



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

**RAT FEMUR KIRIKLARINDA EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE
HYALURONİK ASİT'İN İYİLEŞME SÜRESİ VE KALLUS DOKUSU
SAĞLAMLIĞINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Barış Can KUZUCA

TEZ DANIŞMANLARI

Dr. Öğr. Üyesi Murat KÖKEN

Prof. Dr. Mahmut Nedim DORAL

Ankara, 2020



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

**RAT FEMUR KIRIKLARINDA EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE
HYALURONİK ASİT'İN İYİLEŞME SÜRESİ VE KALLUS DOKUSU
SAĞLAMLIĞINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Barış Can KUZUCA

TEZ DANIŞMANLARI

Dr. Öğr. Üyesi Murat KÖKEN

Prof. Dr. Mahmut Nedim DORAL

Ankara, 2020

TEŞEKKÜR

Ferdi olmaktan her zaman gurur duyduğum tüm Ufuk Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji ailesine, bu çalışmayı yapmama vesile olan, değerli vaktini ve emeğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgisi ve deneyimi ile sadece Ortopedi ve Travmatoloji alanı ile sınırlı kalmayıp tüm asistanlarını her daim hayata hazırlayan, asistanı ve tez öğrencisi olmaktan her zaman onur duyacağım A.D. Başkanım ve tez danışmanım Prof. Dr. Mahmut Nedim DORAL hocama; tez aşamasında emeğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Murat KÖKEN'e; tez çalışmamın tüm aşamaları boyunca desteğini her zaman hissettiğim ve eğitimim boyunca bana her türlü emeği veren Prof. Dr. Berk GÜÇLÜ hocama, değerli hocalarım Prof. Dr. Burak AKAN ve Prof. Dr. Ahmet EGE hocalarıma ve bana her zaman bir ağabey olarak yaklaşan Dr. Öğr. Üyesi Doğaç KARAGÜVEN'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Deney aşamasında bilgi, alaka ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Okan Ali AKSOY ve Uzm. Veteriner Hekim Berk Alp GÖKSEL başta olmak üzere tüm S.B.Ü. Gülhane Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi ekibine; deney aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Ersin SAPMAZ ağabeyime; biyomekanik inceleme imkanı sunan Prof. Dr. Rıza GÜRBÜZ başta olmak üzere tüm O.D.T.Ü. Malzeme ve Metalürji A.D.'na; radyolojik inceleme imkanı sunan Prof. Dr. Mehmet Ali YİNANÇ ve Doç. Dr. Gökçe Kaan ATAÇ hocalarım başta olmak üzere tüm Ufuk Üniversitesi Radyoloji A.D. ekibine, histolojik incelemelerimde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa SARGON hocama ve istatistiki verilerimi düzenleyen Dr. Öğr. Üyesi Neşe ALKAN'a teşekkürü borç bilirim.

Son ve en önemlisi olarak, hayatımı paylaştığım eşim Dr. Tutku DOĞAN KUZUCA'ya, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Uzm. Dr. İlknur GENÇ KUZUCA'ya, babam Uzm. Dr. Hüsnü KUZUCA'ya ve dayım Prof. Dr. Onur GENÇ'e en büyük teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Barış Can KUZUCA

ÖZET

Amaç: Epidermal Büyüme Faktörü, Hyalüronik Asit ve kombinasyonunun kırık iyileşmesi üzerine olan etkilerinin in-vivo deneysel rat modelinde incelenmesi ve olası yan etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Genel anestezi altında femur shaft osteotomisi uygulanan 48 adet Wistar-Albino cinsi rat, randomize olarak Kontralateral, Kontrol, EGF, HA ve Kombine olmak üzere 5 ayrı gruba ayrılmıştır. Kırık oluşturulan tüm gruplara K-teli kullanılarak internal fiksasyon uygulanmıştır. EGF grubuna rat başına 0,75µg/1cc olacak şekilde tek doz lokal Heberprot-P®, HA grubuna rat başına 2x0,5cm'lik Hyalofast® ve Kombine gruba EGF emdirilmiş Hyalofast® tatbik edilmiştir. Kontralateral gruba herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Randomize olarak kontrol grubundan seçilen 4'er; EGF, HA ve Kombine grubundan 5'er rat 4. ve 6. haftalarda genel anestezi altında sakrifiye edilerek radyolojik (Lane-Sandhu sınıflaması, BT), biyomekaniksel (3 nokta bükülme testi) ve histolojik (Huo sınıflaması, SEM) olarak incelenmiştir.

Bulgular: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, EGF ve HA gruplarında 4. hafta sonunda, kaynamanın radyolojik ($p<0,05$) ve histolojik ($p<0,05$) olarak arttığı saptanmıştır. Ancak kallus dokusunun biyomekaniksel olarak tespit yapılabilecek düzeye ulaşamadığı görülmüştür. EGF grubundaki kaynamanın HA grubundan sadece histolojik olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$). Kombine grupta ise; her 3 gruba göre radyolojik ($p<0,05$), biyomekaniksel ($p<0,05$) ve histolojik ($p<0,05$) olarak anlamlı kaynama artışı gözlenmiştir. 6. hafta sonunda ise EGF ve HA gruplarında, kontrol gruba kıyasla, radyolojik ($p<0,05$), biyomekaniksel ($p<0,05$) ve histolojik ($p<0,05$) olarak anlamlı kaynama artışı gözlenmiştir. Ancak, EGF grubundaki kaynamanın HA grubundan sadece radyolojik olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$). Kombine grupta ise; her 3 gruba göre radyolojik ($p<0,05$), biyomekaniksel ($p<0,05$) ve histolojik ($p<0,05$) olarak anlamlı kaynama artışı gözlenmiştir. Biyomekaniksel olarak 6. haftada, Kombine grup ile Kontralateral grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttur ($p<0,05$). EGF ve Kombine gruplarında 4. ve 6. hafta sonlarında kemik doku üzerinde partiküler yapı saptanmıştır. Bu örneklerin 3 boyutlu BT görüntülerinde ise, 4. hafta sonunda Kombine grubunda yaklaşık 1,0 x 1,0 mm, 6. hafta sonunda EGF grubunda 4,0 x 3,0 mm, 6. hafta sonunda Kombine grupta ise yaklaşık 5,0 x 2,5 mm olmak üzere birkaç adet metafizyel kemik kistleri saptanmış olup, histopatolojik incelemelerde herhangi bir malignite bulgusuna rastlanmamıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, ratların uzun kemik kırık tedavilerinde, kırık hattına lokal EGF ve HA uygulanmasının kırık iyileşmesinde anlamlı etkileri olduğu görülmüştür. EGF ve HA kombinasyonu uygulandığında daha kısa sürede iyileşme ve daha sağlam bir kaynama dokusu elde edilmiş ve bu bulgular ile kırık tedavisinde yeni ufuklar oluşabileceği görüşü önem kazanmıştır. Ancak; hayvan modelinde EGF'nin kemik dokuda kist oluşumuna da neden olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Anahtar sözcükler: Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Hyaluronik Asit (HA), Kırık İyileşmesi

ABSTRACT

Aim: In this research study, the aim is to evaluate the effects and to observe the possible side effects of Epidermal Growth Factor, Hyaluronic Acid and combination on fracture healing process in a in-vivo experimental rat model.

Material and Method: Under general anesthesia, femoral shaft osteotomy was applied to 48 Wistar-Albino rat and randomly divided into 5 different groups as Counterlateral, Control, EGF, HA and Combined. Internal fixation was applied by K-wire to whole fracture applied groups. 0,75 μ g/1cc one dose local Heberprot-P® per rat to EGF group, 2x0,5cm Hyalofast® per rat to HA group and EGF imbued Hyalofast® to Combined group was applied. No surgical intervention was performed on Counterlateral group. Randomized selected 4 rats per Control group and 5 rats per EGF, HA, Combined groups were sacrificed under general anesthesia at 4th and 6th weeks and examined radiologically (Lane-Sandhu classification, CT), biomechanically (3 point bending test), and histologically (Huo classification, SEM).

Results: Compared to Control group, healing in EGF and HA groups was increased radiologically ($p < 0,05$) and histologically ($p < 0,05$) at 4th week. However, durability of callus tissue can not reach to a level of biomechanical examination. Compared to HA group, healing of EGF group is only statistically different in histological examination ($p < 0,05$). In Combined group, healing in both radiological ($p < 0,05$), biomechanical ($p < 0,05$) and histological ($p < 0,05$) examinations was statistically significant compared to all three groups. At 6th weeks, healing of EGF and HA groups was statistically significant in radiological ($p < 0,05$), biomechanical ($p < 0,05$) and histological ($p < 0,05$) compared with Control group. However, compared with HA group, healing of EGF group was only statistically significant in radiological examinations ($p < 0,05$). In Combined group, healing in both radiological ($p < 0,05$), biomechanical ($p < 0,05$) and histological ($p < 0,05$) examinations was statistically significant compared to all three groups. Statistically significance was observed between Combined group and Counterlateral group in biomechanical examinations at 6th week ($p < 0,05$). At 4th and 6th weeks, particulated structures was observed on bone tissue in EGF and Combined groups. In their 3D reconstructed CT scans, a few metaphysial bone cycts which are approximately 1,0 x 1,0 mm in 4th week Combined group, 4,0 x 3,0 mm in 6th week EGF group and 5,0 x 2,5mm in 6th week Combined group was observed. However, no malignancy symptom was addressed in histopathological examinations.

