşit dağılım göstermekteydi. 2 ratta (%28,6) vasküler invazyon tespit edilmedi. İkişer ratta (%28,6) hafif ve orta şiddetli, 1 ratta (%14,3) şiddetli vasküler invazyon tespit edildi. Deney grubunda 2 ratta (%28,6) hafif şiddetli, 4 ratta (%57,1) orta şiddetli ve 1 ratta (%14,3) şiddetli vasküler invazyon vardı (Tablo-12). Özellikle deney grubunda kontrol grubuna göre 2 kat fazla orta şiddetli vasküler invazyon gözlemlendi (**Grafik-6**).

Tablo-12: 3. hafta vasküler invazyonun ratlardaki dağılımı

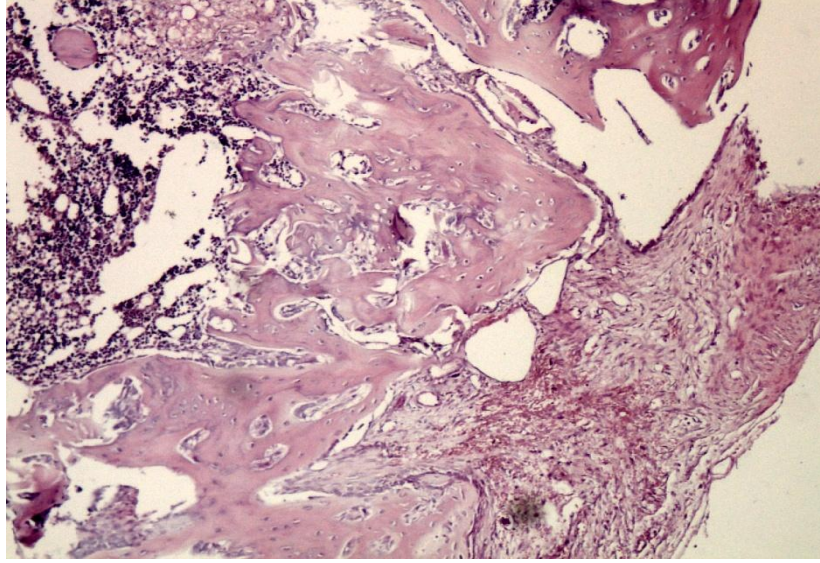
		VASKÜLER				TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı		2	4	1	7
	Grup içi %		%28,6	%57,1	%14,3	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	2	2	2	1	7
	Grup içi %	%28,6	%28,6	%28,6	%14,3	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	2	4	6	2	14
	Grup içi %	%14,3	%28,6	%42,9	%14,3	%100,0

Kontrol grubunda 4 ratta (%57,1) 3. haftada kırkırdak gelişimi yoktu. Hafif, orta şiddetli ve şiddetli kırkırdak gelişimi gösteren sadece birer rat (%14,3) mevcuttu. Deney grubunda 4 ratta (%57,1) hafif şiddetli, 2 ratta (%28,6) orta şiddetli ve 1 ratta şiddetli kırkırdak oluşumu izlendi (Tablo-13). Kontrol grubunda henüz kırkırdak gelişimi yokken kollajen uygulanan defektlerde hafif (%57,1) ve orta (%28,6) şiddetli kırkırdak gelişimi mevcuttu (**Grafik-7**).

Tablo-13: 3. hafta kırkırdak gelişiminin ratlardaki dağılımı

		KIKIRDAK				TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı		4	2	1	7
	Grup içi %		%57,1	%28,6	%14,3	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	4	1	1	1	7
	Grup içi %	%57,1	%14,3	%14,3	%14,3	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	4	5	3	2	14
	Grup içi %	%28,6	%35,7	%21,4	%14,3	%100,0

Kontrol grubunda 4 ratta (%57,1) orta şiddetli ve 3 ratta (%42,9) şiddetli osteoblastik aktivite saptandı. Kontrol grubunda 2 ratta (%28,6) hafif şiddetli, 2 ratta (%28,6) orta şiddetli ve 3 ratta (%42,9) şiddetli osteoblastik aktivite mevcuttu (Tablo-14). Burada kontrol grubunda orta şiddetli osteoblastik aktivite deney grubunun yaklaşık 2 katı idi (**Resim-9, Grafik-8**).



Resim-9: Deneý grubunun 3. hafta histopatolojik görünüm (HE×10)

Tablo-14: 3. hafta osteoblastik aktivitenin ratlardaki dağılımı

		OSTEOBLAST			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	2	2	3	7
	Grup içi %	%28,6	%28,6	%42,9	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı		4	3	7
	Grup içi %		%57,1	%42,9	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	2	6	6	14
	Grup içi %	%14,3	%42,9	%42,9	%100,0

Kontrol grubunda 2 ratta (%28,6) orta şiddetli, 5 ratta (%71,4) şiddetli yeni kemik oluşumu mevcuttu. Deneý grubunda 1 ratta (%14,3) hafif şiddette, 1 ratta (%14,3) orta şiddetli ve 5 ratta (%71,4) yeni kemik oluşumu saptadık (Tablo-15). Deneý ve kontrol grubu değerleri birbirine benzerdi (**Grafik-9**).

Tablo-15: 3. hafta yeni kemik oluşumunun ratlardaki dağılımı

		YENİ KEMİK			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	1	1	5	7
	Grup içi %	%14,3	%14,3	%71,4	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı		2	5	7
	Grup içi %		%28,6	%71,4	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	1	3	10	14
	Grup içi %	%7,1	%21,4	%71,4	%100,0

Fibröz doku oluşumu kontrol grubunda 2 ratta (%28,6) saptanmazken 1 ratta (%14,3) hafif şiddetli, 2 ratta (%28,6) orta şiddetli ve 2 ratta (%28,6) şiddetli bulundu. Kontrol grubunda hemen hemen homojen bir dağılım mevcuttu. Deney grubunda 3 ratta (%42,9) hafif şiddetli, 2 ratta (%28,6) orta şiddetli, 2 ratta (%28,6) şiddetli fibröz doku bulundu (Tablo-16). Deney grubunda hafif şiddetli fibröz doku oluşumu diğerlerinden bir miktar daha fazla saptandı (**Grafik-10**).

Tablo-16: 3. hafta fibröz doku oluşumunun ratlardaki dağılımı

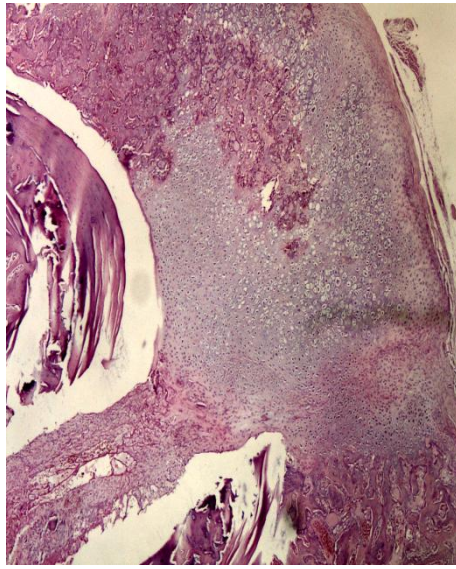
		FİBRÖZ DOKU				TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı		3	2	2	7
	Grup içi %		%42,9	%28,6	%28,6	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	2	1	2	2	7
	Grup içi %	%28,6	%14,3	%28,6	%28,6	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	2	4	4	4	14
	Grup içi %	%14,3	%28,6	%28,6	%28,6	%100,0

Yabancı cisim reaksiyonuna kontrol grubunda 4 ratta (%57,1) rastlanmadı. 2 ratta(%28,6) hafif şiddetli, 1 ratta (14,3) orta şiddetli idi. Deney grubunda ratların çoğunda (6 rat (%85,7)) yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmadı. Sadece 1 ratta hafif şiddetli yabancı cisim reaksiyonuna rastlandı (Tablo-17). Deney grubunda yabancı cisim reaksiyonuna daha az rastladık (**Grafik-11**).

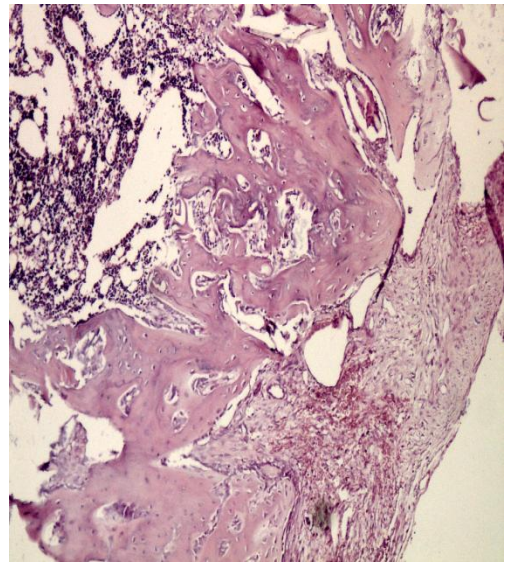
Tablo-17: 3. hafta yabancı cisim reaksiyonunun ratlardaki dağılımı

		YABANCI CİSİM			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	6	1		7
	Grup içi %	%85,7	%14,3		%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	4	2	1	7
	Grup içi %	%57,1	%28,6	%14,3	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	10	3	1	14
	Grup içi %	%71,4	%21,4	%7,1	%100,0

Huo ve arkadaşları tarafından yapılan histopatolojik evrelemeye göre kontrol 1 ratta (%14,3) evre 2, 1 ratta (%14,3) evre 6, 1 ratta (%14,3) evre 7, 1 tane ratta (%14,3) evre 8 ve 3 ratta (%42,9) evre 9 kırık iyileşmesi mevcuttu. Deney grubunda 1 ratta (%14,3) evre 1, 1 ratta (%14,3) evre 5, 2 ratta (%28,6) evre 7, 2 ratta (%28,6) evre 9 ve 1 ratta (%14,3) evre 10 kırık kaynaması mevcuttu (**Grafik-2**). Kontrol grubunun median değeri 8 iken deney grubunun median değeri 7 olarak saptandı. Fakat iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,948$) (**Resim-10 a,b**).

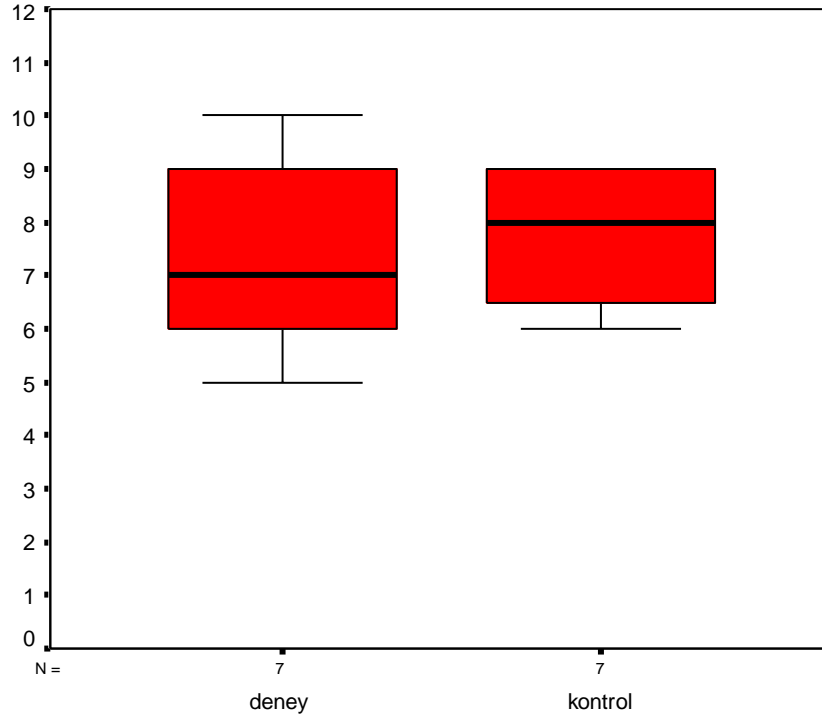


a



b

Resim-10: a) Kontrol grubunun 3. hafta histopatolojik görünümü (HE×4)
b) Deney grubunun 3. haftadaki histopatolojik görünümü (HE×10)



Grafik-2: 3. haftada Huo evrelemesine göre ratların dağılımı

Altıncı Hafta

Altıncı hafta kontrol grubunda 5 ratta (%71,4) enflamatuvar hücelere rastlanmadı. 2 ratta (%28,6) mononükleer hücelere rastlandı. Deney grubunda 6 ratta (%85,7) enflamatuvar hücre yokken sadece 1 ratta (%14,3) mononükleer hücelere rastlandı (Tablo-18). Deney ve kontrol grubu enflamatuvar hücre varlığı açısından benzerdi (**Grafik-4**).

Tablo-18: 6. hafta hücre tipinin ratlara göre dağılımı

		HÜCRE TİPİ		TOPLAM
		Yok	Var	
DENEY	Rat Sayısı	6	1	7
	Grup içi %	%85,7	%14,3	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	5	2	7
	Grup içi %	%71,4	%28,6	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	11	3	14
	Grup içi %	%78,6	%21,4	%100,0

Granülasyon dokusuna hem kontrol hemde deney grubunda 4 ratta (%57,1) rastlanmazken 3 ratta (%42,9) hafif şiddetli olarak mevcuttu (Tablo-19). Deney ve kontrol grubu granülasyon dokusu varlığı olarak tamamen benzerdi (**Grafik-5**).

Tablo-19: 6. Hafta granülasyon dokusunun ratlara göre dağılımı

		GRANÜLASYON		TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	4	3	7
	Grup içi %	%57,1	%42,9	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	4	3	7
	Grup içi %	%57,1	%42,9	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	8	6	14
	Grup içi %	%57,1	%42,9	%100,0

Vasküler invazyon kontrol grubunda 4 ratta (%57,1) artık saptanmazken 2 ratta (%28,6) hafif şiddetli ve 1 ratta (%14,3) orta şiddetli olarak bulunmaktaydı. Deney grubunda 5 ratta (%71,4) vasküler invazyon saptanmadı. Sadece birer ratta (%14,3) hafif ve orta şiddetli olarak saptandı (Tablo-20). Deney grubunda kontrol grubuna göre vasküler invazyon bir miktar daha fazla miktarda azalmış olarak saptadık (**Grafik-6**).

Tablo-20: 6. hafta vasküler invazyonun ratlardaki dağılımı

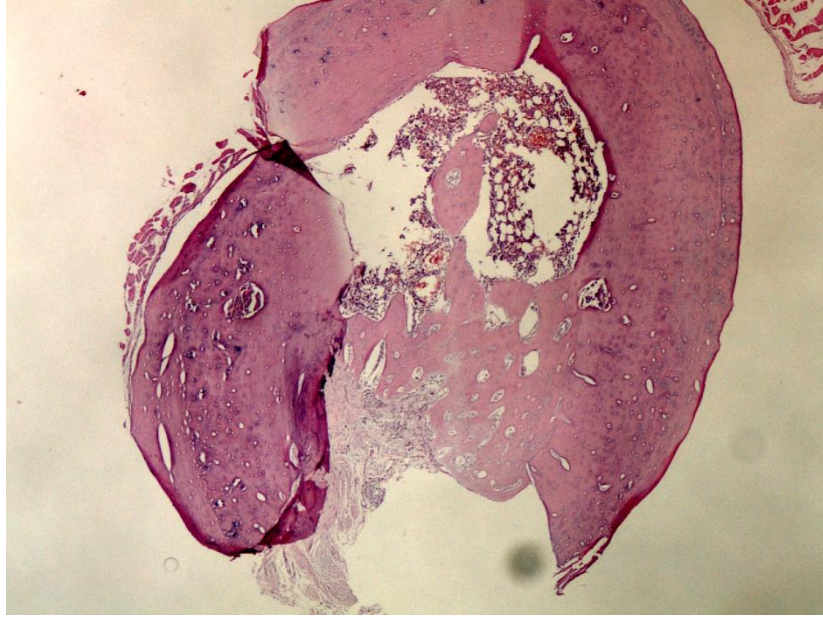
		VASKÜLER			TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	5	1	1	7
	Grup içi %	%71,4	%14,3	%14,3	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	4	2	1	7
	Grup içi %	%57,1	%28,6	%14,3	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	9	3	2	14
	Grup içi %	%64,3	%21,4	%14,3	%100,0

Kıkırdak dokusu kontrol grubunun tamamında (%100) saptanmadı. Deney grubunda 5 ratta (%71,4) kıkırdak dokusu saptanmadı ve sadece birer ratta (%14,3) hafif ve orta şiddetli kıkırdak dokusu mevcuttu (Tablo-21). Kontrol grubunda deney grubuna göre kıkırdak oluşumunu tamamlanmış görülmekte idi (**Grafik-7**).

Tablo-21: 6. hafta kıkırdak oluşumunun ratlardaki dağılımı

		KIKIRDAK			TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	5	1	1	7
	Grup içi %	%71,4	%14,3	%14,3	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	7			7
	Grup içi %	%100,0			%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	12	1	1	14
	Grup içi %	%85,7	%7,1	%7,1	%100,0

Osteoblastik aktivite kontrol grubunun hepsinde (%100) orta şiddete idi. Deney grubunda 3 ratta (%42,9) hafif şiddetli, 2 ratta (%28,6) orta şiddetli ve şiddetli olarak saptandı (Tablo-22, **Resim-11**, **Grafik-8**).



Resim-11: 6. hafta kontrol grubunun histopatolojik görünüm (HE×4)

Tablo-22: 6. hafta osteoblastik aktivitenin ratlardaki dağılımı

		OSTEOBLAST			TOPLAM
		Hafif Şiddetli	Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	3	2	2	7
	Grup içi %	%42,9	%28,6	%28,6	%100,0
KONTROL	Rat Sayısı		7		7
	Grup içi %		%100,0		%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	3	9	2	14
	Grup içi %	%21,4	%64,3	%14,3	%100,0

Yeni kemik oluşumu kontrol grubunda 1 ratta (%14,3)orta şiddetli, 6 ratta (85,7) şiddetli saptandı. Deney grubunun tümünde (%100) şiddetli yeni kemik oluşumu mevcuttu (Tablo-23). Kontrol grubuna göre deney grubunda daha yüksek oranda ratta yeni kemik oluşumu tespit edildi (**Resim-12, Grafik-9**).



Resim-12: 6. hafta deney grubu histopatolojik görünümü (HE×4)

Tablo-23: 6. hafta yeni kemik oluşumunun ratlardaki dağılımı

		YENİ KEMİK		TOPLAM
		Orta Şiddetli	Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı		7	7
	Grup içi %		% 100,0	% 100,0
KONTROL	Rat Sayısı	1	6	7
	Grup içi %	% 14,3	% 85,7	% 100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	1	13	14
	Grup içi %	% 7,1	% 92,9	% 100,0

Fibröz doku varlığı hem deney hemde kontrol grubunda 4 ratta (%57,1) saptanmazken 3 ratta (%42,9) hafif şiddetli olarak saptandı (**Grafik-10**). Deney ve kontrol grubu fibröz doku varlığı açısından tamamen benzerdi (Tablo-24).

Tablo-24: 6. hafta fibröz dokunun ratlardaki dağılımı

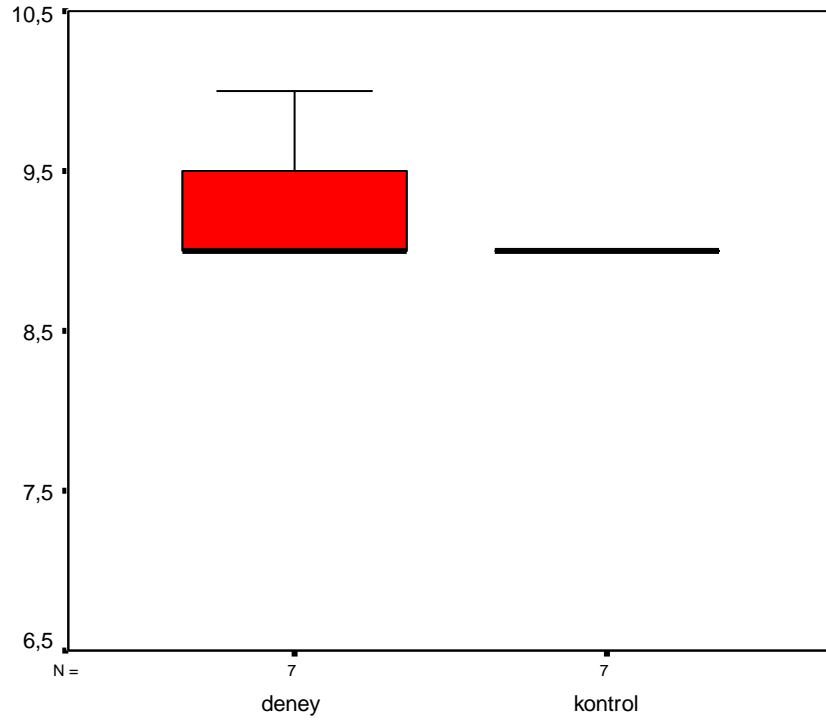
		FİBRÖZ DOKU		TOPLAM
		Yok	Hafif Şiddetli	
DENEY	Rat Sayısı	4	3	7
	Grup içi %	%57,1	%42,9	%42,9
KONTROL	Rat Sayısı	4	3	7
	Grup içi %	%57,1	%42,9	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	8	6	14
	Grup içi %	%57,1	%42,9	%100,0

Yabancı cisim reaksiyonuna deney grubunun tamamında (%100) yoktu. Kontrol grubunda 6 ratta (%85,7) yabancı cisim yokken sadece 1 ratta (%14,3) hafif şiddetli tespit edildi (Tablo-25). Kontrol grubu ve deney grubu yabancı cisim reaksiyonu açısından benzerlik göstermekteydi (**Grafik-11**).