Conclusion: As conclusion, in the treatment of rat long bone fractures, significant effects of local EGF and HA application on fracture line was observed in our study. Administration of local EGF and HA acquires earlier healing and more solid callus tissue. Thus, with respect to our results, idea of production of new horizons on fracture healing come into prominence. However, in animal model, observation of bone cycts after EGF application should also be considered.

Key Words: Epidermal Growth Factor (EGF), Hyaluronic Acid (HA), Fracture Healing

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLO DİZİNİ	ix
ŞEKİL DİZİNİ	xi
FOTOĞRAF DİZİNİ	xiii
GRAFİK DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KEMİK DOKU VE YAPISI	3
2.2. KEMİK HÜCRELERİ	4
2.2.1. Osteoblastlar	4
2.2.2. Osteositler	6
2.2.3. Osteoklastlar	7
2.3. KEMİK MATRİKSİ	9
2.4. PERİOSTEUM VE ENDOSTEUM	11
2.5. KEMİK TİPLERİ	12
2.5.1. Birincil Kemik	13
2.5.2. İkincil Kemik	13
2.6. KEMİK DOKUNUN BESLENMESİ	15
2.7. KEMİK YAPININ OLUŞUM MEKANİZMASI	17
2.7.1. İntramembranöz Kemikleşme	17
2.7.2. Enkondral Kemikleşme	18
2.8. KEMİK DOKUNUN MİNERALİZASYONU	20

2.9.	KEMİK DOKUNUN YENİDEN ŞEKİLLENMESİ	21
2.10.	KEMİK DÖNGÜSÜNÜN KONTROLÜ	23
2.11.	KIRIK TANIMI	27
2.12.	KIRIK OLUŞUM MEKANİZMALARI	27
2.13.	KIRIK İYİLEŞMESİ	30
2.13.1.	Direkt Kemik İyileşmesi	30
2.13.2.	Dolaylı Kemik İyileşmesi	31
2.14.	KIRIK İYİLEŞMESİNİN DÜZENLENMESİ	37
2.15.	KIRIK İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER	40
2.16.	HYALÜRONİK ASİT	42
2.17.	EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ	44
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1.	ÇALIŞMA PLANI	48
3.2.	RADYOLOJİK İNCELEME	59
3.3.	BİYOMEKANİK İNCELEME	60
3.4.	HİSTOLOJİK İNCELEME	63
3.5.	İSTATİSTİKSEL İNCELEME	64
4.	BULGULAR	65
4.1.	RADYOLOJİK BULGULAR	65
4.2.	BİYOMEKANİK BULGULAR	74
4.3.	HİSTOLOJİK BULGULAR	81
4.4.	İSTATİSTİKSEL BULGULAR	95
5.	TARTIŞMA	102
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	118
7.	KAYNAKÇA	121

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
HA:	Hyalüronik Asit
PTH:	Paratiroid Hormon
IGF:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL:	İnterlökin
CSF:	Koloni Uyarıcı Faktör
PDGF:	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
TGF:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
BMP:	Kemik Morfogenetik Proteini
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
ALP:	Alkalen Fosfataz
OPG:	Osteoprotegrin
RANK:	Nükleer Faktör Kappa-B Reseptör Aktivatörü
TNF:	Tümör Nekroz Faktör
PMNL:	Polimorfonükleer Lökosit
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Pg:	Prostaglandin
USG:	Ultrasonografi
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
SEM:	Scanning Electron Microscopy

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Kemik Matriks Bileşenleri	10
Tablo 2.2. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler [23]	40
Tablo 3.1. Deney Hayvanları Dağılım Tablosu	48
Tablo 3.2. Radyolojik Bulguları Değerlendirmek için Kullanılan Lane - Sandhu Skorlama Sistemi [79]	59
Tablo 3.3. Histolojik Bulguları Değerlendirmek için Kullanılan Huo Sınıflaması [85]	64
Tablo 4.1. Kontrol grubu radyografilerinin 1. Ortopediste göre değerlendirme bulguları	67
Tablo 4.2. Kontrol grubu radyografilerinin 2. Ortopediste göre değerlendirme bulguları	67
Tablo 4.3. EGF grubu radyografilerinin 1. Ortopediste göre değerlendirme bulguları	68
Tablo 4.4. EGF grubu radyografilerinin 2. Ortopediste göre değerlendirme bulguları	68
Tablo 4.5. HA grubu radyografilerinin 1. Ortopediste göre değerlendirme bulguları	69
Tablo 4.6. HA grubu radyografilerinin 2. Ortopediste göre değerlendirme bulguları	69
Tablo 4.7. Kombine grubu radyografilerinin 1. Ortopediste göre değerlendirme bulguları	70
Tablo 4.8. Kombine grubu radyografilerinin 2. Ortopediste göre değerlendirme bulguları	70
Tablo 4.9. İki ayrı ortopedist tarafından değerlendirilen radyolojik bulguların dağılımı	71

Tablo 4.10. 3 boyutlu rekonstrüksiyon sonrası 4. hafta Kombine grupta tespit edilen kistlerin ölçüleri	73
Tablo 4.11. 3 boyutlu rekonstrüksiyon sonrası 6. hafta EGF ve Kombine gruplarında tespit edilen kistlerin ölçüleri	73
Tablo 4.12. Kontralateral gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları	78
Tablo 4.13. Kontrol gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları	78
Tablo 4.14. EGF gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları	79
Tablo 4.15. HA gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları	79
Tablo 4.16. Kombine gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları	80
Tablo 4.17. Tüm gruplara uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme ortalamaları	80
Tablo 4.18. Kontralateral grup histolojik değerlendirme bulguları	86
Tablo 4.19. Kontrol grubu histolojik değerlendirme bulguları	87
Tablo 4.20. EGF grubu histolojik değerlendirme bulguları	87
Tablo 4.21. HA grubu histolojik değerlendirme bulguları	88
Tablo 4.22. Kombine grubu histolojik değerlendirme bulguları	88
Tablo 4.23. Tüm gruplara uygulanan histolojik inceleme ortalamaları	89
Tablo 4.24. Tüm gruplara uygulanan SEM histolojik inceleme kalitatif değerlendirme bulguları	94
Tablo 4.25. Tüm grupların istatistiksel dağılımları	96
Tablo 4.26. 4. hafta gruplarının Mann-Whitney test sonuçları	97
Tablo 4.27. 6. hafta gruplarının Mann-Whitney test sonuçları	97
Tablo 4.28. 4. ve 6. hafta gruplarının kendi aralarında Mann-Whitney test sonuçları	98

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Kemiğin genel yapısını ve temel hücreleri [3]	8
Şekil 2.2. Kompakt kemik ve trabeküllerden oluşmuş spongiöz kemik [3]	12
Şekil 2.3. Kemiğin lamellar yapısı ve Haversian sistemi [2]	14
Şekil 2.4. Yetişkin uzun kemiğin kan desteği [2]	16
Şekil 2.5. Kemiğin besleyici damar sistemini ve kan akımı [12]	16
Şekil 2.6. Uzun kemiklerin enkondral kemikleşme ile oluşum basamakları [3]	19
Şekil 2.7. Kesme konisini ve kemik yeniden şekillenme basamakları [2]	22
Şekil 2.8. Kemik döngüsünün kontrolü [12]	26
Şekil 2.9. Kırık oluşum mekanizmaları [23]	28
Şekil 2.10. Doğrudan kemik iyileşmesi [5]	30
Şekil 2.11. Dolaylı kemik iyileşmesi [5]	36
Şekil 2.12. Dolaylı kemik iyileşmesinde intramembranöz ve enkondral kemikleşme mekanizmaları [5]	36
Şekil 2.13. EGF aminoasit dizilimi [24]	44
Şekil 2.14. EGF hücre içi etki mekanizması [111]	45
Şekil 2.15. EGF'nin kemik hücreleri üzerindeki etkileri [93]	46
Şekil 3.1. 3 Nokta Bükülme testinden elde edilen grafik örneği ve katılık değerinin hesaplanması [82]	62
Şekil 4.1. 4. haftada sakrifiye edilen grupların radyolojik örnekleri	65
Şekil 4.2. 6. haftada sakrifiye edilen grupların radyolojik örnekleri	66
Şekil 4.3. Bilgisayarlı Tomografi uygulanan femur örnekleri.....	72
Şekil 4.4. Kontralateral grup histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	81
Şekil 4.5. 4. hafta Kontrol grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	82