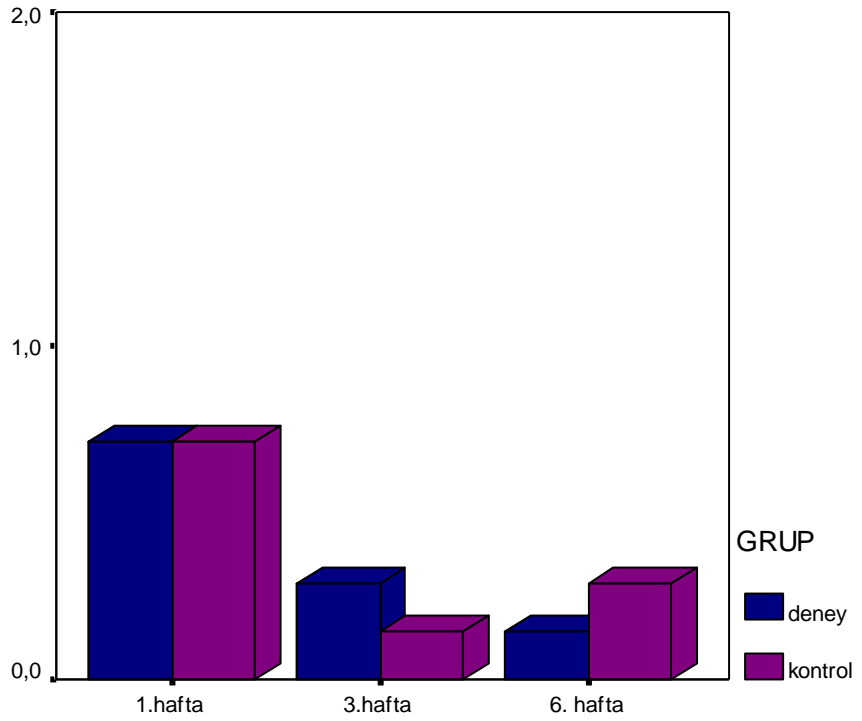
Tablo-25: 6. hafta yabancı cisim reaksiyonunun ratlardaki dağılımı

		YABANCI CİSİM		TOPLAM
		Yok	Hafif	
DENEY	Rat Sayısı	7		7
	Grup içi %	%100,0		%100,0
KONTROL	Rat Sayısı	6	1	7
	Grup içi %	%85,7	%14,3	%100,0
TOPLAM	Rat Sayısı	13	1	14
	Grup içi %	%92,9	%7,1	%100,0

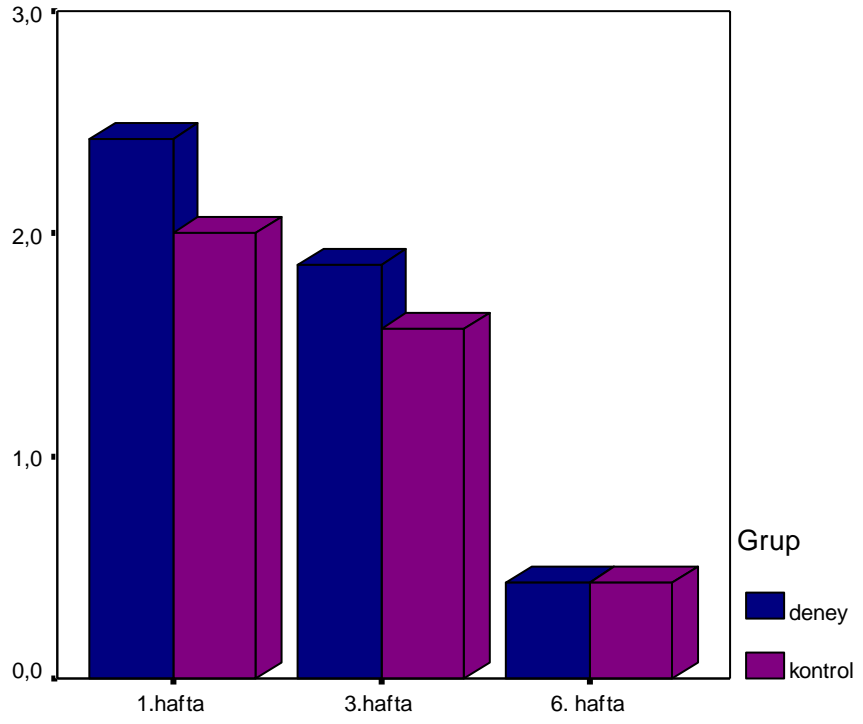
Huo ve arkadaşları tarafından yapılan histopatolojik evrelemeye göre kontrol grubunda tüm ratlarda (%100) evre 9 kırık iyileşmesi tespit edildi. Deney grubunda 1 ratta (%14,3) evre 7, 4 ratta (%57,1) evre 9 ve 2 ratta (%28,6) evre 10 kırık iyileşmesi mevcuttu (**Grafik-3**). Her iki grubun median değeri evre 9 idi ve istatistiksel olarak her iki grup arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0,533$).



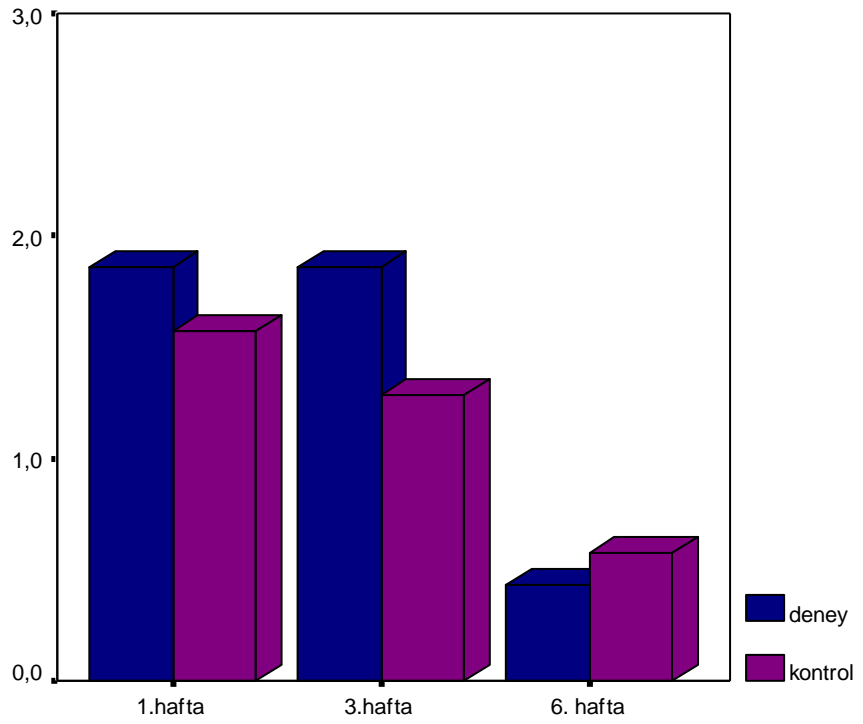
Grafik-3: 6. haftada Huo evrelemesine göre ratların dağılımı



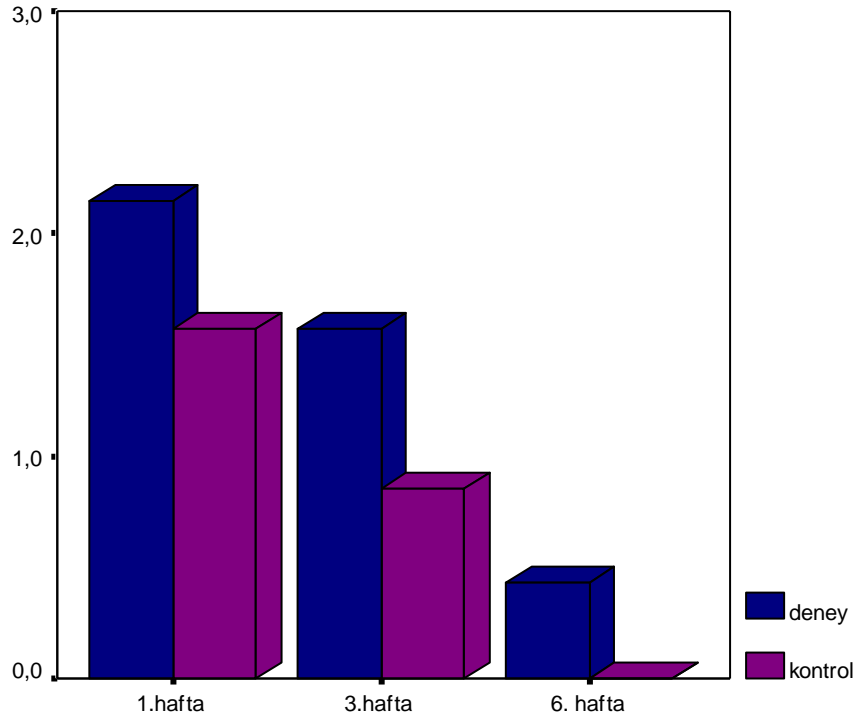
Grafik-4: Hücre tipinin haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı



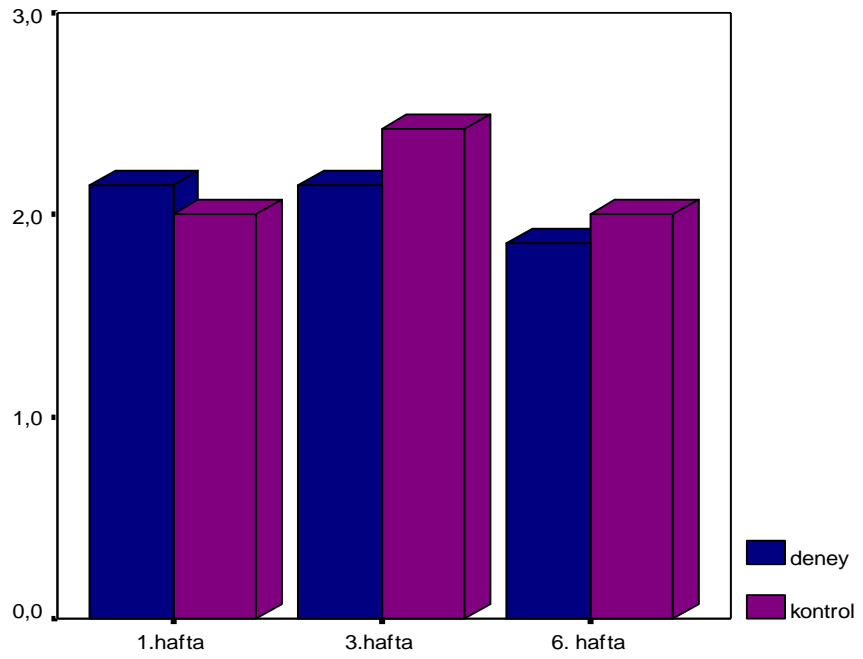
Grafik-5: Granülasyon dokusunun haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı



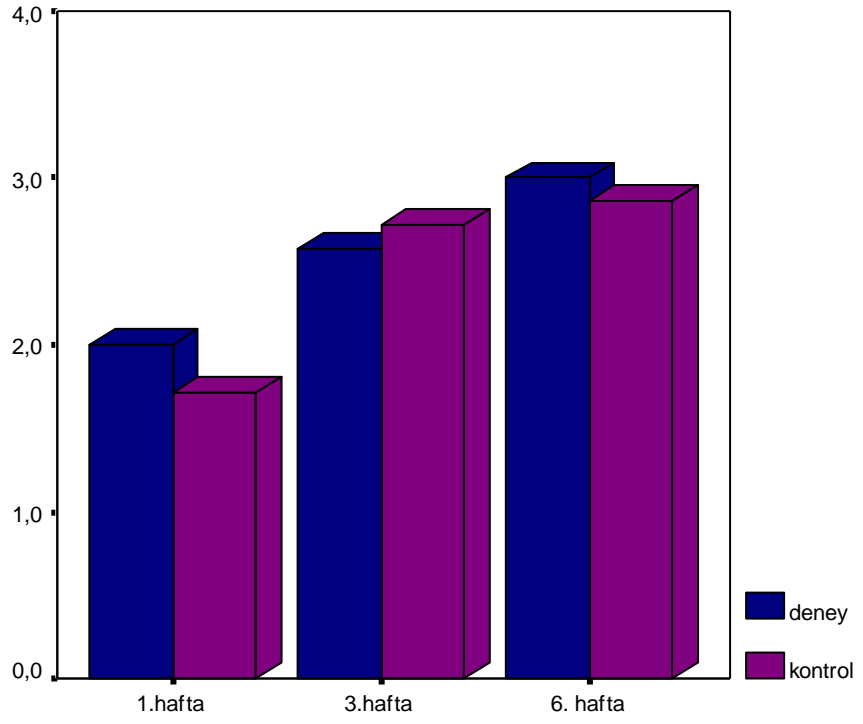
Grafik-6: Vasküler invazyonun haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı



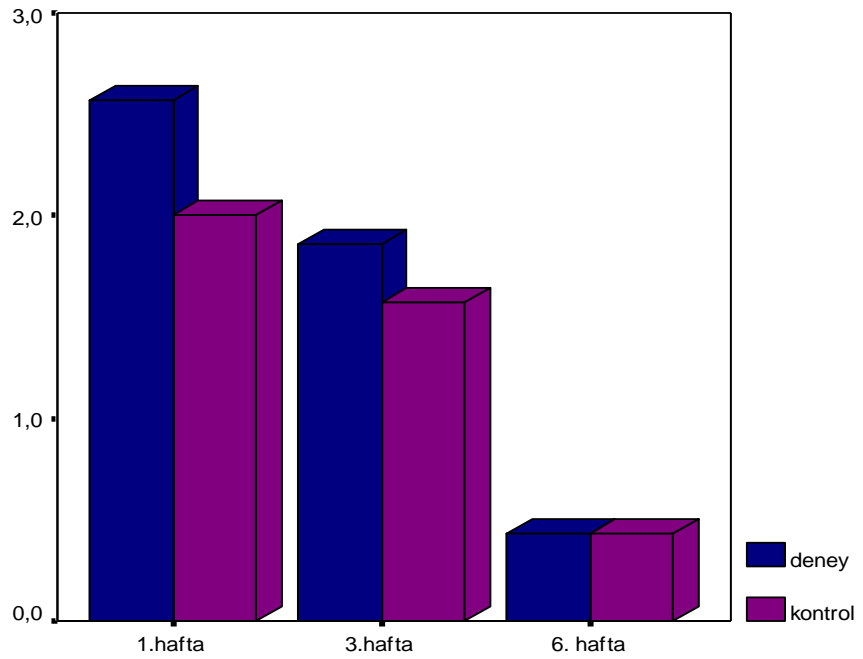
Grafik-7: Kıkırdak dokusu gelişiminin haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı



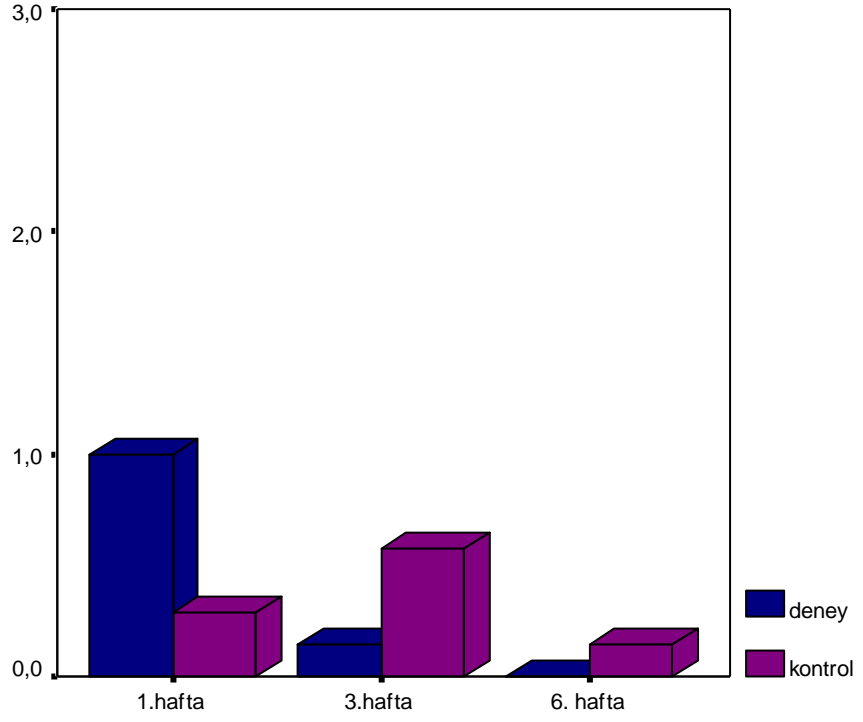
Grafik-8: Osteoblastik aktivitenin haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı



Grafik-9: Yeni kemik oluşumunun haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı



Grafik-10: Fibröz doku varlığının haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı



Grafik-11: Yabancı cisim varlığının haftalara göre deney ve kontrol grubunda dağılımı

Mikroarray Gen Analizi

Yaptığımız bu çalışmada genler birinci saat, birinci hafta, üçüncü hafta ve altıncı hafta sakrifiye edilen ratlardan intrakardiyak olarak alınan kanlardan izole edildi. Bizim çalışmamızda 42 adet gen değerlendirmeye alındı (Tablo-26).

Tablo-26: Çalışmamızda değerlendirilen genler

Sembol	Tanım	Gname
Acvr2a	Activin A receptor, type IIA	Acvr2/rActR-II
Bglap	Bone gamma-carboxyglutamate protein	Bglap2/Bgp
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1	Bmp1
Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	Bmp2
Bmp3	Bone morphogenetic protein 3	PBMP3
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	BOMPR4A
Bmp5	Bone morphogenetic protein 5	Bmp5
Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	VGR
Bmp7	Bone morphogenetic protein 7	BMP-7
Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type IA	Bmpr1a
Bmpr1b	Bone morphogenetic protein receptor, type IB	CFK-43a
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor, type II	Bmpr-II
Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cip1/Waf1
Chrd	Chordin	Chrd
Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	COLIA1
Col1a2	Collagen, type I, alpha 2	Col1a2
Col3a1	Collagen, type III, alpha 1	MGC93704
Cst3	Cystatin C	CYSC
Eng	Endoglin	MGC124909
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	c-fos
Fst	Follistatin	FOL1/Fst-288
Gdf5	Growth differentiation factor 5	Cdmp1
Id1	Inhibitor of DNA binding 1	ID125A/Idb1
Igf1	Insulin-like growth factor 1	Igf1
Igfbp3	Insulin-like growth factor binding protein 3	IGF-BP3
Il6	Interleukin 6	ILg6/Ifnb2
Cd79a	Cd79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	Cd79a
Ltbp1	Latent transforming growth factor beta binding protein 1	Ltbp1
Ltbp2	Latent transforming growth factor beta binding protein 2	Ltbp2
Ltbp4	Latent transforming growth factor beta binding protein 4	Ltbp4
Pdgfb	Platelet-derived growth factor beta polypeptide	SIS/c-sis
Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor	PAIIA/Pai1
Smad1	SMAD family member 1	Madh1
Smad2	SMAD family member 2	Madh2
Smad3	SMAD family member 3	Madh3
Smad5	SMAD family member 5	Madh5
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	Tgfb1
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	Tgfb2
Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	MGC105479
Tgfbr1	Transforming growth factor, beta receptor 1	MGC93659
Tgfbr2	Transforming growth factor, beta receptor II	Tgfbr2T
Tgfbr3	Transforming growth factor, beta receptor III	betaglycan

Çalışmamızın 1. saatinde alınan kanlardan yapılan incelemelerde her iki grupta Cst-3 (Cystatin C), Smad-2, TGF- β RIII (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü), Fst (Follistatin), Ltbp-2 (Latent Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Bağlayıcı Protein), TGF- β 1, Ltbp-4, TGF- β 2, Col1 α 1 (Kollajen Tip I alfa 1), TGF- β 3, Col1 α 2 (Kollajen Tip I alfa 2) gen ekspresyonlarında anlamlı değerler saptanmadı.

Kontrol grubunda 1. saatte BMP-5, BMP-6, BMP-7, Smad-1, TGF- β RII, BMPR-IA, BMPR-IB, Eng (endoglin), BMPR-II, c-fos, Cdkn1a (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A), Chrd (chordin), Gdf-5 (Büyüme Başkalaşım Faktör), Id-1 (DNA Bağlayıcı inhibitör 1), PDGF- β (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Beta Polipeptit), IGF-1, Serpine-1 (Serin peptidaz inhibitörü), TGF- β RI gen ekspresyonlarında anlamlı değerler saptanmadı.

Deney grubunda 1. saatte Col3 α 1 (Kollajen Tip III alfa 1), IGFBP-3 (İnsülün Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein), Ltbp-1 gen ekspresyonlarında anlamlı değerler saptanmadı.