Şekil 4.6. 6. hafta Kontrol grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	82
Şekil 4.7. 4. hafta EGF grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	83
Şekil 4.8. 6. hafta EGF grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	83
Şekil 4.9. 4. hafta HA grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	84
Şekil 4.10. 6. hafta HA grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	84
Şekil 4.11. 4. hafta Kombine grup histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	85
Şekil 4.12. 6. hafta Kombine grup histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü	85
Şekil 4.13. Kontralateral grup SEM görüntüsü	89
Şekil 4.14. 4. hafta Kontrol grubu SEM görüntüsü	90
Şekil 4.15. 6. hafta kontrol grubu SEM görüntüsü	90
Şekil 4.16. 4. hafta EGF grubu SEM görüntüsü	91
Şekil 4.17. 6. hafta EGF grubu SEM görüntüsü	91
Şekil 4.18. 4. hafta HA grubu SEM görüntüsü	92
Şekil 4.19. 6. hafta HA grubu SEM görüntüsü	92
Şekil 4.20. 4. hafta Kombine grup SEM görüntüsü	93
Şekil 4.21. 6. hafta Kombine grup SEM görüntüsü	93

FOTOĞRAF DİZİNİ

Fotoğraf 3.1. Ratlar 4 ayrı grup olarak ayrılarak takip edildi.....	49
Fotoğraf 3.2. Ratların sakrifikasyonundan sonra femurları rezeke edildi.....	50
Fotoğraf 3.3. Ratlara anestezi kombinasyonu uygulandı.....	51
Fotoğraf 3.4. Ratlar cerrahi işlem öncesi steril olarak hazırlandı.....	52
Fotoğraf 3.5. Cilt-cilt altı geçildikten sonra fasya dokusuna ulaşıldı.....	52
Fotoğraf 3.6. Künt diseksiyon ile femur shaftına ulaşıldı.....	53
Fotoğraf 3.7. Osteotom ile femur shaft kırığı oluşturuldu.....	54
Fotoğraf 3.8. Oluşturulan femur shaft kırığı fikse edilmeden önce.....	54
Fotoğraf 3.9. K-teli intramedüller olarak antegrad yönde ilerletildi.....	55
Fotoğraf 3.10. Redüksiyon sağlandıktan sonra K-teli retrograd yönde ilerletilerek fiksasyon sağlandı.....	55
Fotoğraf 3.11. Fasya tabakası 3,0 Vicryl suture ile kapatıldı.....	56
Fotoğraf 3.12. İşlemin sonlandırılmasından sonra denekler postoperatif takibe alındı.....	56
Fotoğraf 3.13. Heberprot-P® kırık hattına lokal olarak uygulandı.....	57
Fotoğraf 3.14. Hyalofast® kırık hattı etrafına sarıldı.....	57
Fotoğraf 3.15. Heberprot-P® ile Hyalofast® kombine edildi.....	58
Fotoğraf 3.16. Femurlar Instron 5565-A cihazında (Instron Company®, Massachusetts, ABD) biyomekanik olarak incelendi.....	61
Fotoğraf 4.22. Sakrifikasyon sonucu kemik dokuda görülen partiküler yapı	94

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 4.1. Kontralateral grup biyomekanik bulgu grafiği	74
Grafik 4.2. Kombine grup - 4. hafta biyomekanik bulgu grafiği	75
Grafik 4.3. Kontrol grubu - 6. hafta biyomekanik bulgu grafiği	75
Grafik 4.4. EGF grubu - 6. hafta biyomekanik bulgu grafiği	76
Grafik 4.5. HA grubu - 6. hafta biyomekanik bulgu grafiği	76
Grafik 4.6. Kombine grubu - 6. hafta biyomekanik bulgu grafiği	78
Grafik 4.7. Radyolojik bulguların istatistiksel dağılımı	99
Grafik 4.8. Maksimum kuvvet bulgularının istatistiksel dağılımı	100
Grafik 4.9. Katılık bulgularının istatistiksel dağılımı	101
Grafik 4.10. Histolojik bulguların istatistiksel dağılımı	101

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erişkin iskelet sisteminin temel ögesi olan kemik doku, vücut bütünlüğü için katı bir destek sağlayan sert ve dinamik bir dokudur. Temel olarak vücut mekaniğine destek olmakla birlikte, kemik dokunun fizyolojik olarak da pek çok görevi bulunmaktadır.

Kemik, kırık ve çevre yumuşak dokudaki anatomik bütünlüğün bozulması olayına kırık adı verilmektedir. Her yaş grubunu etkileyen kemik kırıkları, iyileşme sürecinin uzun olması sebebiyle erişkin popülasyonunda iş gücü kaybı yaratmaktadır. Ayrıca kırıkların geriyatrik popülasyonda da sık görülmesi, yüksek morbidite ve mortalite yaratması nedeni ile insan hayatını olumsuz etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur.

Kırık iyileşmesi karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Tarihsel süreçte çeşitli yöntemlerle tedavi edilmiş olan kemik kırıkları, vakaların çoğunda kaynama ile sonuçlanmaktadır. Kırık iyileşmesinin hızlandırılması, daha erken mobilizasyon imkânı, iş gücü kaybını azaltması bakımından önemlidir. Ayrıca, gecikmiş kaynama veya kaynamama önemli bir sorun olarak kalmaya devam etmektedir. Bu nedenle tüm Ortopedi ve Travmatoloji kliniklerinde, kırıkların doğru ve hızlı bir şekilde tedavi edilerek hastaların erken mobilizasyonu amaçlanmaktadır. Dolayısı ile, günümüzde travma üzerine yapılan çalışmalarda, bu etmenlerin sağlanması amaçlanmaktadır.

Teknolojik gelişmelerin ilerlemesi ve tıp alanında kullanılmaya başlanması ile birlikte, tıbbın diğer alanlarında olduğu gibi, kırık iyileşmesinden de sorumlu pek çok hücre ve yardımcı moleküller aydınlatılmaya başlanmıştır. Kırık iyileşmesinin çeşitli aşamalarında görev alan bu hücre ve moleküller, mevcut ortamla etkileşerek kırık iyileşmesine katkı sunarlar. Bu moleküllerin gerek etkilerini gerekse olası yan etkilerini araştırmak için, deneysel çalışmalar popüler olarak uygulanmaktadır. Ayrıca bu moleküllerin etkilerini artırmak için, çeşitli diğer moleküllerle kombine edilerek kullanılabileceğini de gösteren çalışmalar da mevcuttur [62].

Son yıllarda tanımlanmış olan Epidermal Büyüme Faktörü, günümüzde diyabetik yara tedavisi olmak üzere pek çok alanda kullanılmaya girmiştir. EGF'nin

kemik biyolojisinde de önemli roller oynadığı gösterilmiştir. EGF reseptörlerinin, kemik yapımından sorumlu hücreler olan osteoblastlar, kemik yıkımında rol oynayan osteoklastlar ve yeni damar oluşumunda görev alan endotelial hücrelerde bulunduğu gösterilmiş olsa da [59], güncel literatürde kırık iyileşmesi üzerine etkisi olduğu ile ilgili çalışmalar mevcut değildir.

Kırıkta rejenerasyonunu tetiklediği varsayılan Hyalüronik Asit, günümüzde eklem cerrahisi başta olmak üzere tıbbın pek çok alanında kullanıma girmiştir. HA içeren desteklerin, iyileşme dokusuna öncülük ettiği bilinmektedir [53]. Günümüzde, osteokondral defektlerin tamirinde ve periosteumun etkilendiği travmalarda, HA içeren çeşitli destekler, iyileştirmeyi hızlandırmak amacı ile defekt bölgesine lokal olarak uygulanmaktadır. Ancak travma ile ilişkili güncel çalışmalarda, HA'nın iyileşme süresine ve oluşan kaynama dokusunun sağlamlığına etkisini gösteren literatür mevcut değildir.

Bu bilgiler ışığında, EGF'nin ve HA'nın, özellikle kombine olarak çatı ile kullanıldığında, kırık iyileşmesini uyararak iyileşmeyi hızlandıracağı ve oluşan kaynama dokusunun sağlamlığını artıracığı hipotezine ulaşılmıştır. Bu hipotezden yola çıkılarak tasarlanan 'in-vivo' deneysel çalışmamızda, EGF ve HA'nın kapalı femur kırıklarında, kırık iyileşmesi üzerine olan etkisi radyolojik, biyomekanik ve histopatolojik olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKU VE YAPISI

Kemik doku, çevresindeki diğer dokular ile sürekli ilişkide olan ve fiziksel ihtiyaçlara uyum sağlayabilen metabolik olarak aktif bir dokudur [1]. Başka bir deyişle, kemik doku, diğer bağ dokular gibi hücrelerden ve hücre dışı matriksten oluşan özel bir doku formudur. Kemiği diğer bağ dokularından ayıran özelliği ise, matriksinin mineralize halde oluşudur ve bu özellik, destek ve koruma yeteneğine sahip son derece sert bir doku oluşturur [2].