BMP-1 (2 kat), BMP-2 (2,13 kat), BMP-3 (3,2 kat), BMP-4 (3,25 kat), BMP-5 (kontrol grubunda anlamlı değer saptanamadığı için artış oranı bildirilmemiştir), BMP-6, BMP-7, TGF- β RII, Smad-1, IL-6 (17 kat), BMPR-IA, BMPR-IB, Eng, BMPR-II, c-fos, Cdkn1a, Chrd, Gdf-5, Id-1, PDGF- β , IGF-1, Serpine-1, TGF- β RI gen ekspresyonlarını deney grubunda kontrol grubuna göre 1. saatte daha fazla olarak tespit ettik.

Col3 α 1 (deney grubunda anlamlı değer saptanamadığı için değişiklik oranı bildirilemedi), IGFBP-3, Smad-3 (2,3 kat), Ltbp-1, Smad-5 (2,35 kat) gen ekspresyonları kontrol grubunda deney grubuna göre 1. saatte daha fazla olarak tespit edildi.

Kollajen uygulamasından bir hafta sonra yapılan incelemede kollajen uygulanan grupla kontrol grubu arasında anlamlı derecede değişim gösteren gen yoktu.

Defekt oluşturulmasından üç hafta sonra alınan kanlarda yapılan değerlendirilmede kollajen uygulanan grupta kontrol grubuna göre üç gende anlamlı azalma mevcutken hiçbir gende anlamlı düzeyde artışa rastlanmadı. Anlamlı azalma olan genler ise BMP-7, BMPR-IA, c-fos genleri idi. BMP-7 gen ekspresyonunda yaklaşık 2 kat, BMPR-IA gen ekspresyonunda yaklaşık 2,8 kat ve c-fos gen ekspresyonunda ise yaklaşık 2,7 kat azalma mevcuttu.

Defekt oluşumundan altı hafta sonra alınan kanlarda yapılan inceleme sonrası kollajen uygulanan grupta, kontrol grubuna göre sadece bir genin ekspresyonunda azalma tespit edildi. Anlamlı azalma olan gen ise IGFBP-3 geni idi. IGFBP-3 gen ekspresyonunda azalma yaklaşık 3,6 kat idi

Kollajen uygulanan grubun kendi içerisindeki karşılaştırmasında birçok gen ekspresyonunda anlamlı düzeylerde değişiklikler saptandı. Kontrol grubunun kendi içerisinde yapılan karşılaştırmasında ise kollajen grubundaki kadar çok gen ekspresyonunda değişikliğe rastlanmadı.

Kollajen uygulaması yapılan deney grubunun 1. saatinde 1. haftaya göre daha fazla eksprese olan genler: BMP-1 (4 kat), BMP-2 (16 kat), BMP-3 (7,4 kat), BMP-4 (7,4 kat), Acvr-II α (Aktivin Tip II Reseptör alfa) (2,6 kat), IL-6 (7,4 kat), Eng (2,3 kat), BMPR-II (2,2 kat), c-fos (3,48 kat), Gdf-5 (4,7 kat), PDGF- β (5,2 kat), IGF-1 (7,4 kat), Serpine-1 (7,4 kat) genleri idi. Deney grubunun 1. saatinde 1. haftaya göre azalma olan gen ekspresyonları: BMP-5 (2,7 kat), BMP-6 (2,8 kat), Cdkn1a (2,5 kat), Chrd (5 kat), Id-1 (3,48 kat) idi.

Kollajen uygulaması yapılan grubun birinci ve üçüncü haftasının karşılaştırması sonrası 20 gen ekspresyonunda azalma ve bir gen ekspresyonunda artış saptandı. Ekspresyonunda azalma olan genler BMP-7 (3,3 kat), Col3 α 1 (Kollajen Tip III alfa 1) (3,08 kat), IGFBP-3 (3,08 kat), BMPR-IA (2,97 kat), BMPR-IB (3,08 kat), BMP-2 (2,53 kat), BMP-3 (3,08 kat), Cdkn1a (3,74 kat), Fst (2,66 kat), Ltbp-2 (3,08 kat), BMP-4 (3,08 kat), Gdf-5 (Büyüme Başkalaşım Faktör) (3,08 kat), Ltbp-4 (2,36 kat), BMP-5 (3,08 kat), Col1 α 1 (3,08 kat), PDGF- β (2,1 kat), BMP-6 (3,08 kat), Col1 α 2 (Kollajen Tip I alfa 2) (3,08 kat), IGF-1 (3,08 kat), Serpine-1 (3,08 kat) idi. Ekspresyonunda artış olan genler ise Cst-3 (2,2 kat) ve Ltbp-1 (2,8 kat) idi.

Kollajen uygulanması yapılan grubun birinci ve altıncı haftalarının karşılaştırması sonrası 19 gen ekspresyonunda anlamlı azalma saptanırken ekspresyonunda artış olan gene rastlanmadı. Ekspresyonunda azalma olan genler BMP-7 (2,5 kat), Col3 α 1 (2,1 kat), IGFBP-3 (2,07 kat), BMPR-IB (3,08 kat), BMP-2

(2,6 kat), BMP-3 (3,08 kat), Cdkn1a (2,69 kat), Fst (3,04 kat), Ltbp-2 (3,08 kat), BMP-4 (3,08 kat), Gdf-5 (3,08 kat), Ltbp-4 (2,3 kat), BMP-5 (3,08 kat), Col1 α 1 (2,72 kat), PDGF- β (3,03 kat), BMP-6 (3,07 kat), Col1 α 2 (2,8 kat), IGF-1 (3,08 kat), Serpine-1 (3,08 kat) idi.

Kollajen uygulaması yapılan grubun üçüncü ve altıncı haftaları arasında yapılan karşılaştırmada ise ekspresyonunda artış ve azalma olan gen saptanmadı.

Kontrol grubu olarak alınan ve sadece femurlarında defekt oluşturulan grubun kendi içerisinde yapılan karşılaştırmada kollajen uygulanan grupta olduğu kadar çok sayıda gen ekspresyonunda değişiklik saptanmadı.

Kontrol grubunun 1. saatinde 1. haftaya göre daha fazla eksprese olan genler: BMP-1 (3,43 kat), BMP-2 (8,7 kat), BMP-3 (2,7 kat), BMP-4 (2,6 kat), Acvr-II α (2,6 kat), Col3 α 1 (2,14 kat), IGFBP-3 (2,5 kat), Smad-3 (2,36 kat), Ltbp-1 (2,9 kat) genleri idi. Kontrol grubunun 1. saatinde 1. haftasına göre ekspresyon düzeyinde sadece IL-6 (2,6 kat) azalma saptadık.

Kontrol grubunun birinci haftası ile üçüncü haftası arasında yapılan karşılaştırma sonrası sadece birer adet gen ekspresyonunda artış ve azalma saptandı. Ekspresyonunda azalma olan Cdkn1a (2,1 kat) iken ekspresyonunda artış olan ise Id-1 (DNA Bağlayıcı inhibitör 1) (2,1 kat) geni idi.

Kontrol grubunun birinci ile altıncı haftaları arasında yapılan değerlendirmede ise yine Cdkn1a (3,55 kat) gen ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalma saptanırken IGFBP-3 (2,01 kat) geninin ekspresyonunda anlamlı düzeyde artış bulundu.

Kontrol grubunun üçüncü haftası ile altıncı haftası arasında yapılan değerlendirmede IGFBP-3 (3,21 kat) gen ekspresyonunda artış saptanırken herhangi bir gen ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalışa rastlanmadı.

TARTIŞMA

Yara iyileşmesi ve bunun özel bir şekli olan kemik defektlerinin iyileşme süreci incelendiğinde yaraların spontan olarak iyileşme eğiliminde olmaları bu tür çalışmaların en önemli avantajlarını teşkil etmektedir. Bu sebeple kullanılan biomateriyallerin, iyileşme sürecini hızlandırdığı veya geciktirdiği rahat bir şekilde tespit edilebilmektedir. Buna karşılık, onarım esnasında ortaya çıkan moleküler seviyedeki birçok fizyopatolojik mekanizmanın açıklanmasına rağmen, iyileşmeyi olumlu yönde etkileyen biomateriyallerin nasıl etki ettikleri tamamen açıklığa kavuşturulamamıştır (120).

Kollajen, insan vücudunda en çok bulunan protein olup bütün proteinin yaklaşık %30'unu içerir (98). Dolayısıyla vücut ağırlığının %6'sını oluşturan ve başlıca yapısal fonksiyonu olan çok önemli bir proteindir (121). Tip I kollajen lifleri; kemik, dentin, tendon, organ kapsülleri, deri, fibroz kıkırdak, fascia, sklera gibi dokuları oluştururlar ve fibroblast, osteoblast, odontoblast ve kondroblastlar tarafından sentez edilirler (120). Deri ve kemik kollajeninin, % 80-85'ni oluşturur ve buldukları dokuda gerilme kuvvetine karşı dayanıklılık kazandırır (120). Tip I kollajen kemiğin mekanik gücünün büyük kısmını sağlar (98). Kemik matriksindeki kollajen genellikle tendon ve derideki major yapısal protein olan tip I kollajendir (121).

Genel olarak kollajen lifleri çeşitli hücre tiplerinin migrasyonu için iskelet görevi görürler (122,123). Bundan dolayı kollajen, hücre migrasyonunda, hücre-matriks ve matriks-matriks ilişkilerinde önemli rol oynar (13). Kollajen lifleri; BMP'ler, TGF'ler, IGF'ler ve FGF'ler gibi bazı osteoindüktif faktörleri saklayabilir ve yapay kemik kavitesi hazırlandığı zaman bunlar kemik matriksinden kolayca salgılanabilir (13). Kollajenin kendisi bu osteoindüktif maddelere bağlanamasa da bu faktörlere yüksek afinitesi olan çeşitli ekstraselüler matrikslere bağlanabilir (124). Eğer böyleyse çeşitli osteoindüktif maddelerin kollajen lifleri tarafından tutunması mümkün olabilir ve daha önce göç eden hücrelerin osteoblastik hücrelere dönüşümünü sağlayabilir (13). İlave olarak tip I kollajen osteoblastik farklılaşmada direkt olarak önemli bir rol oynayabilir (13,125,126). Tip I kollajenin $\alpha 1$ zincirini

$\alpha 2\beta 1$ integrinle farklılaşması osteojenik hücreleri etkileyebilir (13,125,127). Çünkü osteojenik hücrelerde $\alpha 2\beta 1$ integrini eksprese ederler. Xiao ve arkadaşları osteokalsin geninin transkripsiyonel aktivitesinin $\alpha 2\beta 1$ integrin aracılığıyla uyarıldığını yayınlamışlardır (13,128). Bundan dolayı kollajenin osteokondüktivitede etkili olduğunu gözlemlemiştir (13).

Kollajen implantların avantajları; bunların biyolojik formülasyonunu, hızlı reabsorbsiyonunun, enflamatuvar reaksiyon ile hafif ilişkisini ve kollajen elde edilme teknikleri ve tamamen otojen bir implant oluşturma yeteneklerini içerir (129). Ek olarak kemikte baskın olan ve major ekstrasellüler bir bileşen olan tip I kollajen sıvı, jel veya süngerimsi şekillerde olabilir (129). Son zamanlarda kraniofasial iskelette tip I kollajen jellerinin kritik boyuttaki kafatası defektlerinin (12,129-131) ve ratlardaki nazal defektlerin iyileşmesine yardımcı oldukları gösterilmiştir (129,132).

Tip I kollajen, osteoblast proliferasyonunu ve kemik iliği kaynaklı hücrelerin osteojenik farklılaşmasını stimüle eder (133,134). Tip I kollajen; osteoblastlar, fibroblastlar ve endotel hücreleri için kemotaktiktirler (135-137). Tip I kollajen kemik defektlerini doldurmak için bazı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (138,139). Daha önceki çalışmalarda kollajenin osteogenezin etkili bir stimülatörü olduğu gösterilmiştir (140). Bu nedenle kollajenin kemik defektlerini iyileştirme üzerine etkilerini değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür (140). Bazı araştırmacılar kollajenin osteogenezi arttırdığına ait herhangi bir kanıt bulamamışlardır (141).

Otolog kemik greftlerinin hastaya yüklediği morbidite ve allogreftlerin maliyetinin yüksek olması nedeniyle elde edilebilirliği kolay ve immünolojik yanıtı az olan bioaktif materyallere yönelim artmıştır. Bu materyaller içinde yer alan ve lokal uygulanan kollajenlerin, doku onarımında etkili olduğu bir çok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir (120,142-144). Yine bir çok araştırmacı, kollajenin vücut tarafından tolere edilebildiği ve nontoksik bir materyal olduğunu (120), ayrıca çok güçlü hemostatik etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir (120,144,145).

Kollajenin bu etkileri göz önüne alındığında uygun bir materyal gibi görülmesine rağmen bazı çalışmalarda da bu etkilerinin saptanmaması nedeniyle biz çalışmamızda kemik defektlerinin tamirinde tip I kollajenin kaynamaya etkisini histopatolojik olarak değerlendirmeyi uygun gördük.

Murata ve arkadaşları, kollajen implantasyonundan 1 hafta sonra bazı enflamatuvar hücrelerin implantın dış tabakasına doğru infiltrasyonunu ve mezenkimal hücrelerin invazyonunun nadir olduğunu bildirdiler (146). Biz, Murata'nın sonuçlarından farklı olarak enflamatuvar hücrelere rastlamadık.

Yuya Taguchi ve arkadaşları, kollajen yerleştirilmesinden 1 hafta sonra yoğun kollajenin kemik defektlerini örtüğünü tespit ettiler (13). Yeni kemik oluşumunun kavitenin alt bölgesinden başladığını ve kontrol grubu ile aynı şekilde yeni oluşan kemiğin ağsı kemik profilini gösterdiğini bildirdiler (13). Yuya Taguchi ve arkadaşları; enflamatuvar hücre görmedi fakat monositler veya makrofajlar resorbe olan kollajenin çevresinde dağılmıştı (13). Biz 1 haftalık kontrol ve deney kavitelerinde, Yuya Taguchi ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu olarak, monositleri tespit ettik. Kontrol grubu ile deney grubu arasında enflamatuvar hücre varlığı ve tipi açısından farklılık yoktu. Her iki grup benzerdi. Bizde 1. haftada özellikle deney grubunda yeni kemik oluşumuna rastladık ve bu ağsı kemikle uyumluydu.

Yuya Taguchi ve arkadaşları, kontrol grubunda kavite oluşturulmasından 2 hafta sonra yeni oluşan kemiğin ağsı kemiği ortaya çıkaracak şekilde daha kalın trabekül gösterdiğini bildirdi (13). Yeni oluşan kemiğin iç bölgesi, kemik iliğine ve çok sayıda osteoblast ve trabeküler yüzeyde yerleşmiş osteoklastlara sahipti (13). Biz 1 haftalık kontrol kavitemizde orta şiddetli osteoblastik aktivite tespit ettik.

Ertürk ve Şengün; 1 haftalık kontrol kavitelerinde, kemik yüzeyinde osteoblastik aktivite ve minimal yeni kemik yapımı olduğunu gözlemişlerdir (120,147). Güngörmüş, 1 haftalık kontrol kavitelerinde kapiller damar proliferasyonu, aktif fibroblastlardan oluşan granülasyon dokusu ve kollajen gelişimi olduğunu belirtti (120). Biz Güngörmüş'den farklı olarak kontrol kavitelerinin büyük çoğunluğunda

orta şiddetli osteblastik aktivite ve yeni kemik oluşumu bulduk. Bizim kontrol kavitelerimizde orta şiddetli granülasyon dokusu hakimken vasküler invazyon hafif şiddetliydi.

Kemik defektlerinde, kollajen jelin etkilerini deneysel bir çalışmayla değerlendiren Del Balso ve arkadaşlarının (120) 1 haftalık deney kavitelerindeki bulgularıyla bizim 1 haftalık deney kavitelerimizdeki bulgularımız hemen hemen uyumluydu. Fakat biz, 1. haftada Del Balso ve arkadaşlarından daha fazla yeni kemik yapılarına rastladık.

Güngörmüş ve arkadaşları, 1. haftada deney kavitelerinde; lenfositten zengin iltihabi mikst hücre infiltrasyonu, belirgin fibroblastik proliferasyon, sayıca artmış kapiller damarlar, artmış kollajen, hafif bir osteoplastik aktivite ve yabancı cisim dev hücrelerin varlığını da belirledi. Bu yabancı cisim dev hücreleri osteoklastlar olarak değerlendirdi (120). Biz 1 haftalık kontrol kavitelerinde monositleri tespit ettik. Yabancı cisim reaksiyonu deney grubunda kontrol grubuna göre bir miktar daha fazla olmakla beraber hemen hemen benzerdi. Biz bunu osteoklastlar olarak yorumlamadık bize göre uyguladığımız tip I kollajene immün yanıtın az olduğunun bir göstergesiydi. Biz alıcı dokunun tip I kollajene karşı red cevabı geliştirmediği kanaatindeyiz. Çünkü Thomas ve arkadaşları ile Sweeney ve arkadaşları; bazal membran veya laminin jellerinin implantasyonu sonrasında ratlarda laminine karşı dolaşan antikörlerin indüklendiğini fakat tip I kollajene karşı (rat kuyruğundan elde edilmiş) olmadığını göstermişler (12,148).

Biz çalışmamızın histopatolojik incelemesinde, Huo ve arkadaşlarının tanımladığı histopatolojik evrelemeyi de kullandık (117-119). Bu histopatolojik evrelemeye göre deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı ($p=0,027$) farklılık saptandı. Deney grubunda, kontrol grubuna göre 1. haftada kaynamayı daha iyi olarak bulduk. Kollajen uygulaması kaynamayı ilk haftada hızlandırmıştı.

Yuya Taguchi ve arkadaşları, kontrol grubunda 3. ve 4. haftalarda yeni oluşan kemiğin daha kalın trabekül gösterdiğini fakat yeni kemiğin periosteal yüzeyinin konkav olarak kaldığını bildirdiler (13). Osteoplastlar hala kenar bölgede yoğun

olarak bulunmaktaydı (13). Biz kontrol grubunda bu haftada osteoblastları yoğun olarak bulduk. Yeni kemik oluşumu da bu dönemde, kontrol grubunda deney grubundaki gibi şiddetli olarak saptandı.

Yuya Taguchi ve arkadaşları, deney grubunda operasyondan 3 hafta sonra yeni oluşan kemiğin, periferdeki kemiğin yüksekliği ile hemen hemen aynı yüksekliğe ulaştığını saptadılar (13). Yeni kemik oluşumunda çok sayıda osteoblastın aktif kemik oluşumunu gösterir şekilde toplandığını ve birkaç makrofaj tespit ettiler (13). Biz 3. haftada osteoblastik aktiviteyi orta düzeyde ve kırıkta oluşumunu zayıf olarak tespit ettik. Yeni oluşan kemik, periferdeki kemiğin seviyesine ulaşmıştı. Bizde kırık hattında monositler tespit ettik.

Ertürk, 3 haftalık kontrol kavitelelerinde, periosteal yüzden kaviteye kadar oldukça kalın ve iyi gelişmiş kemik trabekülleriyle dolduğunu ve bazı alanlarda kemiğin, lameller kemik niteliği kazandığını bildirdi (120,147). Şengün, 21 günlük kontrol kavitesinde; oldukça kalın ve iyi gelişmiş kemik trabekülleri ile dolduğunu ve normal görünümde bir kemik iliği saptadı (120). Biz, Ertürk ve Şengünden farklı olarak 3. haftada kontrol grubunda yeni kemik oluşumunu şiddetli olarak saptadık ve deney grubuyla benzer nitelikteydi.

Gabor Fuerst, kollajen uygulanması sonrası 4. haftada periosttan, endosteumdan ve kemik kenarlarından orjin alan yeni oluşmuş kemiğin tamamen defektleri kapatmadığını saptadılar ve yeni oluşan kemiğin lameller tipte ve immatür olduğunu bildirdiler (133). Gabor Fuerst, defektlerin kenarlarındaki haversiyen kanallarının kemik rezorpsiyonu ile dilate olduğunu ve yeni oluşan kemiğe *cutting cons*'lar ile bağlantılı olduğunu bildirdi (133). Doldurucu kollajenin hala yeni oluşmuş kemik arasına dağıldığını saptadı. Multinükleer makrofajlara ise seyrek olarak rastladı (133). Biz 3. haftada yaptığımız incelemede Gabor Fuerst'in bulgularıyla uyumlu olarak defektin tamamen kemik ile dolmadığını ve yeni oluşan kemiğinde immatür kemik olduğunu tespit ettik. Biz de az miktarda monositik hücre infiltrasyonuna rastladık.

Gabor Fuerst, kollajensiz grupta 4. haftada mandibulanın kortikal kemiğindeki delik kenarının histolojik olarak açıkça görüldüğünü bildirdi (133). Kemik tamiri; periost ve endostium kenarından orjin alarak defektin merkezine doğru çıkıntı şeklinde ilerledi (133). Tam bir kemik kaynaması yoktu. 4. haftada kollajen ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık mevcuttu. Biz de kontrol grubumuzda tam bir kaynamayı bu dönemde tespit edemedik. Fakat bu dönemde kollajenli grup ile kontrol grubu arasında kaynama açısından fark saptamadık.