Kemik, vücuda katı bir destek sağlamanın yanı sıra, hayati organları korumakla görevli olan ve iç kavitesinde kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğininin çevrelendiği hayati bir organdır. Kemik dokuda, ayrıca, kalsiyum, fosfor ve diğer iyonlar haznelenir ve kemik doku, vücut homeostazı için gerektiğinde bu iyonların salgılanmasından veya depolanmasından da sorumludur [3].

Bu fizyolojik işlevlerin yanı sıra, kemiğin en önemli görevi, iskelet kasılması sonrası oluşan kuvvetlerin toplamı ile bir kaldıraç görevi görmesi ve bu kuvvetleri, vücut hareketlerine dönüştürmesidir [3].

Özelleşmiş bir bağ doku oluşumu olan kemik doku, kalsifiye hücre dışı matriksi ve temelde ‘Osteosit’, ‘Osteoblast’ ve ‘Osteoklast’ olarak adlandırılan 3 ana hücreden oluşmaktadır. Tüm kemikler, içerisinde osteojenik hücreler içeren ve iç kısmına ‘Endosteum’, dış kısmına ise ‘Periosteum’ adı verilen bir bağ doku tabakası ile çevrilidirler [3]. (Şekil 2.1.)

2.2. KEMİK HÜCRELERİ

2.2.1. Osteoblastlar:

Mezenşimal kök hücrelerden köken alan osteoblastlar, tek çekirdekli hücrelerdir. Osteoblastlar, toplam kemik hücrelerinin %4-6'sını oluştururlar. Osteoprogenitör hücrelerden osteoblast oluşumu için 'Runx2' gen ekspresyonu gereklidir. Yine osteoblast farklılaşmasında 'Fibroblast Büyüme Faktörü'nün de önemli rolü olduğu bildirilmiştir [4].

İnaktif osteoblastlar, periosteal ve endosteal kemik yüzeyinde bulunurlar [1]. Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde, yan yana, tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar [3]. Aktif olarak sentez yapan osteoblastlar, kübik şekilden prizmatığe kadar değişken şekle ve bazofilik sitoplazmaya sahiptirler.

Osteoblastlar, kemik matriksinin organik bileşenlerini (Tip 1 Kollajen, Proteoglikanlar ve Glikoproteinler) üretmekle görevlidirler. Yakın akrabaları olan fibroblast ve kondroblast gibi osteoblast da çok yönlü salgı yapan bir hücredir ve bölünme yeteneğini de korumuştur [2].

Kemiğin inorganik bileşenlerinin depolanması da yine osteoblastik aktivite ile sağlanmaktadır. Osteoblastlar, kemiğin büyümesi ve kemiğin yeniden şekillenmesi için gereken değişikliklere aracılık etmek üzere biyolojik uyarıların yanında mekanik uyarılara da yanıt verebilirler [2].

Aktif osteoblastlar kemik matriksinin dış yüzeyinde bulunurlar ve özelleşmiş hücreler arası bağlantılar ile bağlıdırlar [3]. Kemik yüzeyinde bulunan osteoblastlar, diğer bölgelerde bulunan osteoblastlara göre metabolik olarak daha aktiftirler [5]. Sentetik aktivite tamandıktan sonra, bazı osteoblastlar, osteositlere farklılaşarak matriks-bağlı lakünelarda tuzaklanırlar ve matriks yüzeyini sararak 'Kemiği Kaplayan Hücreler'e dönüşürler. Çoğunluğu ise apoptoza uğrayarak ömürlerini tamamlarlar [3, 4].

Osteoblastlar tarafından üretilen kemik matriks proteinleri arasında kollajen olmayan proteinlerden olan ve K-vitamini bağımlı bir peptid olan 'Osteokalsin' ve 'Osteonektin' gibi proteinler, 'Kemik Siyaloproteinleri I ve II', 'Osteopontin' ve

'Trombospondin' gibi glikoproteinler ve çeşitli proteoglikanlar bulunmaktadır [2]. Matriks komponentleri, hücre yüzeyinde, mevcut kemik matriksi ile etkileşerek salgılanır. Bu salgılamamanın sonucunda, osteoblast katmanı ve mevcut kemik yüzeyi arasında 'Osteoid' adı verilen, özgün kollajenden zengin bir tabaka oluşur. Kemığın bu mevcut kemik üzerine depolanarak büyümesi, yeni oluşan matriks içerisinde kalsiyum tuzlarının birikimi sonucunda tamamlanır [3].

Matriks mineralizasyonu süreci tam aydınlatılamamıştır. Fakat başta osteokalsin olmak üzere, diğer glikoproteinlerin kalsiyum iyonunu bağladığı bilinmektedir. Osteoblastlar ayrıca, özellikle Alkale Fosfataz'dan ve diğer enzimlerden zengin olan 'Membran-Bağlı Matriks Vezikülleri' salgılayarak lokal fosfor iyon konsantrasyonunu artırır. Kalsiyum ve fosfor iyonlarının birleşmesi ile 'Hidroksiapatit Kristalleri' $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ oluşur ve bu molekül, kalsifikasyonun ilk gözle görünür aşaması olarak kabul edilmektedir. Bu kristaller, mineral birikimi ile hızlıca büyür ve nihayetinde kollajen lif ve proteoglikan içeren kalsifiye bir kitleye dönüşürler [3].

Osteoblast aktivitesi birtakım hormonlar ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir. Osteoblastların hücre zarlarında Paratiroid Hormon, Tiroid Hormonu, Büyüme Hormonu, İnsülin, Progesteron ve Prolaktin reseptörleri bulunmaktadır. Bu hormonlar aracılığı ile hem osteoblast aktivitesi hem de fizyolojik homeostaz mekanizmaları endokrin olarak düzenlenmektedir [6].

Osteoblastlarda, 'İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü', 'Platelet Kökenli Büyüme Faktörü', 'Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta' gibi büyüme faktörlerinin reseptörleri de bulunmaktadır ve aktiviteleri bu faktörler aracılığı ile otokrin ve parakrin olarak düzenlenmektedir [7]. Güncel çalışmalarda, EGF'nin, osteoblastların çoğalmasını uyardığı ancak farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir [8]. Ayrıca osteoklastlar tarafından salgılanan 'Klastokin' tarafından da osteoblast aktivitesi inhibe edilmektedir [3].

2.2.2. Osteositler:

Osteositler kemiğin daimî hücreleridir. Kemik hücrelerinin yaklaşık olarak %90-95'ini oluştururlar ve ömürleri yaklaşık olarak 25 yıla kadar uzayabilmektedir [4]. Osteoblastlardan türeyen osteositler, matriksin arasında 'Laküna' adı verilen boşluklarda bulunurlar [2].

Osteositler kemik matriksinin devamlılığında sorumlu hücrelerdir. Osteositlerin rollerinden biri de mekanotransdüksiyondur ve osteosit, kemiğe uygulanan mekanik güçlere bu süreçle yanıt verir [2]. Her laküna içerisinde tek bir osteosit bulunur. Osteositler, özelleşmiş hücreler arası bağlantılar sayesinde, birbirleri ile ilişki içerisinde bulunurlar ve bu ilişki aracılığı ile molekül transferi sağlar.

Osteositler, osteoblastlar ile karşılaştırıldığında, yassı, badem şeklindedirler. Işık mikroskopisinde, epeyce azalmış 'Granüllü Endoplazma Retikulum', 'Golgi Organı' ve daha koyulaşmış 'Kromatin' sergilerler. Bu hücreler aktif olarak kemik matriksinin bakımından sorumludurlar ve ölümlerini takiben matriks erimesi görülür [3].

Osteositlerin travma ya da apoptoz ile ölmeleri, osteoklast aktivitesi tarafından kemik matriksinin rezorpsiyonu ile sonuçlanır ve bunu kemik dokusunun osteoblast aktivitesi tarafından onarımı ya da yeniden şekillenmesi takip eder [2].

Osteositler, azalmış perinükleer sitoplazmaları nedeniyle tipik olarak öncüllerinden küçüktürler. Sıklıkla rutin hazırlanmış mikroskopik numunelerde, hücre, kemiğin kesit öncesi matriks dekalsifikasyonundan kaynaklanan büzüşme ve diğer artefaktlar nedeniyle yüksek düzeyde biçim bozukluğuna uğramıştır. Böyle durumlarda nükleus tek belirgin özellik olabilir [3].