Saygı, bu dönemde yoğun bağ dokusu artışı ile beraber osteoblastik proliferasyon gösteren kemik yapımı olduğunu saptamıştır (120). Biz bu dönemde, kontrol kaviterinde değişik derecelerde fibröz doku saptarken osteoblastik aktiviteyi; kontrol grubunda deney grubuna göre daha fazla saptadık.

Güngörmüş ve arkadaşları, çalışmalarının 21 günlük kontrol kaviterinde; orta derecede fibroblastik aktiviteyle beraber osteoblastik aktivitede artma olduğunu ve orta derecede kalsifiye alanlar tespit ettiler. Ayrıca bu kaviterlerde yoğun bir kollajen yapımı olduğunu gözlemladiler (120). Biz çalışmamızın 3. haftasında kontrol ve deney grubunun ikisinde de benzer şekilde mononükleer hücre infiltrasyonu saptadık. Ayrıca kontrol kaviterinde; orta ve yoğun arası osteoblastik aktivite ve değişik oranlarda fibröz doku saptadık. Fakat kontrol grubunda 3. haftada hala kırık oluşumuna rastlamadık.

Murata, 3. haftada ince bir fibröz dokunun, implant ve orijinal kemik arasında invaze olduğunu buldu (146). Taşıyıcı kollajen implantın periferinde kısmen absorbe idi (146). Biz de Murata ve arkadaşları gibi 3. haftada hafif şiddetli fibröz doku oluşumunu tespit ettik. Fakat kollajenin 3. haftada tamamen absorbe olduğunu gördük.

Saygı, 3 haftalık kollajen uyguladığı kavitesinde; ince kemik dokusunun ince trabeküllerini ve bunların arasında yoğun bağ dokusu, bol damar, belirgin bir osteoblastik aktivite ve makrofajlar olduğunu belirlemiştir (120). Güngörmüş, 3 haftalık deney kaviterinde orta derecede fibroblastik aktiviteyle beraber çok belirgin bir osteoblastik aktivite ve bu bölgelerde geniş kalsifiye olmuş alanlar ile çok yoğun bir

kollajen yapımı olduğunu tespit etti (120). Biz deney grubumuzda 3. haftada kontrol grubundaki gibi genelde mononükleer hücre infiltrasyonu saptadık. Granülasyon dokusunu bu dönemde hafif ve orta şiddetli olarak tespit ederken vasküler invazyonu orta şiddetli olarak tespit ettik. Kıkırdak oluşumu hafif şiddetliyle osteoblastik aktiviteyi, orta ve yoğun şiddetli arasında bulduk. Biz bu dönemde Saygı ve Güngörmüş'ten farklı olarak osteoblastik aktivite ve yeni kemik oluşumu açısından kontrol grubu ile deney grubu arasında fark saptamadık.

Yine Güngörmüş ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları deneysel çalışmada, 28. günde kontrol grubunun defektlerinde mononükleer hücre infiltrasyonu, fibroblastik aktivite, ağır kollajen gelişimi, orta osteoblastik aktivite ve kalsifikasyon gözlemlenildi. Kollajen uyguladıkları defektlerin yeni kemik ile dolduğunu saptadılar (140). Biz 3. haftada kontrol grubunda çok az sayıda mononükleer hücre infiltrasyonuna rastladık. Değişik derecede fibröz doku gelişimi mevcuttu. Yine kontrol grubunda orta şiddetli osteoblastik aktiviteye rastladık fakat kıkırdak oluşumu kontrol grubunda mevcut değildi. Biz Güngörmüş'den farklı olarak kollajen uygulanan grupta 3. haftada tamamen kemik oluşumu izleyemedik.

Biz 3. haftada deney grubu ile kontrol grubu arasında Huo'nun evrelemesine göre ve değerlendirdiğimiz parametrelere göre iyileşmede farklılık görmedik. Kollajenin kaynamaya olan etkisinin 3. haftada kontrol grubuyla aynı olduğunu saptadık. Biz Yuya Taguchi, Ertürk, Saygı ve Güngörmüş'ün sonuçlarından farklı olarak bu dönemde kollajenli grup ile kontrol grubunda kırık iyileşmesi açısından fark tespit etmedik.

Pierre Saadeh, postoperatif 6. haftada kontrol mandibulasının gross incelemesinde; orijinal defekte yakın çapta minimal kemik tamiri ile sirküler defektin açıkça görüldüğünü belirledi (129). Tip I kollajen jelinin implante edildiği mandibulalarda defekt sınırları açıkça tanımlanamıyordu ve defekt ince kırılğan bir kemik köprü ile kaplanmıştı (129). Biz 6. haftada hem kontrol grubunda hem de deney grubunda defektleri gözle tespit edebiliyorduk. Deney grubunda defektlerin kontrol grubuna göre çok daha küçük olduğu fark edilebiliyordu.

Pierre Saadeh, kontrol hayvanlarında defektin sınırlarının ince bir fibröz konnektif doku ile açık bir şekilde tanındığını gösterdi (129). Deney hayvanlarında defektin organize kortikal kemik plakları ile tam ya da tama yakın tamir olduğunu gözlemledi. Her iki grupta lenfositik infiltrasyon tespit etti. Deney örneklerinde kollajen jel implantlarının kalıntısına rastlamadı (129). Biz 6. haftada Pierre Saadeh'den farklı olarak enflamatuvar hücre tespit edemedik yok denecek kadar az monositik infiltrasyon mevcuttu. Hem kontrol hemde deney grubunda fibröz doku yok veya hafif şiddetli olarak tespit ettik. Her iki grupta birbirine benzer sonuçlar bulduk. Biz yine Pierre Saadeh'den farklı olarak kontrol grubunun hemen hemen hepsinde az miktarda matür kemik ve genelde immatür kemik tespit ettik. Deney grubunda ise 2 ratta tam kemik iyileşmesi yani matür kemik mevcuttu.

Murata, 6. haftada kollajen liflerinin yoğun bir şekilde parietal kemik üzerinde yığıldığını ve ince bir fibröz doku ile çevrili olduğunu bildirdi ve implantın büyüklüğü ve yüksekliği azalmış olarak değerlendirdi. Periost temel olarak lif bileşenlerinden oluşmaktaydı ve osteoblastlar yoktu. İmplantların içerisinde ne kemik ne de kıkırdak gözlenmedi (146). Biz Murata'dan farklı olarak hem deney hem de kontrol grubunda ya fibröz doku yoktu ya da yok denecek kadar azdı. Osteoblastik aktivite deney grubunda hafifden şiddetliye kadar değişik derecelerde saptanırken kontrol grubunda orta şiddetli olarak bulduk. Ayrıca Murata'dan farklı olarak biz hem kontrol grubunda hem de deney grubunda yoğun olarak immatür ağı kemik oluşumu ve az miktarda matür lameller kemik oluşumu izledik.

Gabor Fuerst, 8. haftada defektlerin çoğunun yeni oluşmuş kemik ile dolduğunu, ağı kemiğin daha az belirgin olduğunu ve çoğunlukla lameller kemiğe remodele olduğunu bildirdi. 8. haftada kollajen ve kontrol grupları arasında belirgin farklılık bulamadı (133). Fakat biz 6. haftada hem kontrol grubundaki hemde deney grubundaki ratlarda genelde immatür kemik oluşumuna eşlik eden az miktarda matür kemik oluşumlarını tespit ettik. Sadece deney grubunda 2 ratta tam matür kemik oluşumu mevcuttu fakat deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit etmedik.

Schlegel, Collos (domuz tip I kollajeni) kullandığı gruplarda yumuşak dokular ile kortikal bir ara yüzün olmadığı, orijinal defektin tam bir yapısal kemik ile dolduğunu 12. haftada gördü (149). Biz ise tip I kollajen uyguladığımız deney gruplarında neredeyse 6. haftada lameller kemik oluşumunu tespit ettik.

Thomas ve arkadaşları, 2 ile 12. haftalar arasında 2 haftada bir taranan tip I kollajen implante edilmiş ratlarda tamirin en fazla olduğu dönemi ilk 6 hafta olarak gösterdi (12). Biz tip I kollajenin en etkin olduğu dönemi 1. hafta olarak belirledik. 3. ve 6. haftalarda kontrol grubu ile farklılık saptayamadık. Fakat yinede tip I kollajen uygulanan grup, kontrol grubuna göre bir miktar daha iyi iyileşme gösterdi.

Thomas ve arkadaşları, tip I kollajen miktarının tamir oranını artırıp artırmadığını göstermek için tip I kollajen miktarını arttırarak implantasyon yaptıkları ratlarda 12. haftada defektlerin tamamen iyileştiği gözlemişler. Kollajen miktarıyla iyileşmenin doğru orantılı olduğunu bildirdiler (12). Biz çalışmamızda 4 mg tip I kollajen ile oluşturduğumuz defektlerin tamamını doldurduk ve farklı dozları karşılaştırmadık. Daha yüksek dozlarda uygulaysaydık beklide Thomas ile aynı sonuçları elde edebilirdik.

Thorwarth; kemik defekti olan vakalarda otojen kemik kullanımının hala altın standart olduğunu bildirmektedir (150-152). Osteogenik potansiyelinden dolayı otojen kemik grefti en etkili kemik greft matreyalidir (150,153). Bununla birlikte bu greftin miktarının sınırlı olması, elde ederken morbiditeyi artırması ve ek bir cerrahi girişim gerektirmesi otogreftlerin dezavantajlarıdır (150,154,155). Bu riskleri azaltmak için kemik yerine geçebilecek materyaller veya bunların otojen kemik ile kombinasyonu kullanılabilir (150,156-158). Bu materyallerin avantajları sınırsız kaynak, kolay sterilizasyon ve depolamadır. Bu ürünlerin artmış sayısına rağmen şu ana kadar ideal tek bir materyal yoktur (150,159). Kemik yerine kullanılan materyaller osteogenez için gerekli hücresel elemanları sağlamazlar (150). Bunlar osteoindüktif olarak düşünülemezler (150). Sadece yeni kemik depolanması için bir yapı iskelesi sağlayarak osteokondüktif etki gösterirler (150).

Kollajen lifleri; BMP'ler, TGF'ler, IGF'ler ve FGF'ler gibi bazı osteoindüktif faktörleri saklayabilir ve yapay kemik kavitesi hazırlandığı zaman bunlar kemik matriksinden kolayca salgılanabilir (13). Kollajenin kendisi bu osteoindüktif maddelere bağlanamasa da bu faktörlere yüksek afinitesi olan çeşitli ekstraselüler matrikslere bağlanabilir (124). İlave olarak Tip I kollajen, osteoblastik farklılaşmada $\alpha 2\beta 1$ integrin ekspresyonu ile direkt olarak önemli bir rol oynayabilir (125,126). Çünkü osteogenik hücrelerde $\alpha 2\beta 1$ integrini eksprese ederler. Xiao ve arkadaşları osteokalsin geninin transkripsiyonel aktivitesini $\alpha 2\beta 1$ integrin aracılığıyla uyardığını yayınlamışlardır (128).

Biz de çalışmamızda Tip I kollajenin osteogenezde rol alan bazı genlerin ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe etkisi olup olmadığını araştırdık. Bunun için TGF- β ailesi üyelerinden 42 adet geni araştırmayı uygun gördük. Literatürde; kırıkta çeşitli genlerin ekspresyonları çalışılmış. Fakat tip I kollajenin etkisini değerlendiren çalışmalar çok kısıtlıydı ve genellikle kırıktaki kallus dokusundan çalışılmıştı. Biz gen ekspresyon ürünlerini periferik kanda değerlendirmeyi uygun gördük.

Kollajen uygulamasından bir hafta sonra yapılan incelemede; kollajen uygulanan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede artış gösteren gen olmadığı fark edildi.

Ohta, c-fos mRNA'nın belirgin ekspresyonu kırıkta sonra 7 ila 10. günler arasında gözlemledi. Bu dönemde osteblastlar belirgin hücresel bileşeni oluşturuyordu (151). Ohta, 2. haftaya kadar ekspresyonun devam ettiğini fakat bu dönemden sonra aşamalı olarak düşük seviyelere gerilediğini bildirdi (151). Ohta, kırık oluşturulmayan kontrol grubunda c-fos ekspresyonu saptamadı. Ohta, c-fos geninin osteoblastik farklılaşmada spesifik rol oynadığını düşündü ve kondrojenik farklılaşmanın gerçekleştiği kırıktan sonraki ilk 7 günde c-fos mRNA'sını tespit edemedi (151). Biz çalışmamızın 1. saatinde kontrol grubunda c-fos ekspresyonunu saptayamadık. Deney grubunda ise 1. saatte maksimum ekspresyon saptadık. İlk haftada c-fos geninde kontrol grubuna göre deney grubunda anlamlı düzeyde değişiklik saptamadık. 3. haftada kontrol grubuna göre yaklaşık 2,7 katlık bir azalma tespit ettik. Deney grubunda 1. saatte tip I kollajenin etkisi ile inflamatuvar süreç

daha fazla miktardaydı. Bu yüzden deney grubunda c-fos ekspresyonu daha fazla miktarda indüklendi. İlk haftada her iki grupta da histolojik olarak kırıkta yapılar baskın olduğundan Ohta ve arkadaşlarının bildirdiğiyle uyumlu olarak c-fos ekspresyonunda fark tespit edemedik. 3. haftada kontrol grubunda osteoblastik aktivite deney grubuna göre daha fazla olduğu ve kırıkta oluşumu daha az, immatür kemik oluşumu daha fazla olduğu için c-fos gen ekspresyonundaki azalmayı tespit ettik.

Yan Yiu Yu ve arkadaşları, 7. ve 10. günlerde kondrositlerde BMP-7 için kuvvetli immün boyanma gösterdi ve 14. günde ostoblastlar ve osteositlerde BMP-7 için immün boyanma gözlemedi. 21. günde sadece BMP-5 ve BMP-7 ağı kemik boyunca olan endotel hücrelerinde zayıf immün boyanma gösterdi (161). Biz BMP-5 ve BMP-7 ekspresyonunda 1. saatte kontrol grubunda anlamlı değer saptamadık deney grubunda ise bir miktar ekspresyon mevcuttu. 1. haftada ise deney ve kontrol grubu arasında anlamlı değişim saptanmazken BMP-5 için her iki grupta da 1. saate göre anlamlı artış mevcuttu. BMP-7 için ise anlamlı düzeyde değişim mevcut değildi. İlk haftada osteoblastik aktivite ve yeni kemik oluşumunun artmasıyla BMP-5 ve BMP-7 ekspresyonunda maksimum değerler saptadık. Deney grubunda 1. saatte BMP-5 ve BMP-7 ekspresyonunda ki fazlalığı Tip I kollajene bağladık.

Yan Yiu Yu ve arkadaşları BMP antagonisti olarak değerlendirdikleri BMP-3 ve noggin ekspresyonlarını 7. günde kondrositlerde ve 10. günde ağı kemikteki osteoblastlarda zayıf olarak saptadılar ve 14. günde her ikisinin ekspresyonunu tespit etmediklerini bildirdiler (161). Takahiro Niikura ve arkadaşları, atrofik kaynamama ile standart iyileşen kırıkları karşılaştırdıkları çalışmada BMP-3 ekspresyonunu atrofik kaynamamada standart iyileşen kırıklara göre daha düşük buldular. Belirgin farklılığı 10., 14. ve 21. günler buldular (162). Standart iyileşen kırıklarda ise BMP-3 ekspresyonunu 21. güne kadar artış gösterdiğini buldular. Biz çalışmamızda kollajen uygulanan grupta 1. saatte deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha fazla BMP-3 ekspresyonu saptadık. 1. haftada anlamlı olmamakla birlikte BMP-3 ekspresyonunu deney grubunda bir miktar daha fazla olarak tespit ettik. Her iki grupta da BMP-3 ekspresyonu 1. saatte maksimumdu. Deney grubunda kontrol grubuna göre azalma miktarı daha fazlaydı. Bizim çalışmamızda ilk saate BMP-3

ekspresyonunun maksimum olması nedeniyle ve haftalar ilerledikçe azalması nedeniyle biz BMP-3'ün antagonist değil osteogenezi başlatmada diğer BMP'leri indüklediğini ve onların fonksiyonlarını düzenlendiğini düşündük.

Takahiro Niikura ve arkadaşları, çalışmalarında diğer bir BMP antagonisti olarak bilinen chordin ekspresyonlarında incelenen zamanlar boyunca bir farklılık tespit etmediler (162). Biz, chordinin ekspresyonunu ilk haftada maksimum olarak bulduk. 3. haftada ekspresyonu azalmakla birlikte 6. haftada bir miktar artışı tekrar saptadık. Bu chordin ekspresyonunun ilk hafta maksimum olup 3. hafta azalması ve 6. haftada tekrar bir artış göstermesi, BMP antagonisti etkisi olabileceği gibi BMP düzenleyici etkisini ve remodelingde osteoklastları aktive edici etkisi olabileceğini düşündürmekte.

Jason, operasyondan 1 hafta sonra iyileşen osteotomi dokusunun kesitlerinin immünohistokimyasal analizinde BMP-7 ekspresyonunun yeni oluşan kırık kallusunda belirgin olduğunu ve bunun osteotomi kenarları boyunca osteoblastlar ve osteoklastlara lokalize olduğunu gösterdi (163). Operasyondan sonra 3. ve 4. haftalarda kemik depolanması ve remodeling azaldıkça BMP-7 için boyanan hücreler azaldı (163). Osteotomi bölgesine yakın olan periosteal hücrelerde, aktif kemik depolanması ve remodeling boyunca BMP-7 için pozitif boyandığını bildirildi (163). Biz BMP-7'nin tip I kollajen etkisiyle deney grubunda 1. saatte eksprese olduğunu saptadık. İlk haftada kontrol grubuna göre deney grubunda BMP-7 ekspresyonu için anlamlı farklılık saptamadık. 3. haftada kontrol grubunda osteoblastik aktivite ve immatür kemik oluşumu, deney grubundan daha fazla olduğu için BMP-7 ekspresyonunda azalmayı Jason ve arkadaşlarıyla uyumlu bulduk.

Yan Yiu Yu ve arkadaşları, BMPR-IA için 3. ve 5. günlerde periostta zayıf immünolojik boyanma tespit ederlerken, granülasyon dokusunda tespit edemediler (161). Osteoblastlarda ise 7. günden 10. güne kadar BMPR-IA immün boyanması artarken 14. günden sonra tespit edilemeyecek düzeye kadar azaldığını fark ettiler. Fakat endotel hücrelerinde 21. güne kadar tespit ettiler (161). Biz BMPR-IA ekspresyonunu 1. saatte kontrol grubunda tespit edemezken deney grubunda ekspresyon mevcuttu. Bunu uyguladığımız tip I kollajenin etkisi ile oluşan

inflamatuvar reaksiyona bağlamaktayız. Biz 1. haftada her iki grup arasında BMPR-IA ekspresyonu açısından fark saptamadık. Fakat 3. haftada deney grubunda, kontrol grubuna göre yaklaşık 2,8 kat azaldığını tespit ettik. Bu belirgin azalmayı bu dönemde kontrol grubunun iyileşmesinin daha iyi olmasına bağladık.

Yan Yiu Yu ve arkadaşları, BMPR-IB için immün boyanmayı 5. günde kondrositlerde hafif şiddetli saptamaya başlarken 7. günde hem kondrositlerde hemde osteoblastlarda maksimum ekspresyon gösterdiklerini tespit ettiler (161). BMPR-IB boyanması kondrositlerde 10. günde maksimum seviyelerini sürdürürken osteoblastlarda 10. günden itibaren azaldığını ve 21. günden sonra hem kondrositlerde hem de osteoblastlarda tespit edilemediğini bildirdiler (161). BMPR-IB ekspresyonu için anlamlı değer 1. saatte kontrol grubunda saptanamadı. Fakat deney grubunda ekspresyon mevcuttu ve bu düzeyini 1. haftaya kadar devam ettirdi. Biz BMPR-IB ekspresyonunun maksimum düzeylerini Yan Yiu Yu'dan farklı olarak ilk saatte bulduk. İlk haftada deney grubunda ekspresyonu, kontrol grubuna göre bir miktar daha fazlaydı fakat anlamlı düzeyde değildi. 3. haftada ekspresyonu azaldı ve bu seviyeyi 6. haftaya kadar devam ettirdi. Bu ekspresyon paterni BMP'lerin ekspresyon paternine benzemektedir. BMPR-IB diğer BMP reseptörleri gibi BMP'lerin etkilerini göstermelerine aracılık etmektedirler.

Yan Yiu Yu ve arkadaşları BMPR-II ekspresyonunu; 7. günde hem kondrositlerde hem de osteoblastlarda tespit ettiler ve bu ekspresyon seviyelerinin 10. güne kadar devam ettiğini bildirdiler. 14. günde ekspresyonun azaldığını ve 21. günden sonra tespit edemediklerini bildirdiler (161). Biz çalışmamızda Yan Yiu Yu'dan farklı olarak BMPR-II ekspresyonunu ilk saatte maksimum olarak bulduk. 1. haftadan itibaren azaldığını tespit ettik fakat ekspresyonları azalmakla birlikte 6. haftada bile devam etmekteydi. Yapılan bir çok çalışma BMP'ler, BMP antagonistleri, BMP reseptörlerinin eksik olduğu farelerde kemik kütleindeki orta derecedeki değişikliklerden şiddetli iskelet anormalliklerine kadar çeşitli derecelerde kemik defektlerini indüklediğini gösterilmiştir (161,164-171). BMPP-II'ninde ekspresyon paterni BMPR-IA, BMPR-IB ve BMP'lerin ekspresyon paternine benzerlik gösteriyordu. Buda BMPR'lerin BMP etkilerini ortaya çıkarmak için gerekliliğini göstermektedir.