2.2.3. Osteoklastlar:

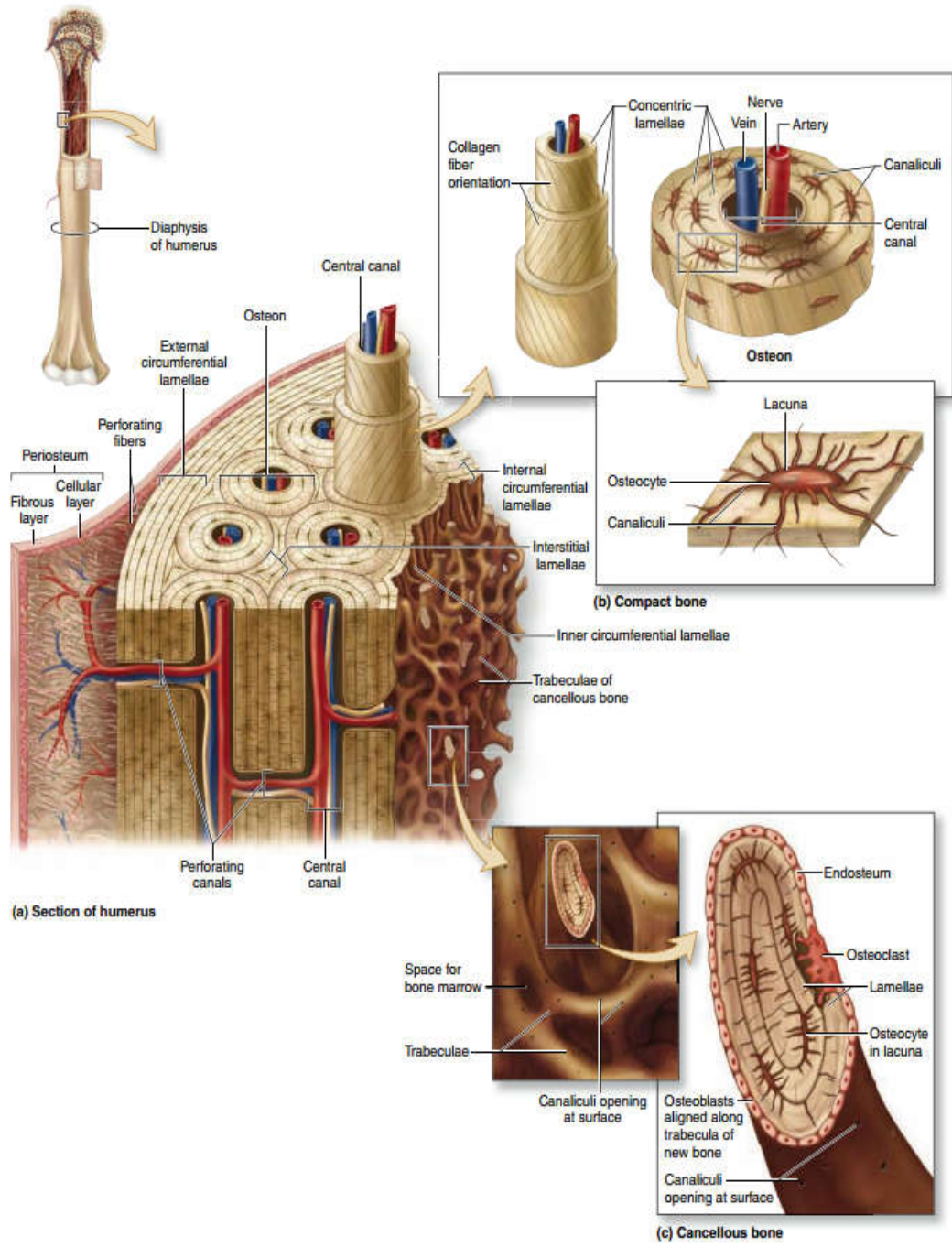
Osteoklastlar, diğerk kemik hücrelerinden çok daha büyük olan ve hareket kabiliyeti olan hücrelerdir. Hücre gövdesinde çekirdek sayıları 5 ila 50'ye kadar değışkenlik gösterebilir. Osteoklastlar, kemik rezorpsiyonu sonrası oluşan, enzimlerin lizisi ile meydana gelmiş ve 'Howship Lakünası' adı verilen çukurlarda bulunurlar [3].

Osteoklast oluşumu, kemik iliğindeki stromal hücrelerle yakın ilişki sonucu meydana gelmektedir. Stromal hücreler, Granülosit-Monosit öncül hücrelerden osteoklastların ve makrofajların farklılaşması için gerekli olan sitokinleri salgılamaktadırlar [2].

Aktif osteoklastlarda, kemik matriksine bakan yüzeyde, fırçamsı kenar yapısı görülmektedir. Fırçamsı kenarı, hücre organellerini içermeyen, aktin filamanlarından zengin bir sitoplazma kuşağı çevreler. Bu kuşak aracılığı ile osteoklastlar kemik matriksine yapışmaktadır. Osteoklast aktivitesi, esas olarak fırçamsı kenar aktivitesi ile sağlanmaktadır [3].

Osteoklastlar, 'Tartrat-Rezistant Asit Fosfataz', 'Katepsin K', gibi lizozomal enzimleri salgılayarak fırçamsı kenar aracılığı ile kemik matriksine salgırlar. Bu enzimler aracılığı ile hidroksiapatit kristallerinin kollajen bağları koparılır ve kalan kollajen lifleri osteoklastlar tarafından geri alınır [7].

Osteoklast işlevi de diğerk hücreler gibi çeşitli hormonlar ve sitokinler ile kontrol edilir. Osteoklastlar, kalsiyum metabolizmasında görevli olan 'Kalsitonin' reseptörlerini içermektedirler. Ayrıca osteoklastlar üzerinde Androjen, Tiroid Hormonu, İnsülin, PTH, IGF-1, IL-1, CSF-1 ve PDGF reseptörlerinin varlığı da gösterilmiştir [7]. EGF'nin de osteoklast öncüllerinin çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir [8]. Öte yandan, osteoklast aktivitesi osteoblastlar başta olmak üzere çeşitli hücreler tarafından salgılanan 'Osteoprotegrin' ile inhibe edilir [3].



Şekil 2.1. Kemiğin genel yapısı ve temel hücreleri (Mescher A.L., 2016).

2.3. KEMİK MATRİKSİ

Kemik doku, diğer dokulardan daha az hücresel olan ve temelde hücre-dışı kemik matriksinden oluşan bir dokudur. Kemik matriksi; mineral, protein, su, tuz, lipidler, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşan karmaşık bir dokudur. Kemik matriksi temel olarak osteoblastlar tarafından oluşturulur. Kemik dokusunun %30'unu, kemiğe esneklik özelliğini kazandıran 'Organik Matriks' oluştururken, %70'ini 'İnorganik Matriks' ve hücreler oluşturur [9]. (Tablo 2.1.)

Matriksin organik kısmı, temelde tip I kollajen, daha az miktarda tip V kollajen, proteoglikan ve bazı glikoproteinleri içermektedir. Tip III, XI ve XIII gibi diğer tipler de eser miktarlarda bulunmaktadır. Bütün kollajen molekülleri, kemik matriks proteinleri'nin toplam ağırlığının %90'ını oluşturmaktadırlar [9].

Kemik matrikste, kemik dokunun ara maddesini oluşturan diğer matriks proteinleri de bulunmaktadır. Bu proteinler, kemik matriksinin toplam ağırlığının sadece %10'unu oluştursa da kemik gelişimi, büyümesi, yeniden şekillenmesi ve kırık iyileşmesinde gereklidirler. Osteokalsin, osteonektin, osteopontin, fibronektin, BMP, kemik sialoprotein I ve II ve 'Büyüme Faktör'leri kollajenöz olmayan proteinlerine örnek verilebilir. HA, Kondroitin Sülfat ve Keratan Sülfat, proteoglikanları oluşturur. Hem kollajen içerik hem de ara madde, esas kemik dokusunu oluşturmak için kalsifiye olurlar [4].

Kemik matriksinin kuru ağırlığının %50'si inorganik maddelerden oluşmaktadır. Kalsiyum ve fosfor hakimiyetine rağmen, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da bulunur. Elektron mikroskopi görüntülerinde, kemiğin hidroksiapatit kristalleri, kollajen lifçiklerin yanına yatmış tabakalar halinde, ancak etrafları ara madde ile sarılı halde görülürler [3].

Kemik glikoproteinlerinin, matriks kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Minerallerin kollajen liflerle ilişkisi, kemik dokusunun sertliği ve direncinden sorumludur. Kemiğin kalsiyumu ortadan kaldırıldığında, şeklini korur, ancak tendon kadar esnek bir hale gelir. Çoğu kollajenden oluşan matriksin organik kısımları çıkarıldığında, kemik yine orijinal şeklini korur, ancak kırılabilir hale gelir [9].