IGFBP kemik hücrelerini de içeren çeşitli hücreler tarafından üretilirler ve IGF aktivitelerini düzenlerler. IGFBP'lerin IGF-1'in elde edilebilirliğini, bunu hedef hücreye taşıyarak ya da bağlayarak düzenlediği bilinmektedir (172). IGFBP-3 serumda en çok bulunan IGFBP olduğundan dolayı IGFBP-3 seviyelerindeki değişiklikler IGF-1'in aktivitesini değiştirebilir. Azalmış IGFBP-3 seviyeleri IGF-1'in serumda artmış tespiti ile koreledir (172). Tatsuhumi Taniguchi ve arkadaşları, IGFBP-3'ün konsantrasyonunun vakaların çoğunda kırıktan sonra hemen azaldığını ve daha sonra belli bir seviye yükseldiğini bildirdiler (172). Biz IGFBP-3 ekspresyonunun kırıktan sonra 1. saatte her iki grupta çok düşük seviyelerde olduğunu 1. haftada artış gösterip 3. haftada tekrar düşüş gösterdiğini bulduk. Bu azalmayı 6. haftada kontrol grubunda daha fazla olmakla beraber her iki grupta artış takip etti. Bunun sebebini de 6. haftada deney grubunda tamamen matür kemik ile iyileşme gösteren ratların bulunmasına rağmen kontrol grubunda tamamen matür kemik oluşumu olan ratlara rastlanmaması olarak değerlendirdik.

Takahiro Niikura ve arkadaşları, BMP-2,4,6,7'nin gen ekspresyonunu standart iyileşen kırıklar ile karşılaştırıldığında nonunionlarda kontrol zamanları boyunca belirgin olarak düşük buldular (162). BMP-2'ye dair istatistiksel farklılıkları 10., 14., 21. ve 28. günlerde gözlemladiler. En fazla değişikliği 10. günde buldular. BMP-4'e dair belirgin değişiklikleri 7., 10., 14. ve 21. günlerde gözlemlerken 7. günde maksimum değişiklik buldular. BMP-6'ya dair belirgin değişiklikleri 10., 14., 21. ve 28. günlerde gördüler. 10. günde maksimum değişiklik saptadılar. BMP-7'de 7., 10., 14. ve 28. günlerde belirgin değişiklikler bildirdiler ve maksimum değişikliği 7. günde buldular. BMP-2, 4, 6 ve 7 için gen ekspresyonu paterninin çok benzer olduğunu gözlemladiler (162). Biz BMP-2 ve BMP-4 maksimum ekspresyonunu 1. saatte saptadık. Kontrol grubuna göre deney grubunda anlamlı düzede artış mevcuttu. Biz BMP-2 ekspresyonunda kollajen uygulaması yapılan deney grubunda 1. haftaya göre 3. haftada 2,53 kat azalma saptadık ve BMP-2, 3. haftadaki değerine yakın değerleri 6. haftaya kadar devam ettirdi. Fakat kontrol grubunda BMP-2 seviyeleri 1. haftadan sonra hemen hemen aynı düzeyde devam etmekte idi. Biz Takahiro Niikura'dan farklı olarak BMP-2 ekspresyonunda maksimum artışı 1. saatte saptadık ve bu dönemden sonra 6. haftaya kadar artış göstermedi. BMP-4'de ve BMP-6'da BMP-2 gibi deney grubunda 3. haftada 3,08 kat azalış gösterirken 6. haftaya kadar

ekspresyonunda değişiklik saptanmadı. BMP-4 ve BMP-6 için kontrol grubunda haftalara göre belirgin bir artış saptamadık. BMP-7'yi ilk haftada deney grubunda kontrol grubuna göre daha düşük seviyelerde tespit ettik ve deney grubunda 3. haftada BMP-7 ekspresyonunda 1. haftaya göre 3,3 katlık bir azalma saptarken kontrol grubunda bu azalmayı saptamadık. Deney grubunda da 6. haftada ekspresyonunda ki azalmada bir miktar yavaşlama tespit ettik. Biz Takahiro Niikura gibi BMP-2 ve 4 ekspresyonunda benzer patern izledik. Fakat biz Takahiro Niikura'dan farklı olarak BMP-2 ve 4'ün ekspresyon pikini 1. saatte tespit ettik. Kırık iyileşmesinin 1. saatinde, deney grubunda pik yapan BMP-2 ve 4, 3. haftada azalırken 6. haftaya kadar seviyelerinde önemli miktarda değişiklik olmadı. BMP-7 ekspresyonu farklılık arz etmekteydi. 3. haftada kontrol grubunda daha yüksek düzeyde tespit ettik ve deney grubunda diğer BMP'ler gibi haftalarla birlikte azalma devam etti. Biz ilk saatte ki BMP gen ekspresyonlarındaki piki kollajenin etkisi olarak yorumladık. Kollajen uygulanan deney grubunun histopatolojik incelemesinde de kontrol grubuna göre iyileşmede anlamlı farklılık mevcuttu. Kollajenin kaynamayı ilk haftada arttırması BMP-2, 4 ve 6 gen ekspresyonundaki bu artışla sağladığı düşünülebilir.

Yan Yiu Yu ve arkadaşları, Smad-1 ve Smad-5 maksimum ekspresyonunu 3. günde periosteal hücrelerde, 7. günde kondrositlerde ve 10. günde osteoblastlarda saptadılar. Bu zamandan sonra hepsinde azalma olurken 14. günden sonra sadece kondrositlerde hafif derecede ekspresyon sergilediğini buldular (161). Tasima Haque ve arkadaşlarının distraksiyon osteogenezinde yaptıkları çalışmada, Smad-1 ve Smad-5 ekspresyonunu ilk haftada tespit edemediler (173). 2. haftadan itibaren Smad-1 ve Smad-5 ekspresyonunu, kondrositlerde daha fazla olmak üzere osteoblast ve fibroblastlarda tespit ettiler (173). Bu ekspresyonun 4. ve 5. haftalarda maksimum seviyeye kondrosit ve fibroblastlarda ulaştığını buldular (173). 6. haftada ekspresyonları kondrosit ve fibroblastlarda bir miktar azalırken osteoblastlarda hemen hemen aynı ekspresyon seviyelerini devam ettirdiğini buldular (173). Bizim çalışmamızda Smad-1'in maksimum ekspresyonu deney grubunda ilk saatte, kontrol grubunda ise 3. haftada oluştu. Deney grubunda 6. haftada tekrar bir miktar artış gösterdi. Bu değişimlerin hiçbiri anlamlı düzeyde değildi. Smad-5 ekspresyonunu kontrol grubunda ilk saatte, deney grubunda ise ilk haftada maksimum olarak

saptadık. Kontrol grubunda 1. ve 3. hafta ekspresyon düzeyleri benzerdi ve 6. haftada keskin bir düşüş saptandı. Deney grubunda ise 3. haftadaki düşüşü 6. haftada bir miktar artış takip etti. Bizim çalışmamızda Smad-1 ve Smad-5 ekspresyonu BMP-1 ve BMP-7 ekspresyon paterniyle uyumluluk gösterirken BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 ekspresyon paternleriyle arasında az miktarda farklılıklar mevcuttu. Ayrıca BMP reseptörlerinden BMPR-IA ile uyumlu bir ekspresyon paterni çizerken BMPR-IB ve BMPR-II ile ise uyumsuzdular. Bu sonuçlarla biz Smad-1 ve Smad-5'in BMP-1, BMP-7 ve BMPR-IA'nın etkilerinin intrasellüler düzenleyicisi olduğunu düşünmekteyiz. Nohe ve arkadaşları ile Shi ve Massague, Smad proteinlerinin BMP'nin indüklendiği sinyal yolağında bulunan major intrasellüler moleküller olduğunu bildirmişlerdir (173-175).

Thorwarth ve arkadaşları; evcil domuzların kafatasında oluşturdukları 1×1 cm'lik kemik defektlerine kollajen ve otolog kemik grefti uygulamasının BMP-2, kollajen I ve osteokalsinin ekspresyonuna etkilerini araştırmışlar (150). Thorwarth ve arkadaşları, BMP-2 ekspresyonundaki artışın 2. haftada kollajen uygulanan grupta, otolog kemik grefti uygulanan grup ve kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu buldular (150). Buna rağmen 4. ve 12. haftalarda otolog kemik grefti uygulanan grupta BMP-2 ekspresyonunun daha fazla artış gösterdiğini bildirdiler (150). Thorwarth ve arkadaşları, kollajen uygulanan grupta, BMP-2 ekspresyonunda kontrol grubuna göre 4. haftada çok az artış saptarlarken 12. haftada bu artışın bir miktar daha arttığını buldular. Biz BMP-2 ekspresyonunda tip I kollajen uygulanan grupta 1. saatte kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik saptadık. Fakat BMP-2 ekspresyonunda kontrol grubu ile deney grubu arasında örnek aldığımız 1., 3. ve 6. haftalarda anlamlı düzeyde farklılık saptamadık. Fakat kollajen uygulanan grupta BMP-2 ekspresyonunun, 3. haftada 1. haftaya göre 2,5 kat azalma gösterdiğini tespit ettik ve BMP-2 3. haftadaki ekspresyon seviyesini 6. haftaya kadar devam ettirdi. Kontrol grubunda bu değişikliği saptayamadık. Thorwarth ve arkadaşları, 4. ve 12. haftada kollajen uygulanan grupta BMP-2 ekspresyonunda artış saptarken biz sadece 1. haftada artış saptadık ve 6. haftaya kadar 3. haftadaki seviyesini koruduğunu belirledik.

Thorwarth ve arkadaşlarının çalışmasında, Tip I kollajen ekspresyonu 2. haftada kollajen uygulanan grupta bir miktar artış gösterirken 4. haftada kontrol grubuna göre daha düşük seviyelere geriledi (150). 12. haftada tekrar bir miktar artış saptadılar (150). Biz çalışmamızda Tip I kollajenin $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ zincir yapısını ayrı ayrı inceledik. Bizim çalışmamızda, ilk haftada kontrol grubuyla deney grubu arasında $coll\alpha 1$ ve $coll\alpha 2$ ekspresyonunda anlamlı fark yoktu. Fakat 1. haftada deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olmamakla beraber $coll\alpha 1$ ve $coll\alpha 2$ ekspresyonu bir miktar fazlaydı. Kollajen grubunun 1. ve 3. haftaları arasında $coll\alpha 1$ ve $coll\alpha 2$ zincirlerinin ekspresyonunda 3,8 kat azalış mevcuttu. 6. haftada ise 3. haftaya göre ekspresyonlarında anlamlı olmamakla beraber bir miktar artış saptadık. Kontrol grubunda bu değişikliklere rastlamadık. Thorwarth ve arkadaşları, 3. haftada kollajen Tip I ekspresyonunun kontrol grubunda daha fazla olduğunu tespit ettiler. Biz de 3. ve 6. haftada $coll\alpha 1$ ve $coll\alpha 2$ gen ekspresyonunu kontrol grubunda bir miktar daha fazla tespit ettik. Tip I kollajen bizim çalışmamızda kaynamayı ilk hafta indükledi ve 3. haftada histolojik incelemede defekt bölgesinde saptanmadı.

Thorwarth ve arkadaşları, kollajen uygulanan grupta osteokalsin ekspresyonunu 2. haftada kontrol grubundan farksız bulurlarken 4. haftada bir miktar, 12. haftada ise anlamlı düzeyde arttığını bildirdiler (150). Osteokalsinin, kemik matriksini oluşturduğu ve ossifikasyonda önemli bir rol oynadığı bilinir (150,176). Osteokalsinin sadece küçük bir miktarı dolaşıma salınır (150). Osteokalsinin serum konsantrasyonunun kemik oluşumunun sensitif bir göstergesi olduğunu bildirir yayınlar mevcuttur (150,177-179). Osteokalsin, kollajen tabakasında osteositlerin kalsifikasyonu ile yerine getirilen kemik oluşumundaki mineralizasyonu gösterir (150). Bundan dolayı kemik matürasyonu işlemindeki osteokalsinin ortaya çıkmasının Tip I kollajen ile geciktiği bilinir (150). Thorwarth ve arkadaşlarının çalışmasının sonuçları da bu prensip ile bağdaşmaktadır (150). Biz çalışmamızda osteokalsin ekspresyon değerlerinde, deney ve kontrol grubu arasında fark saptamadık. Fakat Thorwarth ve arkadaşlarının bildirdiği gibi Tip I kollajen uygulanan deney grubunda 6. haftaya kadar osteokalsin düzeyleri minimal de olsa kontrol grubundan daha düşüktü. 6. haftada ise minimal olacak şekilde deney grubunda daha fazla eksprese oldu. Bizde kollajenin osteokalsini baskıladığını tespit ettik. 6. haftada osteokalsin ekspresyonunun deney grubunda kontrol grubundan

yüksek olmasının nedenini ise 6. haftada deney grubunda yeni kemik oluşumunun daha fazla saptanmasına bağladık.

Meyer ve arkadaşları, genç ve yaşlı ratlarda kırık sonrası 2. haftada osteokalsin ve Tip I kollajen gen ekspresyonunda pik seviyesi saptadılar. 4. ve 6. haftalarda her iki yaş grubunda kontrol seviyelerine gerilediğini bildirdiler (180). Biz çalışmamızda osteokalsin gen ekspresyon değerlerinde hiçbir grupta anlamlı farklılık saptamadık. Fark anlamlı olmasada 6. hafta hariç kontrol grubunda bir miktar daha fazla eksprese oldu. Biz osteokalsin ekspresyonunun her iki grupta da 1. saatte maksimum olduğunu tespit ettik ve Meyer ve arkadaşları gibi 6. haftada ekspresyonda azalma tespit ettik. Fakat kontrol grubunda 1. haftadaki değerinin altına inerken deney grunda 1. hafta değerinden yüksek olarak saptadık. Coll α 1 ve coll α 2 gen ekspresyonlarını ise ilk haftada deney grubunda bir miktar yüksek saptadık ama bu anlamlı düzeyde bir yükseklik değildi. Meyer ve arkadaşlarından farklı olarak maksimum düzeylerinin ilk haftada olduğunu saptadık. 6. haftada ise ilk haftadaki değerlerinin altına indiğini tespit ettik. Coll α 1 ve coll α 2 6. haftada tekrar 3. haftaya göre bir miktar artış göstermesinin kallus oluşumu için çatı görevi görmesi dışında remodelingde de etkili olduğunu düşündürmektedir.

Meyer ve arkadaşları, BMP-2, BMP-4 ve BMPR-IA gen ekspresyonlarının kırıktan sonra 1. haftada pik yaptığını ve her iki yaş grubu için 6. haftada tespit edilemez seviyelere gerilediğini bildirdiler (180). Biz, BMP-2 ve BMP-4 ekspresyonlarını deney grubuna göre kontrol grubunda sadece 1. saatte anlamlı olarak yüksek saptadık. BMP-2 ve BMP-4 ekspresyonlarını Meyer ve arkadaşlarından farklı olarak 1. saatte maksimum olarak tespit ettik. Zamanla BMP-2 ve BMP-4 ekspresyonları azaldı. Bu azalma deney grubunda daha belirgindi. Deney grubunun 3. haftasında 1. haftasına göre BMP-2 ekspresyonunda 2,53 kat, BMP-4 ekspresyonunda 3,08 kat kadar anlamlı azalma mevcuttu. Bulgularımız Meyer ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumluydu. Fakat 1. saatte BMP-2 ve BMP-4 ekspresyonları uyguladığımız Tip I kollajen nedeniyle indüklenmişti. BMPR-IA ekspresyonunu kontrol grubunda 1. haftada, deney grubunda ise 1. saatte maksimum olarak saptadık. Tip I kollajen BMPR-IA ekspresyonunu 1.saatte ve 1. haftada

indükledi. 3. haftada ise deney grubunda kontrol grubuna göre 2,8 katlık bir azalma mevcuttu ve bu azalma anlamlı düzeydeydi.

Meyer ve arkadaşları yaptıkları çalışma sonucunda 6. haftada gen ekspresyon düzeylerinin tespit edilemeyecek kadar azaldığını buldular ve her iki yaş grubundaki bu azalmanın kırık iyileşmesinden bağımsız olduğunu bildirdiler (180). Biz de Meyer ve arkadaşlarının tespit ettiği gibi BMP-2, BMP-4 ve BMP-1A gen ekspresyonlarında 6. haftada ilk haftaya göre azalma bulduk. Fakat biz kaynamanın daha iyi olduğu deney grubunda ilk haftada ekspresyonları bir miktar daha yüksek tespit ettik. Kontrol grubunda kaynamanın deney grubuna benzer veya daha iyi olduğu 3. ve 6. haftalarda gen ekspresyonlarını bir miktar daha yüksek tespit ettik. Bu yükseklikler 3. haftadaki BMP-1A geni dışında anlamlı düzeyde olmamasına rağmen defekt iyileşmesi ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Rasubala ve arkadaşları, mandibula kırığının iyileşmesi sırasında 1. haftada PDGF- β ekspresyonunu, ağı kemiği çevreleyen hücrelerde ve kondrositlerde yoğun olarak tespit etmelerine rağmen 3. haftada PDGF- β ekspresyonu tespit edemediler (181). Biz çalışmamızın 1. saatinde kontrol grubunda PDGF- β ekspresyonunda anlamlı değer saptayamadık. Deney grubunda ise 1. saatte maksimum ekspresyon saptandı. Çalışmamızın ilk haftasında PDGF- β ekspresyonunda deney ve kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu. 1. saatten sonra PDGF- β ekspresyon seviyeleri giderek azaldı. Bu azalma deney grubunda daha fazlaydı. Bu yüzden deney grubunun 3. haftasında 1. haftasına göre PDGF- β ekspresyonunda 2,1 kat ve 6. haftasında 1. haftasına göre 3,03 kat azalma mevcuttu. Siegbahn ve arkadaşları PDGF- β 'nin yara iyileşmesiyle ilgili bir prototip stokin olduğu ve kemotaktik bir etki gösterdiğini bildirdiler. Dolaşımdaki trombositlerde depolandığını ve yaralanma bölgesinde trombosit degranülasyonu sırasında salındığını bildirdiler (181,182). Rasubala ve arkadaşları kırık iyileşmesinin orta evresinde PDGF- β ekspresyonunu yeni oluşan ağı kemiği çevreleyen osteoblastlarda ve kırıkdağımsı kallusdaki kondrositlerde belirlediler. Bundan dolayı PDGF- β 'nin osteoblastlar ve kondrositlerin proliferasyonu üzerinde kuvvetli bir etkisi olduğunu ve aynı zamanda hücrelerin kemotaksisini uyarmada önemli bir role sahip olduğunu düşündüler. 1. saatte PDGF- β 'nin deney grubunda eksprese olmasını uyguladığımız tip I kollajenin kemotaktik

etkisi ile olduğunu düşünmekteyiz. Biz ilk haftada, deney grubunda osteoblastik aktivitenin ve yeni kemik oluşumunun daha fazla olmasına rağmen PDGF- β ekspresyon seviyelerinin deney ve kontrol grubunda benzer olmasını, trombositlerde depolanan PDGF- β 'ların ortama salınması nedeniyle olduğunu düşünmekteyiz. 3. haftada deney grubundaki hızlı düşüşün sebebini ise osteoblastik aktivite ve yeni kemik oluşumunun kontrol grubunda daha iyi olmasına bağladık veya deney grubunda PDGF- β 'nın daha fazla azalması nedeniyle 3. haftada iyileşmeyi kontrol grubunda daha ileri olarak saptadık. 6. haftada ise defektlerin hemen hemen tama yakın iyileşmesi nedeniyle PDGF- β seviyelerinde azalma tespit ettik.

Shinji Kuroda ve arkadaşlarının rat femurlarında yaptığı çalışmada Tip I kollajen ekspresyonunun 5. ve 14. günlerde maksimuma ulaştığını, osteokalsin seviyesinin ise ilk günlerde bir miktar azalma gösterdiğini fakat daha sonra kontrol grubuna yakın değerler sergilediğini buldular (183). Aynı çalışmada TGF- β 1 gen ekspresyonunun 1. haftada pik yaptığını 14. güne kadarda artış gösterdiğini, TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün 14. günde pik yaptığını, TGF- β R1'in 1. haftada kuvvetli şekilde arttığını ve TGF- β R2'nin 10. günde pik yaptığını buldular (183). Biz çalışmamızda TGF- β 1 ekspresyonları 1. saatte her iki grupta minimaldi. TGF- β 1'in en yüksek değerini 1. haftada saptadık ve deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olmamakla birlikte bir miktar daha fazla ekspresyon belirledik. TGF- β 2 ve TGF- β 3 ekspresyonları için 1. saatte anlamlı değerler saptanamadı. TGF- β 2 ve TGF- β 3 için ise Shinji Kuroda'dan farklı olarak deney grubunda ekspresyonlarını 1. haftada maksimum olarak saptarken kontrol grubunda 3. haftada maksimum seviyeye ulaştığını gördük. Bu sonuçlar doğrultusunda biz TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 genlerinin osteoblastik aktivitenin düzenlenmesi, hücre göçü ve kondrogenezi düzenlediğini düşünmekteyiz. Tip I kollajeninde bu genleri bir miktar indüklediğini fakat bunun kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde olmadığını tespit ettik.

Shinji Kuroda ve arkadaşları gibi biz de TGF- β R1'in ekspresyonunun deney grubunda 1. haftada maksimuma ulaştığını saptarken kontrol grubunda maksimum seviyeye 3. haftada ulaştığını gördük. Deney grubunda 3. ve 6. hafta ekspresyon düzeyleri hemen hemen aynı seviyeydi. TGF- β R2'nin ekspresyonunun Shinji

Kuroda ve arkadaşlarından farklı olarak 3. haftada maksimum seviyeye ulaştığını hem deney hemde kontrol grubunda saptadık.

TGF- β 'ların 7.gündeki bütün izoformlarının ekspresyonlarında artış olması, bunların osteogenezdeki rolünü destekler (183). TGF- β RI ekspresyonu 7. günde TGF- β 1 ve TGF- β 2 ile eş zamanlı olarak pik yapar, oysaki TGF- β RII, tüm TGF- β izoformlarının bazal değere ulaştığı 10. güne kadar pik yapmaz. Profildeki bu fark kemik rejenerasyonundaki farklı evrelerde TGF- β için farklı sinyal transdüksiyon yolları olduğunu gösterebilir (183). Bizim çalışmamızda, normal defekt iyileşmesi Shinji Kuroda ve arkadaşlarının bulgularından farklı olarak TGF- β 'ların tüm formlarının kontrol grubunda 3. haftada pik yapması normal iyileşmede osteogenezin 3. haftada olduğunu düşündürdü. Deney grubunda ise TGF- β 'ların tüm formlarının 1. haftada pik yapması kollajenin bu gen grubunun ekspresyonunu indüklediğini düşündürmektedir. Shinji Kuroda'nın TGF- β reseptörleri ile ilgili hipotezini bizim çalışmamız desteklemektedir.

Shinji Kuroda ve arkadaşları çalışmalarında IGF-1'in 1. haftada pik yaptığını ve bu artışın 14. güne kadar devam ettiğini saptadılar (183). Biz çalışmamızda IGF-1 ekspresyonunu deney grubunda 1. saatte maksimum olarak saptadık. Kontrol grubunda 1. saatte anlamlı değer saptayamadık. Bu Shinji Kuroda ve arkadaşlarından farklıydı. Fakat biz 6. haftaya kadar deney grubunda daha fazla miktarda olmak üzere IGF-1 ekspresyonunda azalma tespit ettik. IGF-1'in 1. saat ve ilk haftada deney grubunda ekspresyonundaki artış, IGF-1'in hem osteogenezde etkili olduğunu hem de osteoblastlar için kemotaktik olduğunu düşündürdü ve Tip I kollajenin bu etkiyi arttırdığı kanaatindeyiz. 3. ve 6. haftalarda kontrol grubunda deney grubuna göre daha yüksek olmasını da bu dönemde yeni kemik yapımının kontrol grubunda daha fazla olmasına bağladık.

Takahiro Niikura ve arkadaşları, standart iyileşme gösteren kırıklarda Gdf-5'in 7. günde pik yaptığını ve zamanla azalma gösterdiğini tespit ettiler (162). Biz de Takahiro Niikura ile uyumlu olarak Gdf-5 ekspresyonunu her iki grupta ilk haftada maksimum seviyede tespit ettik ve 6. haftaya kadar ekspresyonun giderek azaldığını gördük. Gdf-5; kırıkta morfogenetik protein olarak tanımlanıp (162,184) BMP

familyasının alt gruplarında sınıflandırılır. Gdf-5'in, mezenkimal yoğunlaşmada ve kondrogenezi stimüle etmede önemli bir rol oynadığı bilinir (162). Gdf-5'in normal kırık iyileşmesinde erken dönemde önemli olduğu düşünülebilir. İlk haftada Gdf-5 ekspresyonunun kollajen uygulanan grupta bir miktar fazla olmasını uyguladığımız Tip I kollajenin etkisi olarak düşündük. Çünkü ilk haftada defektlerdeki iyileşmeyi ve kırık oluşumunu kollajen uyguladığımız grupta daha iyi olarak bulduk. Bizim çalışmamızda 3. haftadaki kırık oluşumu deney grubunda daha fazla olmakla birlikte Gdf-5 ekspresyonu kontrol grubunda deney grubuna göre daha yüksekti. 6. haftada kırık oluşumuna her iki grupta da rastlanmamasına rağmen Gdf-5 ekspresyonunun devam etmesi nedeniyle biz Gdf-5'in osteogenezde de etkili bir gen olduğunu düşünmekteyiz.

Uchida ve arkadaşları rat femurlarında yaptıkları çalışmada 5. günde Aktivin- β A ve Aktivin-A için immünoaktiviteyi periost ve osteoblastlarda tespit etmişler. Aktivin-A için immünoaktivitede artışın 7. güne kadar arttığını ve 7. günden sonra 11. güne kadar aşamalı olarak azaldığını bildirmişlerdir (185). Ayrıca Aktivin bağlayıcı bir protein olan follistatin ekspresyonunu 3. günde periost ve endostiumdaki osteoprogenitör hücrelerde az olarak tespit ettiler (185). Bununla birlikte 5. günde follistatinin immünoaktivitesinin periosttaki progresif kemik oluşumuyla sayısal olarak kademeli bir şekilde arttığını bildirdiler (185). Uchida ve arkadaşları Acvr-II ve Acvr-II β 'nin mezodermal hücre farklılaşmasında görev aldığını düşünmüşler (23). Rat femurunda kırık kallusunda intramembranöz kemik oluşumunun erken evrelerinde osteoblastların her iki Acvr-I (Aktivin Tip I Reseptör) ve Acvr-II ekspresyonunu göstermişlerdir (185). Uchida ve arkadaşları, çalışmalarında çoğalmakta olan osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara dönüşmeden önce geçici olarak Aktivin-A üretilip salgılandığını göstermişlerdir (185). Aktivinin kemik iliği kaynaklı kültürlerde osteoklastların oluşumunu uyardığına dair ve bu kültürlerde Aktivinin, inhibin ile veya çözülebilir reseptör antagonistleriyle inhibisyonunun osteoklastogenezini yeniden düzenlediğine dair pek çok kanıt vardır (185-187). Aktivinin osteoblastlar üzerindeki etkisi literatürdeki çeşitli çelişkili yayınlar ile çok açık değildir. Wiater ve arkadaşlarının Aktivinin osteoblastogenez üzerinde pozitif bir etkisi olduğunu gösteren çalışmaları vardır (188). Fakat Eijken ve arkadaşlarının son yıllardaki çalışmaları Aktivinin osteoblast kaynaklı

mineralizasyonu inhibe ettiği kanıtını destekler ve bu inhibisyonun bir Aktivin antagonisti olan follistatin ilave edilerek tersine döndürüldüğünü bildirdiler (189). Sakai ve arkadaşları tarafından Aktivinin, vahşi hayvanlarda kemik oluşumunu direk olarak stimüle ettiği ve Aktivinin kırık bölgesine direkt uygulanmasının kallus oluşumunu, iyileşmeyi ve kemik gücünü arttırdığı bunun ise kemik oluşumu üzerinde direk bir uyarıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir (190). Aktivinin kemik kütleline negatif potansiyel düzenleyici etkisi ile ilgili bilgiler kemik metabolizmasında inhibinin rolünü araştıran çalışmalar tarafından desteklenir (185,191). Perrien ve arkadaşları Aktivin ve Acvr-II α reseptörlerini bloke eden inhibinin, transgenik aşırı ekspresyonunun kemik kütlelerinde ve gücünde dramatik bir artış ile sonuçlandığını bildirmişlerdir (191). Bizim çalışmamızda Acvr-II α , kontrol grubunda ilk haftada maksimum eksprese olurken 3. haftada azalıp 6. haftaya kadar bu seviyesini korudu. Deney grubunda ise tam tersi ilk üç hafta hemen hemen aynı ekspresyon seviyesini gösterirken 3. haftadan sonra artış göstererek 6. haftada maksimum seviyeye ulaştı. Follistatin ise ilk haftada deney grubunda biraz daha fazla olmakla beraber maksimum ekspresyon gösterdi. 3. ve 6. haftalarda ekspresyonu kademeli olarak azaldı. Bu azalma deney grubunda anlamlı düzeydeydi. Bizim bulgularımız Eijken ve Perrien'nin bulgularına benzemektedir. Biz de Acvr-II α 'nın, 6. haftada ekspresyonunun artması nedeniyle osteogenezin bir inhibitör düzenleyicisi olduğunu düşünmekteyiz. Kontrol grubundaki ilk haftadaki artışı osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara dönüşmeden önce salgıladığı Acvr-II α 'ya bağladık. Aynı şekilde follistatinde Aktivinin düzenleyici proteini olarak görülmektedir. Deney grubundaki anlamlı düzeydeki azalmayı ise deney grubunun ilk haftasında kemik iyileşmesinin daha iyi olmasına bağlı olarak kontrol grubundan daha fazla eksprese olmasına bağladık.

IL-1, IL-6 ve TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alfa); makrofajlar, enflamatuvar hücreler ve mezenkimal kaynaklı hücreler tarafından salgılanırlar. Kon ve arkadaşları IL-6 ekspresyonunun ilk 24 saat içerisinde zirve yaptığını ve 3. günde tespit edilemeyecek seviyelere kadar hızlı bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir (192). Cho ve arkadaşları Kon'nun bulgularına benzer çalışma sonuçları bildirmişlerdir (193). Gerstenfeld ve arkadaşları ise IL-1 ve IL-6'nın ekspresyonunun Kon ve Cho gibi ilk 24 saat arttığını ve 3. günde azaldığını bildirirken IL-6 ekspresyonunun sekonder

kemik oluşumu sırasında kemik remodelizasyonu ile birlikte tekrar arttığını bulmuşlardır (194). AI-Aql ve arkadaşları, IL-6 ekspresyonunu kırık iyileşmesinin tamamı boyunca bulmuşlardır (195). Biz çalışmamızda IL-6 pikini deney grubunda 1. saatte, kontrol grubunda ise 3. haftada saptadık. Biz deney grubunda IL-6 ekspresyonunu Gerstenfeld'in bulgularıyla uyumlu olarak 3. haftadaki azalmayı takiben 6. haftada kırığın remodele olup lameller kemiğin olduğu dönemde tekrar arttığını belirledik. Kontrol grubunda ise 3. haftadaki pik ekspresyondan sonra 6. haftada, 1. haftadaki değerinde altına indiğini tespit ettik. Fakat 6. haftadaki IL-6 düzeyleri kontrol ve deney grubunda birbirine çok yakın değerlerdi. IL-6 salgılanmasının mezenkimal öncü hücrelerin osteoblastik seviyeye doğru farklılaşmasını uyardığı bulunmuştur (83,196). IL-6; vasküler invazyon, kırıkta matrisinin yıkımı ve osteoblast farklılaşması ile kallusun mineralizasyonu ve olgunlaşması için önemlidir. IL-6'nın yokluğu bu işlemleri geciktirebilir. Biz çalışmamızda deney grubunda ilk haftada kontrol grubuna göre daha fazla osteoblastik aktivite varlığı nedeniyle IL-6 ekspresyonunu daha fazla tespit ettik. Yine kontrol grubunda 3. haftadaki pikin bu nedene bağlı olduğunu düşünmekteyiz. IL-6'nın 6. haftada deney grubunda tekrar bir artış göstermesini deney grubundaki 2 ratta lameller kemik oluşumunu görmemiz olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü IL-6, ağsı kemiğin osteoklastik rezorpsiyonu, kallusun remodelizasyonu ve olgunlaşması için gereklidir. IL-6'nın yokluğunda bu olayların ikisinde de gecikme olduğu ve muhtemelen osteoklastların sayısındaki azalmanın bu bulgulara katkıda bulunduğu Xu Yang ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (83).

Katri Koli ve arkadaşları, hücre kültürlerinde Ltbp-1 ve Ltbp-3'ün farklılaşmamış hücrelerde bol miktarda eksprese olduğunu buldular (197). Ayrıca TGF- β 'larla ilişkili olmayan Ltbp-2'nde Kitahama ve arkadaşları gibi yüksek seviyelerde eksprese olduğunu buldular (197,198). Ltbp-4 ekspresyonunda düşük olarak belirleyip uzun kültür döneminden sonra bu şekilde kaldığını bildirdiler. Mezenkimal kök hücrelerinde TGF- β 1 mRNA'nın yüksek seviyelerde ekspresyonunu gördüler. TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün ekspresyon seviyelerini ise düşük buldular. Katri Koli ve arkadaşları bu sonuçların TGF- β 1'in Ltbp-1 mezenkimal kök hücrelerinde latent TGF- β komplekslerinin major havuzunu yansıttığını bildirmişlerdir. 2 haftalık kültürlerde TGF- β 2 ekspresyonunda bir artış gördüler fakat

bu değişikliği istatistiksel olarak belirgin bulmadılar (197). TGF- β 3 mRNA seviyelerinin farklılaşmanın indüksiyonundan 2 hafta sonra dramatik olarak azaldığını fakat Ltbp-1 ve Ltbp-2 seviyelerinin değişmemiş olarak kaldığını bildirdiler. Katri Koli ve arkadaşları bu değişikliklerin farklılaşmanın matriks olgunlaşma fazı ile ilişkili olduğunu ve bunların muhtemelen salgılanan TGF- β komplekslerinin yapısını değiştirdiğini düşündüler (197). Todorovic ve arkadaşları da Ltbp-1, Ltbp-2 ve Ltbp-4'ün ekstrasellüler matriksin bir bileşeni olduğunu ve eksikliklerinde TGF- β 'nın çökmesinde azalmaya neden olduğunu bildirdiler (199). Sterner-Kock ve arkadaşları da Ltbp-4'ün ekstrasellüler matriksin yapısal bir bileşeni olduğunu ve TGF- β 'nın dokuda depolanması ile biyoyararlılığının lokal bir düzenleyicisi olarak rol aldığını bulmuşlardır (200). Biz çalışmamızda deney grubunda Ltbp-2 ve Ltbp-4 ekspresyonunun maksimum seviyelerini ilk haftada saptadık. Ltbp-1'in maksimum ekspresyonu 3. haftada meydana geldi. Ltbp-1 ekspresyonu 6. haftada 1. haftaya göre daha yüksekken Ltbp-2 ve Ltbp-4 seviyeleri 3. haftada azalma gösterdi ve 6. haftaya kadar bu seviyelerini korudu. Ltbp-1 ekspresyonuyla TGF- β 1 ekspresyonu diğer çalışmalardaki gibi ters ilişki gösterdi. TGF- β 1 ekspresyonu ilk haftada maksimum iken Ltbp-1 artışı ile 3. haftada azaldı ve 6. haftadaki Ltbp-1 düşüşüyle tekrar bir yükselme gösterdi. Biz de Katri Koli, Todorovic ve Sterner-Kock gibi Ltbp'lerin TGF- β 'ların bağlayıcısı ve ekspresyonlarının bir düzenleyicisi olduğunu düşünmekteyiz.

Ying Peng ve arkadaşlarının BMP ile indüklenmiş osteoblast farklılaşmasında Id proteinlerinin fonksiyonel rolünü belirlemek için yaptıkları çalışmalarında Id-1, Id-2 ve Id-3 genlerinin ekspresyonunun BMP-9 uyarılmasının erken evresinde indüklendiğini ve uyarıdan 3 gün sonra bazal seviyelere geri döndüğünü gösterdiler (201). Id genlerinin aşırı ekspresyonunda BMP-9 tarafından başlatılan osteoblast farklılaşmasını inhibe ettiğini bildirdiler (201). Id genlerinin erken osteoblast progenitör hücrelerinin çoğalmasını desteklemede önemli rol oynayabileceğini ve bu Id ekspresyonunun osteoblastların son dönemdeki farklılaşması sırasında azalmış olabileceğini gösterdiler (201). Ying Peng ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu olarak yayınlanan çeşitli bildiriler Id genlerinin TGF- β ve BMP sinyallerinin etkisi yönündeki hedefleri olabilirler (201-206). April ve arkadaşları ise Id-1 eksikliği olan farelerle yaptıkları çalışmada; kemik hacminde, kemik mineral içeriğinde, kemik

mineral yoğunluğunda, trabeküler kalınlıkta ve kemik iliği alanında belirgin azalmalar olduğunu buldular (207). Bizim çalışmamızda; Id-1 geni hem deney hem de kontrol grubunda maksimum seviyeye 3. haftada ulaştı ve kontrol grubunda deney grubuna göre daha fazla eksprese oldu. Hatta kontrol grubunun 1. haftası ile 3. haftası arasında anlamlı düzeyde artış mevcuttu. Biz Ying Peng ve arkadaşlarından farklı olarak Id-1 genini osteoblast farklılaşmasında değilde kemik mineralizasyonun başında ve özellikle ağı kemik oluşumunun başladığı dönemde yüksek olarak saptadık. Biz, April ve arkadaşları gibi Id-1 geninin daha çok kemik mineralizasyonu ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz.

Jochen Hecht ve arkadaşları, Serpine-1'in kırıktan sonra 7. ve 10. günlerde belirgin ve aşırı bir şekilde eksprese olduğunu bulmuştur (208). Koide ve arkadaşları çalışmalarında, Serpine-1'in kollajen moleküllerinin olgunlaşmasında yer aldığını bulmuşlardır (209). Shroff ve arkadaşları bunun kemik gelişimi için önemli olduğunu bildirmişlerdir (210). Tiffée ve arkadaşlarının Serpine-1'in ratlarda femur ve tibianın gelişiminde, Tip I kollajen üretiminin olduğu bölgelerde yerleştiğini bildirir yayınlarında bunu desteklemektedir (211). Charles ve arkadaşları Serpine-1 eksikliği olan farelerde yaptıkları çalışmada, Serpine-1 eksikliğinin erken kallus oluşumunu ve remodelingi arttırırken, kırığın bütün iyileşmesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadığını buldular. Charles, Serpine-1 eksik olan kallusları kontrol grubuyla karşılaştırdığında kırıktan sonraki 14. günde kırık kallusunda kırık oluşumunun arttığını gözlemledi (212). Artmış kallus kırıkdağı ve kemiği olmasına rağmen kırık gapinde artmış kemik kaynaması için herhangi bir histolojik kanıt bulamadı. Serpine-1 eksikliğinin iyileşmeyi hızlandırmadığını bildirdi (212). Kemik büyümesinde Serpine-1'in etkileri için kanıtlanmış iki genel mekanizma vardır: 1) Serpine-1 ekstrasellüler matriksin proteolitik sürecini düzenler. Bu şekilde kemik oluşumu ve remodeling için aktif büyüme faktörlerinin salınımını düzenler (212-216). 2) Serpine-1, vitronektin olan reseptörüne bağlanarak hedef hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını düzenler. Plazmin sisteminin proteolitik fonksiyonları aynı zamanda kırık tamiri için önemli olan büyüme faktörlerini salgılayabilir. Bunlar, TGF- β (213) ve FGF-2 (214) gibi ekstrasellüler matriksde saklanırlar veya IGF'ler gibi spesifik inhibitör faktörlere bağlanırlar (215,216). Biz çalışmamızda Serpine-1 maksimum değerini 1. saatte saptadık. Kontrol grubunda 1. saatte anlamlı değer saptayamadık.

Deney grubunda 1. saate göre 1. haftada ve 1. haftaya göre 3. haftada anlamlı düzeyde azalma varken 3. haftadan 6. haftaya kadar aynı seviyede eksprese oldu. Kontrol grubunda 1. haftaya göre 3. haftada azalma mevcuttu fakat bu anlamlı düzeyde değildi ve 6. haftada da 3. haftadaki değerine yakın değerler sergiledi. Bizim sonuçlarımız Jochen Hecht, Koide ve Charles sonuçlarına benzerdi ve onların hipotezlerini desteklemekteydi.

Jochen Hecht ve arkadaşları Col3 α 1'in kırıktan sonraki 7. ve 10. günlerde aşırı eksprese olduğunu göstermişlerdir (208). Col3 α 1'in 7. ve 10. günlerde yüksek seviyede eksprese olmasına rağmen 14. günde ekspresyonunda kuvvetli bir düşüş saptamışlardır (208). Paralkar ve arkadaşları Col3 α 1'in anjiogenezde rolü olduğunu bildirmişlerdir (208). Jochen Hecht'in bulguları Paralkar'ın hipotezini desteklemekte ve Anstrom'un bulgularıyla da örtüşmekteydi (217). Biz çalışmamızda Col3 α 1 ekspresyonunu her iki grupta ilk haftada maksimum olarak tespit ettik. 3. haftada deney grubunda daha fazla olmakla birlikte her iki grupta da azalma olurken 6. haftada tekrar bir miktar artış gözlemlendi. Bu artış deney grubunda daha fazlaydı. Biz çalışmamızda, vasküler invazyonu deney grubunda 1. ve 3. haftalarda aynı düzeyde bulurken Col3 α 1 seviyesini düşük saptadık. 3. haftada deney grubunda vasküler invazyon seviyesini yüksek bulup kontrol grubunda Col3 α 1 seviyesini yüksek saptadık. 6. haftada vasküler invazyonun her iki grupta da 3. haftaya göre daha az olduğunu ve Col3 α 1 ekspresyonunun 3. haftaya göre daha yüksek olduğunu saptadık. Bu sonuçlara göre Col3 α 1'in anjiogenezle ilişkili olmadığını düşündük. Col3 α 1 geninin osteoblast farklılaşmasında veya aktivitesindeki artışla ilişkili olabileceğini ve kırık iyileşmesi sırasında ilk haftada oluştuğunu sonra azalıp remodeling sırasında tekrar oluştuğunu düşünmekteyiz.