Tablo 2.1. Kemik Matriks Bileşenleri

BİLEŞEN	FONKSİYON	TİPLER	ÖZELLİKLER
<i>ORGANİK MATRİKS</i>			
Kollajen	Gerilim gücü sağlama	Primer olarak Tip 1 Daha az miktarda Tip 5, Tip 3, 11, 13 Kollajen	Organik Matriks'in %90'ını oluşturur.
Proteoglikanlar	Basınç kuvvetlerine karşı direnç	Hyalüronik Asit	Kayganlaştırıcı ve su emici
		Kondroitin Sülfat	Şok emici özellik
		Keratan Sülfat	Protein ligandlarının hücrel tanınması
Kollajen Olmayan Proteinler	Mineralizasyon ve kemik oluşumunu artırmak	Osteokalsin	Osteoklastlar üzerine etkili, Kemik yoğunluğu regülasyonu, En çok bulunan KOMP (%10-20)
		Osteonektin	Kalsiyum regülasyonu
		Osteopontin	Hücre bağlayıcı protein
Büyüme Faktörü ve Sitokinler	Kemik hücresi farklılaşması, Aktivasyonu, Büyümesi ve Kemik Döngüsü'nde görevli	TGF-Beta, IGF, IL-1, IL-6 BMP	
<i>İNORGANİK MATRİKS</i>			
Kalsiyum Hidroksiapatit	Kompresif Güç		İnorganik matriksin büyük kısmını oluşturur. Primer Mineralizasyon
Osteokalsiyum Fosfat			Geriye kalan inorganik matriksi oluşturur.

2.4. PERİOSTEUM VE ENDOSTEUM

Vücutun diğer dokularında olduğu gibi, kemik dokuyu da örten bağ dokusu katmanları mevcuttur. Kemik dokunun iç yüzeyini örten bağ doku tabakasına 'Endosteum', dış yüzeyini örten bağ doku tabakasına ise 'Periosteum' adı verilir [3].

Periosteum, fibro-vasküler zar yapısında olan özelleşmiş bir fibröz dokudur. Bu iyi damarlanmış fibröz kılıf, kemiğin hemen hemen tüm dış yüzeyini örtmektedir [10]. Periosteumun kollajen lif demetlerinden oluşan ve 'Sharpey Lifleri' adı verilen kısmı, matriks içine girerek periosteumu kemiğe bağlar [3]. Periosteum, kemiğin diyafiz kısmında daha kalın bir yapıda iken, metafiz ve epifiz bölümlerinde çok daha incedir [10].

Mikroskopik olarak, periosteum, dış kısımda fibröz, iç kısımda ise hücresel yapıdadır. Fibröz dış kısım, temel olarak fibroblast, kollajen ve elastinden oluşmaktadır. Bu yapısı sayesinde, periosteuma esneklik özelliğini kazandırmaktadır. Ayrıca, dış kısımda bulunan damar ve sinir ağı sayesinde periosteumun beslenmesi ve innervasyonu sağlanmaktadır [11].

Periosteumun hücresel olan iç kısmına 'Kambiyum' adı verilir ve kemik yüzeye en yakın olan bu bölge temel olarak 3 ayrı katmandan oluşur. Kemiğe en yakın olan katmanda osteoblastlar ve osteoprogenitör hücreler bulunmaktadır. Ara katmanda, kapiller damarlar ve hücre dışı matriks bulunmaktadır. En dış katmanda ise fibroblastlar ve bunların salgıladığı kollajen lifler bulunmaktadır. Kambiyum tabakası, kortikal kemiğin üzerine normal ikincil kemik üretimi ile kemiğin enine büyümesini ve kırık sonrası birincil kemiğin oluşumu ile kırık iyileşmesini sağlamakla görevlidir [10].

Endosteum ise kemik içindeki tüm boşlukları kaplar ve tek tabaka halinde osteoprogenitör hücreler ile az miktarda bağ dokusu içerir. Endosteum tabakası, periosteum tabakasından çok daha ince bir yapıdır [3].

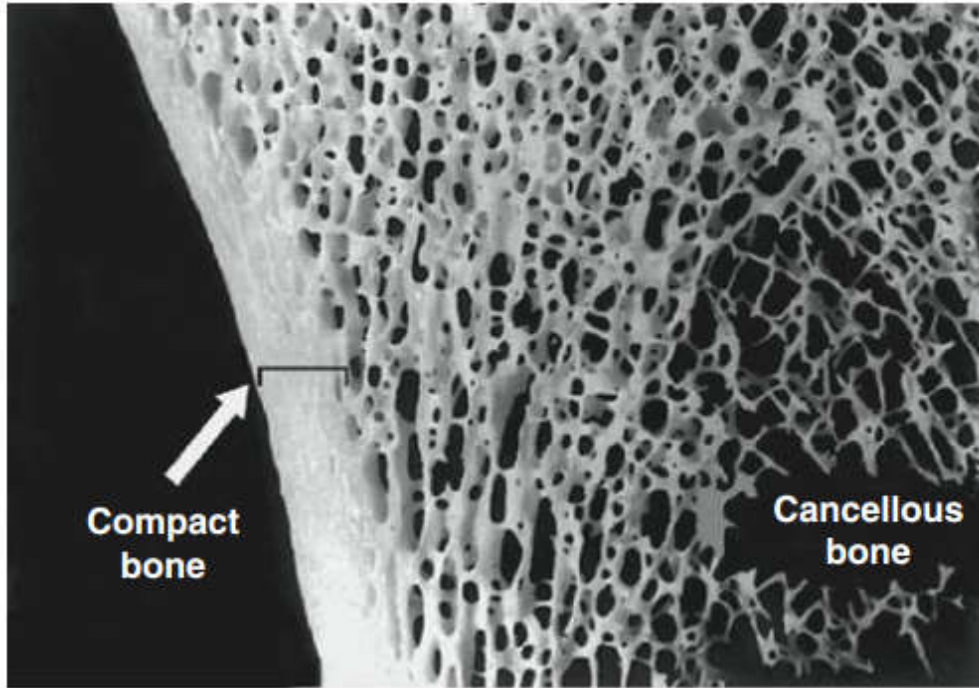
2.5. KEMİK TIPLERİ

Kemiklerden alınan histolojik kesitlerde, boşluk içermeyen ‘Kompakt Kemik’ ve çok sayıda birbirine açılan ve ‘Spongiöz Kemik’ adı verilen boşluklar görülür [3]. (Şekil 2.2.)

Uzun kemikler, uç kısımlarda, ‘Epifiz’ adı verilen küremsi kısımlar ile; orta kısımlarda ‘Diyafiz’ adı verilen, tamamına yakını oluşturulan silindirik kompakt kemik ile kemik iliği boşluğuna bakan az sayıda spongiöz kemikten oluşmaktadır [3].

Olgun spongiyöz kemik, yapı olarak dokusunun trabeküller ya da spiküller olarak düzenlenmiş olması dışında olgun kompakt kemiğe benzer. Kemik dokusunun arasında birbiri ile birleşen çeşitli boyutlardaki kemik ililği boşlukları bulunmaktadır. Spongiöz kemiğin matriksi lamellidir [2].

Kemikler mikroskopik olarak Birincil Kemik ve İkincil Kemik olarak ikiye ayrılmaktadır.



Şekil 2.2. Kompakt kemik ve trabeküllerden oluşmuş spongiöz kemik (Mescher A.L., 2016).

2.5.1. Birincil Kemik:

Olgunlaşmamış, kaba lifli veya örgü kemiktir. Kemik metabolizması hızlandığında, kemik matriksinin ani birikimi sonucu 'Birincil Kemik' oluşur. Birincil kemik, erken enkontral kemikleşme, membranöz kemikleşme, kırık kallus oluşumu, periosteal reaksiyon veya tümör hücre oluşumu gibi ani kemik oluşumunu gerektiren durumlarda görülebilir. Ayrıca embriyonun gelişimin sırasında da beliren ilk kemik dokudur. Genellikle geçicidir ve özel bazı bölgeler haricinde ikincil kemik ile yer değiştirirler [1].

Birincil kemikte, kollajen lifler düzensiz sıralanmışlardır ve daha az mineral içermektedirler. Birincil kemiklerde, ikincil kemiklere nazaran daha fazla osteosit bulunmaktadır [3].

2.5.2. İkincil Kemik:

İkincil kemik dokusu genellikle iskelet gelişimini tamamlamış yetişkin bireylerde görülmektedir. İkincil kemik dokusu, kanalcıklar içindeki kollajen liflerin, birbirlerine paralel olarak veya bir damar kanalı etrafında dairesel olarak düzenlendiklerini gösterir. Bu şekilde organize olmuş ve kan damarı, sinir, gevşek bağ doku ve kemik kanalcıkları içeren karmaşık sisteme 'Haversian Sistemi' veya 'Osteon' adı verilir. Haversian sistemini çevreleyen ve amorf madde çökeltisinden oluşan minerallenmiş matrikse de 'Yapıştırıcı Madde' adı verilir [2].