Jochen Hecht ve arkadaşlarının çalışmasında anjiogenezde rolü olduğunu düşündükleri endoglinin ekspresyonunun 7. günde kuvvetli olduğunu, 10. ve 14. günlerde daha az eksprese olduğunu bildirmişlerdir (208). Lebrin ve arkadaşları TGF- β ailesinin yardımcı reseptörü olan endoglinin anjiogenez ve kalp gelişimi için önemli olduğunu bildirmişlerdir (218). Biz endoglinin maksimum ekspresyonunu deney grubunda 1. saat ve 6. haftada, kontrol grubunda ise 3. haftada saptadık. Kontrol grubunda haftalar arasında endoglin ekspresyonunda fazla miktarda değişim

saptamamamıza rağmen deney grubundaki 1. haftadaki azalma ve 6. haftadaki artış önemli miktarlardaydı. Biz vasküler invazyonla endoglin ekspresyonu arasında bağlantı kuramadık. Endoglinin daha çok inhibitör veya düzenleyici bir gen olduğunu düşünmekteyiz.

Jochen Hecht ve arkadaşlarının çalışmalarında, Cst-3 gen ekspresyonunun son kontrol döneminde (kırıktan sonraki 42. gün) zirve yaptığını buldular (208). Brage ve arkadaşları gibi Jochen Hecht de Cst-3'ün kemik rezorpsiyonunu ve osteoklast oluşumunu inhibe edebileceğini düşündü (219). Osteoklast aktivitesi erken başlar ve kırık iyileşmesi devam ettikçe artar (208,220). Cst-3'ün bu zaman diliminde osteoklastların düzenlenmesi için önemli olabileceği tartışılabilir. Biz çalışmamızda Cst-3'ün maksimum ekspresyonunu her iki grupta da 3. haftada tespit ettik. 1. haftada her iki grupta da hemen hemen aynı seviyede olan Cst-3, 3. ve 6. haftalarda deney grubunda daha yüksek miktarlarda eksprese oldu. Her iki grupta da 6. haftada 3. haftaya göre daha düşük fakat 1. haftaya göre daha yüksek ekspresyon paterni izlendi. Biz de osteoklastların daha aktif oldukları kırıkta immatür kemiğe geçiş döneminde ve immatür kemikten lameller kemiğe dönüşümün olduğu dönemde Cst-3 ekspresyonunu fazla bulduk. Biz de Jochen Hecht ve Brage gibi Cst-3'ün osteoklastik aktivitenin bir düzenleyicisi olduğunu ve remodelingle ilgili olabileceğini düşünüyoruz.

Ying Peng ve arkadaşları, Cdkn1a gen ekspresyonunu endokondral kemikleşme sırasında inceledikleri çalışmada kırık olmayan femurlarda tespit edilemeyecek düzeyde buldular (221). Kırıktan sonra Cdkn1a ekspresyonunda bir dizi değişiklik tespit ettiler. Cdkn1a ekspresyonunun 4. ve 14. günler arasında aşamalı olarak arttığını, özellikle 7 ila 14. günler arasında en fazla artış oranı gösterdiğini ve 14 ila 21. günden sonra hızlı bir şekilde azaldığını buldular (221). Ying Peng ve arkadaşları kırık tamirinde ve endokondral kemikleşme sırasında hipertrofik kondrositlerin apoptozunun, kırıkta kemik ile yer değiştirmesi işleminde temel olay olduğunu düşündüler. Cdkn1a'nın, kondrositlerin büyüme ve apoptozunu düzenlediğini bildirdiler (221). Bu işleminde FGFR-3 uyarılarına yanıt ile yapıldığını bildirdiler (221). Su ve arkadaşları da (222) aktive olan FGFR-3 sinyalinin Cdkn1a'nın ekspresyonunu indüklediğini ve kondrositlerde büyümenin

durmasına neden olduğunu gösterdiler. Biz çalışmamızda Cdkn1a gen ekspresyonunu her iki grupta ilk haftada maksimum olarak tespit ettik. Kontrol grubunda 6. haftaya kadar aşamalı olarak düşüş gösterirken deney grubunda 3. haftada hızlı bir düşüşü takiben 6. haftada bir miktar artış gösterdi. Biz de Ying Peng ve Su gibi kıkırdak oluşumunu en fazla tespit ettiğimiz 1. haftada Cdkn1a ekspresyonunda maksimum olarak tespit ettik. Özellikle kıkırdak oluşumunun 6. haftada kontrol grubunda neredeyse minimal olarak tespit etmemiz ve kontrol grubunda Cdkn1a ekspresyonunda bununla uyumlu azalması Cdkn1a'nın kıkırdak hücrelerinin apoptozunu indükleyerek kondrositlerin büyümesini inhibe ettiğini desteklemektedir.

SONUÇ

Kemik defektlerini tedavisinde ortopedistler tarafından pek çok yöntem ve materyal kullanılmıştır. Günümüzde otolog kemik greftleri tedavide altın standart olmaya devam etmektedir. Otolog kemik greftlerinin dezavantajları nedeniyle yeni materyal arayışları günümüzde ortopedistlerin birçoğunun araştırma konusu olmaktadır. Bu amaçla tip I kollajenin osteogeneze spesifik genlere ve kemik iyileşmesine olan etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, kemik defekti histopatolojik incelenmiş ve periferik kandan mikroarray yöntemi ile 42 adet gen izole edilerek irdelenmiştir.

Histopatolojik değerlendirmede Huo sınıflaması ve inflamasyon (hücre tipi ve yoğunluğu, granülasyon gelişimi, vaskülarite), konnektif doku gelişimi (fibroblast proliferasyonu), osteogenez (kıkırdak gelişimi, osteoblastik aktivite, yeni kemik oluşumu) ve yabancı cisim reaksiyonu değerlendirildi. Deney ve kontrol grubu arasında sadece 1. haftada Huo sınıflamasında deney grubu lehine anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0,027$). İnflamasyon, konnektif doku gelişim, osteogenez ve yabancı cisim reaksiyonu açısından gruplar arasında farklılık bulunmasına rağmen değerlendirmenin hiçbir safhasında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tip I kollajen sadece 1. haftada gap iyileşmesinde anlamlı iyileşme sağladı. 3. haftadaki değerler kontrol grubunda daha iyi olarak değerlendirildi. Fakat 6. haftada ise Huo sınıflamasına göre deney grubunun lehine anlamlıya yakın iyileşme mevcuttu ($p=0.053$).

Tip I kollajen histopatolojik olarak kemik defektlerinin tedavisinde erken dönemde etkili olarak görülmektedir. Erken dönemdeki bu etkisinin oluşturulan defekt bölgesinde inflamasyonu arttırması, kırık hematomu için iskelet oluşturması, osteoprogenitör hücreler için kemotaktik olması ve defekt bölgesine göç eden hücre ve büyüme faktörlerini bağlayabilmesi nedeniyle ilk haftada yani kırık iyileşmesinin enflamatuvar fazı sırasında etkili olduğunu düşünmekteyiz.

İzole edilen genlerden, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, TGF- β RII, Smad-1, IL-6, BMPR-IA, BMPR-IB, Eng, BMPR-II, c-fos,

Cdkn1a, Chrd, Gdf-5, Id-1, PDGF- β , IGF-1, Serpine-1, TGF- β RI deney grubunda kontrol grubuna göre 1. saatte tip I kollajenin etkisiyle daha fazla eksprese oldu. Özellikle kırık iyileşmesinde etkili olduğu düşünülen ve tedavide yer bulan BMP'lerin ekspresyonunda 1. saatte tip I kollajen etkili olarak görülmekteydi. 1. saatteki bu etkinin kollajenin hangi özelliğine bağlı olarak geliştiği tam olarak bilinmemektedir. Aynı etki 1. haftada saptanamamıştır.

Literatürde kollajenin kemik defektlerinin tedavisindeki sonuçları tartışmalıdır. Özellikle ortodontistler tarafından yapılan çalışmalarda yüz güldürücü sonuçlar saptanırken ortopedistler tarafından yapılan çalışmalarda aynı sonuçlara rastlanmamaktadır. Bu yüzden ortopedistler tek başına tip I kollajen uygulama yerine özellikle otojenik ve allojenik kemik greftlerinin veya BMP ve TGF- β gibi osteojenik farklılaşmayı indükleyen materyallerin tip I kollajenle birlikte uygulanmasını önermektedir. Bizim çalışmamızın sonucunda, tip I kollajenin tek başına kemik defektlerinin tedavisinde uzun dönemde (6. haftada) kontrol grubuyla arasında anlamlı fark saptanamamıştır.

Bu amaçla tip I kollajen miktarı artırılarak veya diğer osteoindüktif ve osteokondüktif materyallerle birlikte uygulanması ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

ÖZET

Günümüzde Ortopedi ve Travmatoloji kliniklerinin başlıca uğraş konularından birisi kemik defektlerinin tedavisi oluşturmaktadır. Bu amaçla pek çok materyal ve tedavi metodu araştırılmış ve araştırılmaya devam etmektedir. Biz de çalışmamızda kemikte ana kollajen olan tip I kollajenin kemik defektlerine ve osteogeneze spesifik genlere olan etkisini rat kemik defekti modelinde araştırdık.

Bu amaçla çalışma 56 adet Sprague dawley tipi dişi rat üzerinde yapıldı. Ratların sağ femur shaftının ½ orta medial bölgesinde yaklaşık 2 mm.'lik defekt oluşturuldu. Ratlar eşit miktarda olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Deney grubunun defektli bölgesine rat kaynaklı tip I kollajen uygulandı ve kontrol grubunda ise defekt oluşturulan bölge boş bırakıldı.

Her gruptan 7 adet rattan cerrahi sonrası 1. saatte, 1. haftada, 3. haftada ve 6. haftada sakrifiye edilmeden önce intrakardiyak olarak 1 cc kan alındı. Ratların femurları histopatolojik inceleme için bütün olarak çıkartıldı. Histopatolojik değerlendirmede Huo sınıflaması, inflamasyon, konnektif doku gelişimi, osteogenez ve yabancı cisim reaksiyonu değerlendirildi. Sadece 1. haftada Huo sınıflamasına göre deney grubunda anlamlı değişiklik tespit edildi ($p=0,027$). Diğer parametreler ve diğer haftalarda histopatolojik olarak anlamlı değişiklikler saptanmadı.

Alınan kanlardan cDNA izolasyonu sonrası mikroarray yöntemi ile 42 adet osteogeneze spesifik gen değerlendirildi. 1. saatte deney grubunda BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, TGF- β RII, Smad-1, IL-6, BMPR-IA, BMPR-IB, Eng, BMPR-II, c-fos, Cdkn1a, Chrd, Gdf-5, Id-1, PDGF- β , IGF-1, Serpine-1, TGF- β RI gen ekspresyonlarında anlamlı artış saptandı. 1. haftadaki karşılaştırmada hiçbir gende anlamlı değişiklik saptanmadı. 3. haftadaki incelemede deney grubunda kontrol grubuna göre BMP-7, BMPR-IA, c-fos genlerinde anlamlı azalma saptandı. 6. haftada yapılan incelemede sadece IGFBP-3 geninde deney grubunda azalma mevcuttu.

Bu sonuçlar neticesinde tip I kollajen kemik defektlerini tedavisinde erken dönemde inflamatuvar sitokinler ve BMP gen ekspresyonlarında artış ile etkili olmaktadır. Fakat uzun dönemde (6. haftada) kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine etkisi deney grubundan farklı değildir.

SUMMARY

Nowadays, treatment of bone defects constitutes one of the main struggling subjects of Orthopaedics and Traumatology clinics. For this purpose, many materials and treatment methods were being investigated and investigations are still continuing. In our study, we investigated the effects of Type I collagen which is main collagen component of bone tissue; on bone defects and on genes specific for osteogenesis in a rat bone defect model.

In this study, 56 female Sprague Dawley type rats were used. About 2 mm bone defect was created in the middle of right femur of rats. Rats were divided into two groups in equal ratio. In experimental group, type I collagen which was derived from rats is applied in bone defects whereas in control group defects were left empty.

Seven rats from each group were sacrificed at first hour, first week, third week and sixth week after surgery. 1cc blood samples were collected from each rat through intracardiac way. Femurs of rats were removed as a whole for histopathological examination. In histopathological examination; Huo classification, inflammation, development of connective tissue, osteogenesis and foreign body reaction were evaluated. According to Huo classification, significant change was found in the experimental group ($p=0,027$) only at first week. Histopathologically, no significant changes were found in other parameters at other weeks.

Forty two genes that are specific for osteogenesis were evaluated with microarray method after cDNA isolation of collected blood samples. In the experimental group, significant increase was found in genetic expressions of BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, TGF- β RII, Smad-1, IL-6, BMPR-IA, BMPR-IB, Eng, BMPR-II, c-fos, Cdkn1a, Chrd, Gdf-5, Id-1, PDGF- β , IGF-1, Serpine-1, and TGF- β RI at first hour. By the comparison of the genes in the first week, no significant change was found in any of the genes. By the evaluation at third week; when compared to control group, a significant decrease was found in expressions of BMP-7, BMPR-IA and c-fos genes in the experimental group. By the

evaluation at sixth week; there was a decrease only in IGFBP-3 gene expression in the experimental group.

As a conclusion of these results; Type I collagen is found to be effective on the treatment of bone defects through increasing inflammatory cytokines and also expression of BMP genes in the early stages of healing. However, it is not found that type I collagen has positive effect on healing of bone defects for long terms.

KAYNAKLAR

1. American Association of Orthopaedic Surgeons. Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States: Prevalence, Societal and Economic Cost. 1st ed: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2008.
2. Aaron Seth Weave. The Effect of Mechanical Stimulation on Bone Fracture Healing: Changes in Callus Morphology and Mesenchymal Stem Cell Homing. Michigan: Michigan Uni. 2008
3. Dinopoulos HT, Giannoudis PV. The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. *Curr Orthop* 2007;21: 268-279
4. Suedkamp NP, Barbey N, Veuskens A, Tempka A, Haas NP, Hoffmann R, et al. The incidence of osteitis in open fractures: an analysis of 948 open fractures (a review of the Hannover experience). *J Orthop Trauma* 1993;7: 473-82.
5. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res* 1996;329: 300-309.
6. Schaaf H, Lendeckel S, Howaldt HP, Streckbein P. Donor site morbidity after bone harvesting from the anterior iliac crest. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109: 52-58.
7. Dusseldorp JR, Mobbs RJ. Iliac crest reconstruction to reduce donor-site morbidity: technical note. *Eur Spine J* 2009;18: 1386-1390.
8. Fernyhough JC, Schimandle JJ, Weigel MC, Edwards CC, Levine AM. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine* 1992;17: 1474-1480.
9. Lietman SA, Tomford WW, Gebhardt MC, Springfield DS, Mankin HJ. Complications of irradiated allografts in orthopaedic tumor surgery. *Clin Orthop Relat Res* 2000;375: 214-217.
10. Seiler JG 3rd, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc* 2000;9: 91-97.
11. Tsuruoka N, Yamato R, Sakai Y, Yoshitake Y, Yonekura H. Promotion by collagen tripeptide of type I collagen gene expression in human osteoblastic cells and fracture healing of rat femur. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71: 2680-2687.

12. Sweeney TM, Opperman LA, Persing JA, Ogle RC. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. *J Neurosurg* 1995;83: 710-715
13. Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, et al. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials* 2005;26: 6158-6166.
14. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 2005;365: 5-7.
15. Keene G.S, Robinson A.H.N, Bowditch M.G. Key topics in orthopaedic trauma surgery. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd: 1999.
16. Jungueria LC, Carnerio J, Kelley RO. Basic Histology 8th Edition. McGraw-Hill: A Lange Medical, 1997: 170-196.
17. Brinker MR. Bone. In review of orthopaedics 3rd Edition. Philadelphia: Elsevier, 2000; 1-39.
18. Schenk RK: Biology of fracture repair. In Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG, editors. *Skeletal Trauma Vol 1*. Third edition. Philadelphia: Saunders Co, 2003; 29-73.
19. Brinker Mark R, O'Connor D. Kemik. In: Miller'ın Ortopedi Kitabı. Çeviri editörleri Yetkin H, Yazıcı M, Ankara: Adya, 2006: 1-44.
20. Fayez F. Safadi, Mary F. Barbe, Samir M. Abdelmagid, Mario C. Rico, Rulla A. Aswad, Judith Litvin, Steven N. Popoff . Bone Structure, Development and Bone Biology. In: Jasvir S. Khurana, editors. *Bone Pathology Second Edition*. New York: Humana Press, 2009: 1-50.
21. O'Driscoll SWM, Saris DBF, Ito Y, Fitzimmons JS. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res* 2001;19: 95-103.
22. Phieffer LS, Meyer RA, Gruber HE, Easley M, Wattenbarger JM. Effect of interposed periosteum in an animal physeal fracture model. *Clin Orthop Rel Res* 2000;376: 15-25.
23. Einhorn T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Rel Res* 1998;355: 7-21.
24. Zhang X, Naik A, Xie C, Reynolds D, Palmer J, Lin A, et al. Periosteal stem cells are essential for bone revitalization and repair. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005;5: 360-362.

25. Jay R. Lieberman, Gary E. Friedlaender. Bone Regeneration and Repair Biology and Clinical Applications. New York: Humana Press, 2005.
26. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology-I. In Pritchard DJ editors. Instructional Course Lectures Volume 45. Illinois: AAOS, 1996; 371-386.
27. Bi LX, Mainous EG, Zeng YP, Buford WL. Osteoformin accelerates fresh fracture healing in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65: 2470–2474.
28. Kılıçoğlu Sibel Serin. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2002;55: 143-150.
29. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19: 4-6.
30. Madison M, Martin R. B. Fracture healing. In: Chapman M.W, Editors. Operative Orthopaedics. Philadelphia: Lippincott: 1993: 221–228.
31. DeLacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1994;27: 859-874.
32. Brond AR, Rubin TC. Fracture Healing. In: editör Evarts C. Surgery of the Musculoskeletal System. New York: Churchill Livingstone, 1990: 93–114.
33. Marsh DR, Li G. The biology of fracture healing: optimising outcome. *Br Med Bull* 1999;55: 856-869.
34. Buckwalter J. A. Healing of the musculoskeletal tissues. In: Rockwood C.A, editors. Rockwood and Green's Fractures in Adults. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; 261–304.
35. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. *Orthop Clin North Am* 2000;31: 375-388.
36. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop* 1998;355: 82–89.
37. Hollinger J, Wong ME. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82: 594-606.
38. Grundnes O, Reikerås O. The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1993;64: 47-49.
39. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200: 165-170.
40. Gartner Leslie P, Hiatt James L. Color Textbook of Histology (3rd edition). Philadelphia: WB Saunders, 2006: 114-130.

41. Miller Mark D. Bone. In: Miller M, editors. Review of Orthopaedics. Philadelphia: WB Saunders, 1996: 1–22.
42. Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 2000;5: 64-70.
43. Yilmaz C, Erdemli E, Selek H, Kinik H, Arikan M, Erdemli B. The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121: 426-428.
44. Liu Z, Luyten FP, Lammens J, Dequeker J. Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. *Histol Histopathol* 1999;14: 587-595.
45. Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem* 1994;55: 350-357.
46. Dallas SL, Park-Snyder S, Miyazono K, Twardzik D, Mundy GR, Bonewald LF. Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein. *J Biol Chem* 1994;269: 6815-6821.
47. Miyazono K, Ichijo H, Heldin CH. Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors* 1993;8: 11-22.
48. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996;19: 1-12.
49. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990;110: 2195-2207.
50. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res* 1993;289: 292-312.
51. Talley-Ronsholdt DJ, Lajiness E, Nagodawithana K. Transforming growth factor-beta inhibition of mineralization by neonatal rat osteoblasts in monolayer and collagen gel culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995;31: 274-282.
52. Cheifetz S, Li IW, McCulloch CA, Sampath K, Sodek J. Influence of osteogenic protein-1 (OP-1; BMP-7) and transforming growth factor-beta 1 on bone formation in vitro. *Connect Tissue Res* 1996;35: 71-78.