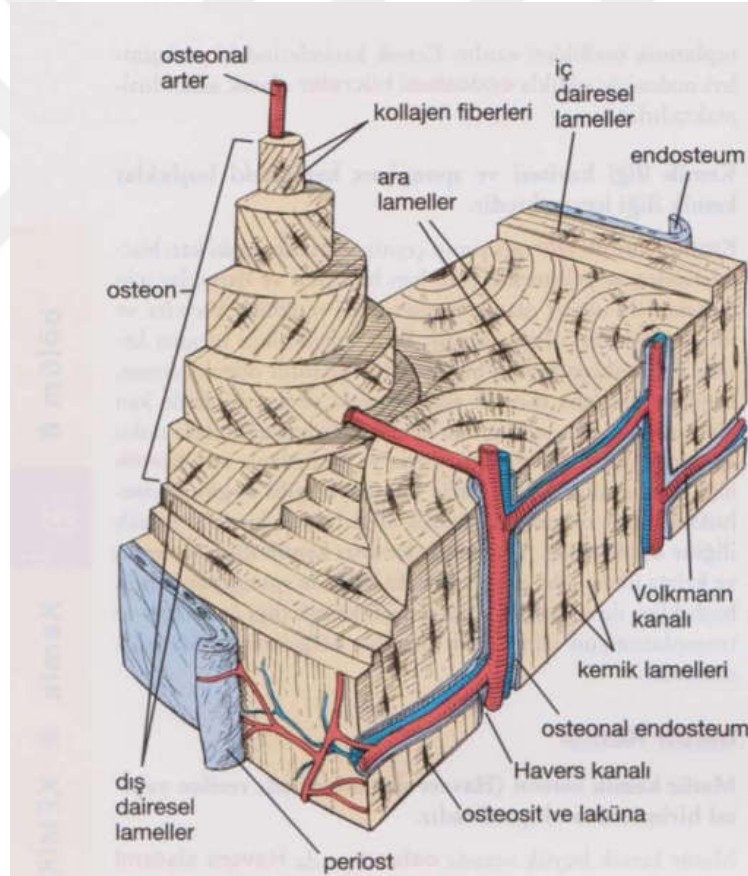
Uzun kemiklerin diyafizlerinde bulunan kompakt kemik lamelleri, haversian sistemi ile dış, ara ve iç lamellerden oluşan tipik bir dairesel düzen gösterirler. Bu nedenle, ikincil kemiğe 'Lamellar Kemik' adı da verilmektedir [2]. Sayıca dıştaki lamel sistemi, içteki lamel sisteminden daha fazladır [4].

İki dairesel sistem arasında, pek çok haversian sistemi ile ara lameller bulunmaktadır. Bu yapılar kemik büyüme ve yeniden modellenme sürecinde, yıkılmış haversian sistemlerinin lamelciklerinden arta kalanlardır. Her haversian sistemi, diyafizin uzun eksenine paralel bir silindirdir. Etrafı 20'ye yakın dairesel lameller ile sarılı merkezi kanaldan meydana gelmektedir [3]. (Şekil 2.3.)

Kanallar endosteum ile örtülüdür ve her kanalda kan damarı, sinir ve gevşek bağ dokusu mevcuttur. Haversian kanalları, içte kemik medullası ile, dışta ise periosteum ile ilişki halindedir. Bu ilişki, 'Perfore Edici Kanallar' adı da verilen 'Volkmann Kanalları' ile sağlanmaktadır [2].

Kemik dokusu içinde bulunan besleyici damar kanalları, damarların etrafını saran matriks oluşumu ile oluşurlar [3].

Dinamik bir doku olan kemik dokusu, sürekli yeniden şekillendiği için, haversian kanal sistemi, çevreden içeriye doğru lamellerin birikmesi ile meydana gelir. Böylelikle henüz oluşmaya başlamış sistemlerin kanalları daha büyüktür [4].



Şekil 2.3. Kemiğin lamellar yapısı ve Haversian sistem (Ross M.H., 2014).

2.6. KEMİK DOKUNUN BESLENMESİ

Kemik doku, kardiyak çıktının %5 ila %10'unu alır. Kemik kan akımı, metabolik, hormonal ve otonomik dengeler tarafından düzenlenmektedir [5]. Temel olarak, uzun kemikler, kanı 3 kaynaktan almaktadır. Bunlar 'Besleyici Arter Sistemi', 'Metafizyel-Epifizyal Sistem' ve 'Periosteal Sistem'dir [12]. (Şekil 2.4., Şekil 2.5.)

I. Besleyici Arter Sistemi:

Sistemik arterlerden dallanarak kemiğe ulaşırlar. Kemiğin diyafizyal kortekslerinde bulunan nutrisyonel foramenlerden girerler. Medüller kanala geçtikten sonra inen ve çıkan arterler olarak dallanırlar. Ayrıca, endosteal kortekste arteriyol dallarına ayrılırlar ve haversian sistemi yolu ile olgun diyafizyal korteksin en az üçte ikisini beslerler. Besleyici arter sisteminde kan basıncı yüksektir ve kortikal kemiğin beslenmesinin %60'undan sorumludur [12].

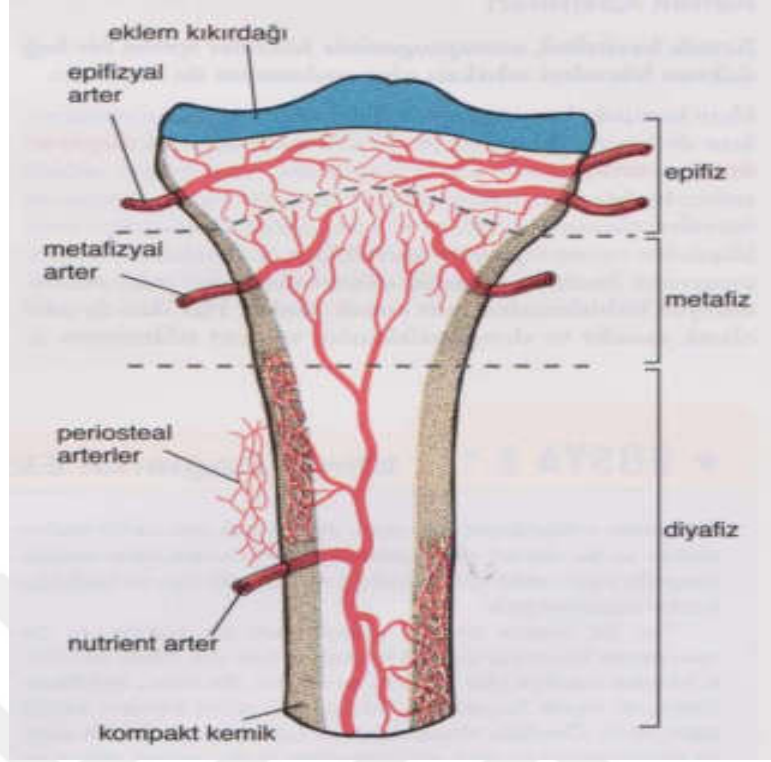
II. Metafizyel-Epifizyal Sistem:

Periartiküler vasküler pleksustan köken alır [12].

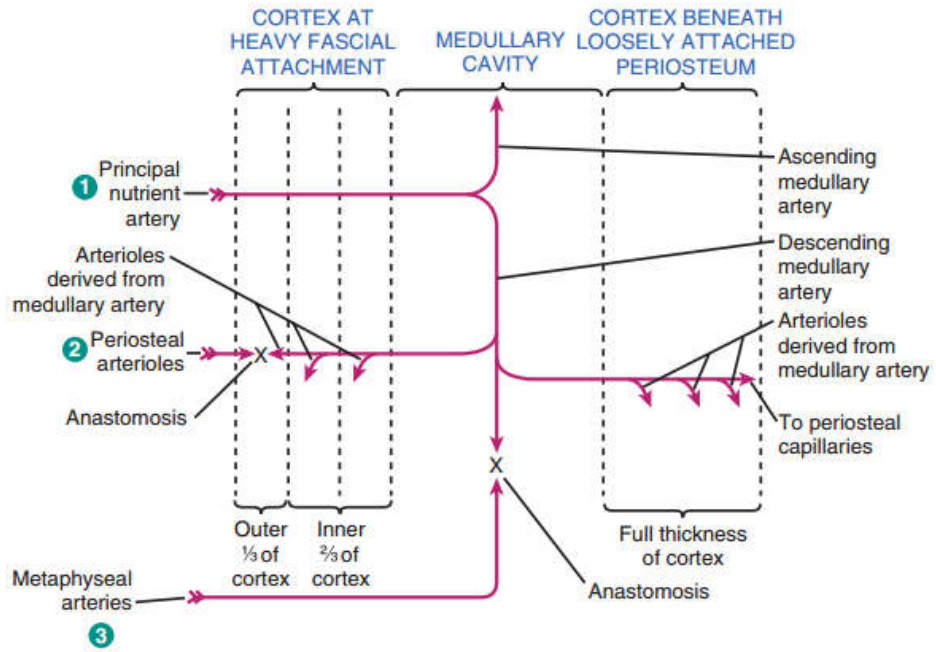
III. Periosteal Sistem:

Kan basıncının düşük olduğu bu sistem, çoğunlukla kapiller damarlardan oluşmaktadır. Olgun bir diyafizin maksimum üçte birlik dış kısmının beslenmesinden sorumludur [12].