53. Pfeilschifter J, Seyedin SM, Mundy GR. Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J Clin Invest* 1988;82: 680-685.
54. Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6: 597-641.
55. Prisell PT, Edwall D, Lindblad JB, Levinovitz A, Norstedt G. Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat. *Calcif Tissue Int* 1993;53: 201-205.
56. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971;50: 1392-1406.
57. Urist MR, Iwata H, Strates BS. Bone morphogenetic protein and proteinase in the guinea pig. *Clin Orthop Relat Res* 1972;85: 275-290.
58. Korchynskiy O, Decherer KJ, Sijbers AM, Olijve W, ten Dijke P. Gene array analysis of bone morphogenetic protein type I receptor-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2003;18: 1177-1185.
59. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995;13: 357-367.
60. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 1994;9: 651-659.
61. Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* 1998;22: 605-612.
62. Zheng MH, Wood DJ, Wysocki S, Papadimitriou JM, Wang EA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances expression of interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 genes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 1994;159: 76-82.
63. Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 11740-11744.

64. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J* 1990;9: 2085-2093.
65. Paralkar VM, Nandedkar AK, Pointer RH, Kleinman HK, Reddi AH. Interaction of osteogenin, a heparin binding bone morphogenetic protein, with type IV collagen. *J Biol Chem* 1990;265: 17281-17284.
66. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992;32: 160-167.
67. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89(5): 747-754.
68. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6: 432-438.
69. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996;10: 1580-1594.
70. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998;22: 591-603.
71. Bolander ME, Young MF, Fisher LW, Yamada Y, Termine JD. Osteonectin cDNA sequence reveals potential binding regions for calcium and hydroxyapatite and shows homologies with both a basement membrane protein (SPARC) and a serine proteinase inhibitor (ovomucoid). *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 2919-2923.
72. Hiltunen A, Metsäranta M, Virolainen P, Aro HT, Vuorio E. Retarded chondrogenesis in transgenic mice with a type II collagen defect results in fracture healing abnormalities. *Dev Dyn* 1994;200: 340-349.
73. Jingushi S, Joyce ME, Bolander ME. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J Bone Miner Res* 1992;7: 1045-1055.
74. Nakamura H, Kenmotsu S, Sakai H, Ozawa H. Localization of CD44, the hyaluronate receptor, on the plasma membrane of osteocytes and osteoclasts in rat tibiae. *Cell Tissue Res* 1995;280: 225-233.
75. Yamazaki M, Majeska RJ, Yoshioka H, Moriya H, Einhorn TA. Spatial and temporal expression of fibril-forming minor collagen genes (types V and XI) during fracture healing. *J Orthop Res* 1997;15: 757-764.

76. Hirakawa K, Hirota S, Ikeda T, Yamaguchi A, Takemura T, Nagoshi J, et al. Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 1994;9: 1551-1557.
77. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 4473-4475.
78. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 1988;81: 277-281.
79. Centrella M, McCarthy TL, Kusmik WF, Canalis E. Isoform-specific regulation of platelet-derived growth factor activity and binding in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *J Clin Invest* 1992;89: 1076-1084.
80. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995;10: 1272-1281.
81. Beuscher HU, Rausch UP, Otterness IG, Röllinghoff M. Transition from interleukin 1 beta (IL-1 beta) to IL-1 alpha production during maturation of inflammatory macrophages in vivo. *J Exp Med* 1992;175: 1793-1797.
82. Brown CC, Hembry RM, Reynolds JJ. Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J Bone Joint Surg Am* 1989;71: 580-593.
83. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 2007;41: 928-936.
84. Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D. Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int* 1993;53: 97-102.
85. Edwall D, Prisell PT, Levinovitz A, Jennische E, Norstedt G. Expression of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in regenerating bone after fracture: influence of indomethacin. *J Bone Miner Res* 1992;7: 207-213.
86. Lammens J, Liu Z, Aerssens J, Dequeker J, Fabry G. Distraction bone healing versus osteotomy healing: a comparative biochemical analysis. *J Bone Miner Res* 1998;13: 279-286.
87. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology* 1995;136: 124-131.

88. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, et al. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology* 1992;131: 1075-1080.
89. Ishidou Y, Kitajima I, Obama H, Maruyama I, Murata F, Imamura T, et al. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res* 1995;10: 1651-1659.
90. Baker JC, Harland RM. From receptor to nucleus: the Smad pathway. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7: 467-473.
91. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390: 465-471.
92. Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355: 66-72.
93. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL Jr. Pathophysiology of delayed healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355: 31-40
94. Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res* 1993;297: 23-27.
95. Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH. Transforming growth factor beta type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Dev Biol* 1991;143: 303-308.
96. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* 1990;95: 649-657.
97. Shimokomaki M, Wright DW, Irwin MH, van der Rest M, Mayne R. The structure and macromolecular organization of type IX collagen in cartilage. *Ann N Y Acad Sci* 1990;580: 1-7.
98. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res* 1995;318: 265-278.
99. Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop Relat Res* 1992;282: 250-272.
100. Mayne R, Brewton RG. New members of the collagen superfamily. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5: 883-890.
101. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991;5: 2814-2823.

102. Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 1994;65: 37-41.
103. Rehn M, Pihlajaniemi T. Alpha 1(XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 4234-4238.
104. Pan TC, Zhang RZ, Mattei MG, Timpl R, Chu ML. Cloning and chromosomal location of human alpha 1(XVI) collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 6565-6569.
105. Yamaguchi N, Kimura S, McBride OW, Hori H, Yamada Y, Kanamori T, et al. Molecular cloning and partial characterization of a novel collagen chain, alpha 1(XVI), consisting of repetitive collagenous domains and cysteine-containing non-collagenous segments. *J Biochem* 1992;112: 856-863.
106. Heckmann M, Aumailley M, Chu ML, Timpl R, Krieg T. Effect of transforming growth factor-beta on collagen type VI expression in human dermal fibroblasts. *FEBS Lett* 1992;310: 79-82.
107. Quarto R, Dozin B, Bonaldo P, Cancedda R, Colombatti A. Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocyte differentiation. *Development* 1993;117: 245-251.
108. Ryyänänen J, Sollberg S, Olsen DR, Uitto J. Transforming growth factor-beta up-regulates type VII collagen gene expression in normal and transformed epidermal keratinocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180: 673-680.
109. Wakisaka M, Spiro MJ, Spiro RG. Synthesis of type VI collagen by cultured glomerular cells and comparison of its regulation by glucose and other factors with that of type IV collagen. *Diabetes* 1994;43: 95-103.
110. Kivirikko S, Heinämäki P, Rehn M, Honkanen N, Myers JC, Pihlajaniemi T. Primary structure of the alpha 1 chain of human type XV collagen and exon-intron organization in the 3' region of the corresponding gene. *J Biol Chem* 1994;269: 4773-4779.
111. Myers JC, Kivirikko S, Gordon MK, Dion AS, Pihlajaniemi T. Identification of a previously unknown human collagen chain, alpha 1(XV), characterized by

- extensive interruptions in the triple-helical region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 10144-10148.
- 112.Rehn M, Hintikka E, Pihlajaniemi T. Primary structure of the alpha 1 chain of mouse type XVIII collagen, partial structure of the corresponding gene, and comparison of the alpha 1(XVIII) chain with its homologue, the alpha 1(XV) collagen chain. *J Biol Chem* 1994;269: 13929-13935.
- 113.Li K, Tamai K, Tan EM, Uitto J. Cloning of type XVII collagen. Complementary and genomic DNA sequences of mouse 180-kilodalton bullous pemphigoid antigen (BPAG2) predict an interrupted collagenous domain, a transmembrane segment, and unusual features in the 5'-end of the gene and the 3'-untranslated region of the mRNA. *J Biol Chem* 1993;268: 8825-8834.
- 114.Woo SL, An K, Arnoczky SP. Anatomy, Biology, and Biomechanics of Tendon, Ligament, and meniscus. In Simon SR, editors. *Orthopedic Basic Science*, Chicago: American Academy of Orthopedic Surgeons, 1994: 45-87.
- 115.Ashhurst DE. Collagens synthesized by healing fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1990;255: 273-283.
- 116.Vauhkonen M, Peltonen J, Karaharju E, Aalto K, Alitalo I. Collagen synthesis and mineralization in the early phase of distraction bone healing. *Bone Miner* 1990;10: 171-181.
- 117.Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 1991;9: 383-390.
- 118.Altman RD, Latta LL, Keer R, Renfree K, Hornicek FJ, Banovac K. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. *J Orthop Trauma* 1995;9: 392-400.
- 119.Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82: 161-73.
- 120.Metin Güngörmüş. Tavşanlarda oluşturulan kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine heterolog tip I kollajenin etkisinin histopatolojik ve radyolojik olarak incelenmesi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi. 1996.

121. Ganong WF. Review of Medical Physiology 17th edition. San Francisco: Prentice-Hall International Inc., 1995.
122. Balian G, Click EM, Bornstein P. Location of a collagen-binding domain in fibronectin. *J Biol Chem* 1980;255: 3234–3236.
123. Rao CN, Margulies IM, Liotta LA. Binding domain for laminin on type IV collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;128: 45–52.
124. Koda JE, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells: basal extracellular proteoglycan binds specifically to native type I collagen fibrils. *J Biol Chem* 1984;259: 11763–11770.
125. Takeuchi Y, Nakayama K, Matsumoto T. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1996;271: 3938–3944.
126. Takeuchi Y, Suzawa M, Kikuchi T, Nishida E, Fujita T, Matsumoto T. Differentiation and transforming growth factor- β receptor down-regulation by collagen- $\alpha 2\beta 1$ integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1997;272: 29309–29316.
127. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69: 11–25.
128. Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT. Role of the $\alpha 2$ -integrin in osteoblastic-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor. *J Biol Chem* 1998;273: 32988–32994.
129. Saadeh PB, Khosla RK, Mehrara BJ, Steinbrech DS, McCormick SA, DeVore DP, et al. Repair of a Critical Size Defect in the Rat Mandible Using Allogenic Type I Collagen. *J Craniofac Surg* 2001;12: 573-579.
130. Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benqué E, Marin P, Zahedi S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: Influence of collagen cross-linking. *J Periodontol* 1996;67: 1342–1347.
131. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Furuzawa-Carballeda GJ, Lira JM, de la Cruz JC, Almazán A, et al. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of

- osteopontin and SPARC during bone repair of rat femora fractures. *Ann N Y Acad Sci* 1998;857: 232-236.
- 132.Lindsey WH, Ogle RC, Morgan RF, Cantrell RW, Sweeney TM. Nasal reconstruction using an osteoconductive collagen gel matrix. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122: 37–40.
- 133.Fuerst G, Reinhard G, Tangl S, Mittlböck M, Sanroman F, Watzek G. Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2004;31: 784-790.
- 134.Masi L, Franchi A, Santucci M, Danielli D, Arganini L, Giannone V, Formigli L, et al. Adhesion, growth, and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcif Tissue Int* 1992;51: 202-212.
- 135.Kinoshita S, Finnegan M, Bucholz RW, Mizuno K. Three-dimensional collagen gel culture promotes osteoblastic phenotype in bone marrow derived cells. *Kobe J Med Sci* 1999;45: 201-211.
- 136.Mundy GR, Rodan SB, Majeska RJ, DeMartino S, Trimmier C, Martin TJ, et al. Unidirectional migration of osteosarcoma cells with osteoblast characteristics in response to products of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1982;34: 542-546.
- 137.Palmieri D, Camardella L, Ulivi V, Guasco G, Manduca P. Trimer carboxyl propeptide of collagen I produced by mature osteoblasts is chemotactic for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275: 32658-32663.
- 138.Mannai C, Leake D, Pizzoferrato A, Ciapetti G, Sangiorgi C. Histologic evaluation of purified bovine tendon collagen sponge in tooth extraction sites in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986;61: 315-323.
- 139.Güngörmüş M, Kaya O. Evaluation of the effect of heterologous type I collagen on healing of bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60: 541-545.
- 140.Gungormus M. The effect on osteogenesis of type I collagen applied to experimental bone defects. *Dent Traumatol* 2004;20: 334-337.
- 141.Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res* 1994;301: 302-312.

142. Blumenthal N, Steinberg J. The use of collagen membrane barriers in conjunction with combined demineralized bone-collagen gel implants in human infrabony defects. *J Periodontol* 1990;61: 319-327.
143. Mian M, Aloisi R, Benetti D, Rosini S, Fantozzi R. Potential role of heterologous collagen in promoting cutaneous wound repair in rats. *Int J Tissue React* 1992;14: 43-52.
144. Palmieri B. Heterologous collagen in wound healing: a clinical study. *Int J Tissue React* 1992;14: 21-25.
145. Mancuso S. The use of lyophilized collagen in gynaecology. *Int J Tissue React* 1992;14: 35-37.
146. Murata M, Huang BZ, Shibata T, Imai S, Nagai N, Arisue M. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999;28: 232-237.
147. Erturk S. Aviten ile Surgisel'in hemostazis ve kemik iyileşmesine etkileri. *Ege dentin. DHF. Der* 1978;3: 381-412.
148. Sweeney TM, Chhabra A, Brooke B. Type I collagen gels mediate total repair of critical size bone defects through intramembranous ossification. *Orthop Trans* 1995;18: 785.
149. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E, et al. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2004;25: 5387-5393.
150. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)--an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 2005;26: 2575-2584.
151. Gamradt SC, Lieberman JR. Bone graft for revision hip arthroplasty, biology and future applications. *Clin Orthop* 2003;417: 183-194.
152. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001;41: 1217-1224.
153. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001;71: 354-361.

- 154.Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F, Neukam FW. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2001;12: 495–502.
- 155.Nkenke E, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Winkler G, Neukam FW. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2002;13: 514–521.
- 156.McAllister B, Margolin M, Cogan A, Buck D, Hollinger J, Lynch S. Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14: 56–73.
- 157.Schlegel K, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18: 53–58.
- 158.Schlegel K, Donath K. Bio-Oss- a resorbable bone substitute. *Int J Biomater Medical Implants* 1998;8: 201–209.
- 159.Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* 2002;48: 142–148.
- 160.Ohta S, Yamamuro T, Lee K, Okumura H, Kasai R, Hiraki Y, et al. Fracture healing induces expression of the proto-oncogene c-fos in vivo. Possible involvement of the Fos protein in osteoblastic differentiation. *FEBS Lett* 1991;284: 42-45.
- 161.Yu YY, Lieu S, Lu C, Micalau T, Marcucio RS, Colnot C. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair. *Bone* 2009 Nov 11 (Article in pres).
- 162.Niikura T, Hak DJ, Reddi AH. Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *J Orthop Res* 2006;24: 1463-1471.
- 163.Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, Greenwald JA, Smith LP, Longaker MT. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg* 2001;107: 124-134.
- 164.Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene* 2005;357: 1–8.

165. Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, et al. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet* 2001;27: 84–88.
166. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 2006;38: 1424-1429.
167. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 1998;280: 1455-1457.
168. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102: 5062-5067.
169. Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90: 14-18.
170. Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ. Mice lacking *Bmp6* function. *Dev Genet* 1998;22: 321-339.
171. Jena N, Martín-Seisdedos C, McCue P, Croce CM. BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res* 1997;230: 28-37.
172. Taniguchi T, Matsumoto T, Shindo H. Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 during fracture healing. *Injury* 2003;34: 477-479.
173. Haque T, Mandu-Hrit M, Rauch F, Lauzier D, Tabrizian M, Hamdy RC. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein-signaling Smads during long-bone distraction osteogenesis. *J Histochem Cytochem* 2006;54: 407-415.
174. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113: 685-700.
175. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 2004;16: 291-299.

- 176.Ohsawa K, Neo M, Matsuoka H, Akiyama H, Ito H, Kohno H, et al. The expression of bone matrix protein mRNAs around beta-TCP particles implanted into bone. *J Biomed Mater Res* 2000;52: 460–466.
- 177.Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Biochemistry* 1997;30: 573–593.
- 178.Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84: 1032–1044.
- 179.Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 2001;313: 95-105.
- 180.Meyer RA, Meyer MH, Phieffer LS, Banks DM. Delayed union of femoral fractures in older rats: decreased gene expression. *BMC Musculoskelet Disord* 2001; 2:2. Available from: URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/2/2>
11 Şubat 2010 tarihinde ulaşılmıştır.
- 181.Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41: 173-178.
- 182.Siegbahn A, Hammacher A, Westermarck B, Heldin CH. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest* 1990;85: 916-920.
- 183.Kuroda S, Viridi AS, Dai Y, Shott S, Sumner DR. Patterns and localization of gene expression during intramembranous bone regeneration in the rat femoral marrow ablation model. *Calcif Tissue Int* 2005;77: 212-225.
- 184.Reddi AH. Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis* 2003;62: 73-78.
- 185.Uchida S, Doi Y, Kudo H, Furukawa H, Nakamura T, Fujimoto S. Transient expression of activin betaA mRNA on osteoprogenitor cells in rat bone regeneration after drill-hole injury. *Bone* 2000;27: 81-90.
- 186.Fuller K, Bayley KE, Chambers TJ. Activin A is an essential cofactor for osteoclast induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268: 2-7.
- 187.Sakai R, Eto Y, Ohtsuka M, Hirafuji M, Shinoda H. Activin enhances osteoclast-like cell formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195: 39-46.

188. Wiater E, Vale W. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 2003;278: 7934-7941.
189. Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenbergen C, Derkx P, Uitterlinden AG, et al. The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *FASEB J* 2007;21: 2949-2960.
190. Sakai R, Miwa K, Eto Y. Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model. *Bone* 1999;25: 191-196.
191. Perrien DS, Akel NS, Edwards PK, Carver AA, Bendre MS, Swain FL, et al. Inhibin A is an endocrine stimulator of bone mass and strength. *Endocrinology* 2007;148: 1654-1665.
192. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16: 1004-1014.
193. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17: 513-520.
194. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 2003;18: 1584-1592.
195. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 2008;87: 107-118.
196. Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 2000;12: 1455-1468.
197. Koli K, Ryyänen MJ, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 2008;43: 679-688.
198. Kitahama S, Gibson MA, Hatzinikolas G, Hay S, Kuliwaba JL, Evdokiou A, et al. Expression of fibrillins and other microfibril-associated proteins in human bone and osteoblast-like cells. *Bone* 2000;27: 61-67.
199. Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. Latent TGF-beta binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37: 38-41.

200. Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, et al. Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev* 2002;16: 2264-2223.
201. Peng Y, Kang Q, Luo Q, Jiang W, Si W, Liu BA, et al. Inhibitor of DNA binding/differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2004;279: 32941-32949.
202. Ogata T, Wozney JM, Benezra R, Noda M. Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 9219-9222.
203. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994;127: 1755-1766.
204. Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, R  ther U, Nordheim A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 1999;274: 19838-19845.
205. Locklin RM, Riggs BL, Hicok KC, Horton HF, Byrne MC, Khosla S. Assessment of gene regulation by bone morphogenetic protein 2 in human marrow stromal cells using gene array technology. *J Bone Miner Res* 2001;16: 2192-2204.
206. Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGF-beta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003;11: 915-926.
207. Chan AS, Jensen KK, Skokos D, Doty S, Lederman HK, Kaplan RN, et al. Id1 represses osteoclast-dependent transcription and affects bone formation and hematopoiesis. *PLoS One* 2009;4: 7955.
208. Hecht J, Kuhl H, Haas SA, Bauer S, Poustka AJ, Lienau J, et al. Gene identification and analysis of transcripts differentially regulated in fracture healing by EST sequencing in the domestic sheep. *BMC Genomics* 2006;7: 172.

209. Koide T, Aso A, Yorihuzi T, Nagata K. Conformational requirements of collagenous peptides for recognition by the chaperone protein HSP47. *J Biol Chem* 2000;275: 27957-27963.
210. Shroff B, Smith T, Norris K, Pileggi R, Sauk JJ. Hsp 47 is localized to regions of type I collagen production in developing murine femurs and molars. *Connect Tissue Res* 1993;29: 273-286.
211. Tiffée JC, Griffin JP, Cooper LF: Immunolocalization of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia. *Tissue Cell* 2000;32: 141-147.
212. Rundle CH, Wang X, Wergedal JE, Mohan S, Lau KH. Fracture healing in mice deficient in plasminogen activator inhibitor-1. *Calcif Tissue Int* 2008;83: 276-284.
213. Pedrozo HA, Schwartz Z, Robinson M, Gomes R, Dean DD, Bonewald LF, et al. Potential mechanisms for the plasmin-mediated release and activation of latent transforming growth factor-beta1 from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 1999;140: 5806-5816.
214. Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 1988;107: 743-751.
215. Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, McMaster JH. Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 1992;130: 1401-1412.
216. Lalou C, Silve C, Rosato R, Segovia B, Binoux M. Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF-binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1994;135: 2318-2326.
217. Anstrom JA, Thore CR, Moody DM, Challa VR, Block SM, Brown WR. Morphometric assessment of collagen accumulation in germinal matrix vessels of premature human neonates. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31: 181-190.
218. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RLC, Valdimarsdottir G, Thorikay M, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 2004;23: 4018-4028.

219. Brage M, Abrahamson M, Lindström V, Grubb A, Lerner UH. Different cysteine proteinases involved in bone resorption and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int* 2005;76: 439-447.
220. Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, et al. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 2006;38: 547-554.
221. Nakajima A, Shimizu S, Moriya H, Yamazaki M. Expression of fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3), signal transducer and activator of transcription-1, and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 during endochondral ossification: differential role of FGFR3 in skeletal development and fracture repair. *Endocrinology* 2003;144: 4659-4668.
222. Su WC, Kitagawa M, Xue N, Xie B, Garofalo S, Cho J, et al. Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* 1997;386: 288-292.