Olgun kemikte kan akım yönü merkezden perifere doğrudur. Bu akım yönünün sebebi, yüksek basınçlı besleyici arter sistemi ile düşük basınçlı periosteal sistem arasındaki basınç farkından dolayı oluşmaktadır. Venöz akım ise olgun kemikte periferden merkeze doğrudur. Kortikal kapillerler, özel bir venöz sisteme drene olan venöz sinüzoidlere boşalırlar [6].



Şekil 2.4. Yetişkin uzun kemiğin kan desteği (Ross M.H., 2014).



Şekil 2.5. Kemiğin besleyici damar sistemi ve kan akımı (Miller M.D., 2016).

2.7. KEMİK YAPININ OLUŞUM MEKANİZMASI

İnsan vücudunda kemik yapı oluşumu 2 farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlar; osteoblastların salgıladıkları matrikse doğrudan minerallerin çökmesi sonucu 'İntramembranöz Kemikleşme' veya kıkırdak matriks üzerine kemik dokusunun oluşması sonucu 'Enkondral Kemikleşme' yollarıdır [3].

İki farklı tip kemikleşmenin varlığı, mevcut kemiğin intramembranöz kemik ya da enkondral kemik olduğu anlamına gelmez. Bu terimler sadece kemiğin ilk oluşum mekanizmasını tanımlamaktadırlar. Daha sonra meydana gelen yeniden şekillenme ile ilk oluşturulan kemik dokusunun yerine ileride yenisi geçmektedir. Yerine geçen kemik, önceden var olan kemiğin üzerine apozisyonel büyüme ile oluşturulur ve her iki durumda da özdeştir [2].

2.7.1. İntramembranöz Kemikleşme:

İntramembranöz Kemikleşme, özellikle yassı kemiklerin oluşumunda gözlenen kemikleşme türüdür. Bu kemikleşme türünün, kısa kemiklerin büyümesine ve kemik kalınlaşmasına da katkısı mevcuttur. Mezenkimal dokunun yoğunlaşması ya da başka bir deyişle 'Fibröz Membranlar' aracılığı ile oluşumu gerçekleşmektedir [3].

Mezenkimal hücrelerin yoğunlaşmaya başladığı noktaya 'Birincil Kemik Merkezi' adı verilir. Bir grup öncül hücrenin osteoblasta farklılaşması ile başlayan süreç sonucunda osteoblastlar tarafından kemik matriksi komponentleri üretilir ve bunu kalsifikasyon takip eder [2]. Son olarak, periosteum şekillenir. Bundan sonra kemiğin devamı ise, kemiğin her iki yanından başlayarak periosteum tabakalarından oluşur [13].

Matriks kalsifikasyonu sonrasında osteositlerin birbiri ile bağlantılı sitoplazmik uzantıları kanaliküller içinde yer alır. Apozisyonel büyüme ile spiküller büyürler ve gelişmekte olan kemiğin genel şekline sahip trabekül ağı halinde birleşirler. Devam eden mitotik aktivite ile osteoprogenitör hücreler sayılarını korurlar ve osteoblastlar kemik matriksi üreterek örgümsü kemiği meydana getirirler [2].

Süreç sonunda oluşan kemik doku birbiri ile birleşerek bağ dokunun yerini alır. Bağ dokusunun kemikleşmeyen kısımları endosteum ve periosteuma dönüşür. Oluşan kemik öncelikle birincil kemik olup, süreç içinde ikincil kemiğe evrilmiştir [3].

2.7.2. Enkondral Kemikleşme:

Küçük bir hyalin kıkırdak yapının kemikleşmesi sonucu oluşan kemikleşme sürecidir. Daha sıklıkla kısa ve uzun kemiklerin oluşumunda gözlenmektedir.

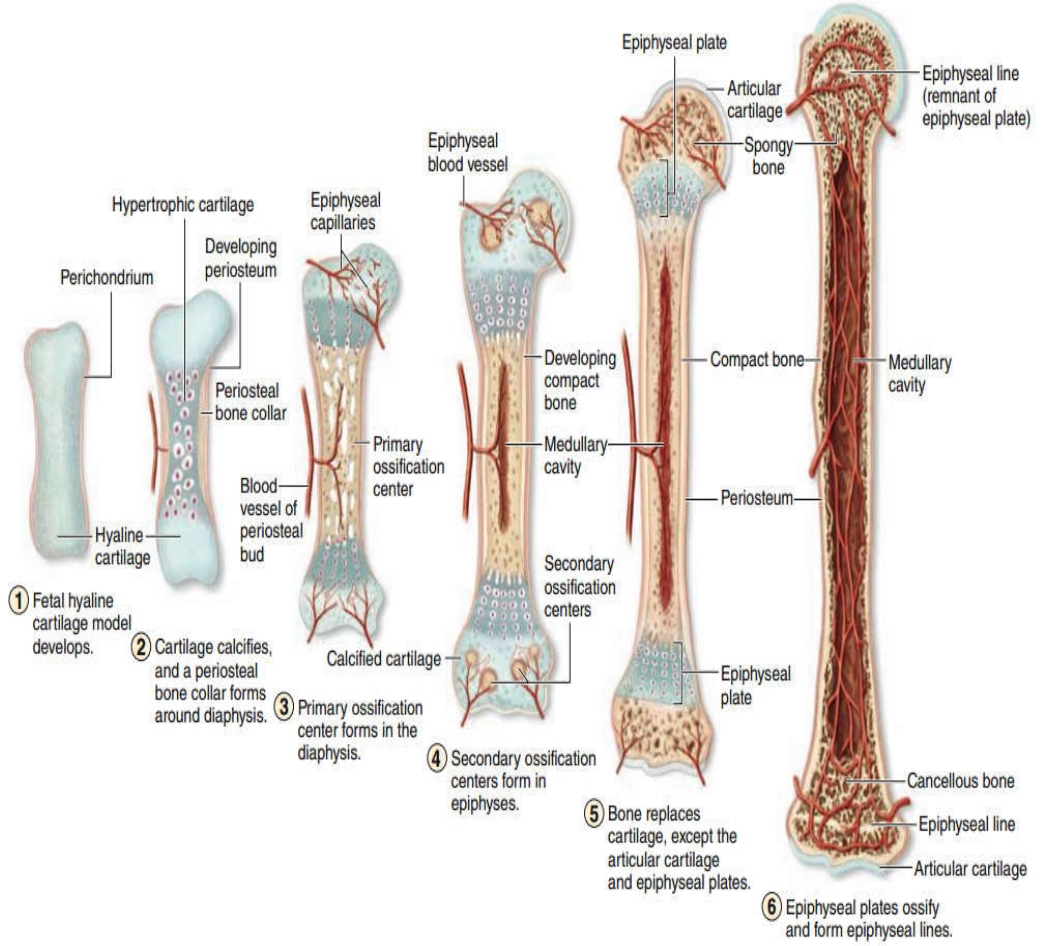
Enkondral Kemikleşme de mezenkimal hücrelerin gelecekte kemik olacak bölgede proliferasyon ve kümelenmeleriyle başlamaktadır. Farklı FGF ve BMP'nin etkisi altında, mezenkimal hücreler önce Tip II Kollajen eksprese ederler ve kondroblastlara farklılaşırlar. Bunlar da kıkırdak matriksi üretirler [2].

Başlangıçta ilk beliren kemik doku, kıkırdak modelin orta kısmını saran içi boş kemik silindiridir. Bu yapıya 'Kemik Halkası' adı verilmektedir. Kemik halkası, perikondriumun içinde zar içi kemikleşme ile meydana gelir. Bu bölgedeki kıkırdak hipertrofisi ve matriks kalsifikasyonu sonucunda kalsifiye olmuş kıkırdak matriksten oluşan 3 boyutlu yapı meydana gelir [2].

Bu süreci, kıkırdak modelde osteoklastlar tarafından kemik halkasına açılan deliklerden kan damarlarının ve osteoprogenitör hücrelerin taşınması takip eder. Oluşan osteoblastlar, kalsifiye kemik matriksine yapışırlar ve sürekli olarak birincil kemik tabakaları oluşturarak kıkırdağımsı kalsifiye matriksi sarmalarlar. Bu süreç sonunda bazofilik görünen kalsifiye kıkırdağa nazaran, oluşan birincil kemik eozinofilik görünmektedir [3].

Birincil kemik merkezlerinin oluşumunu takiben, kıkırdak modelinin uçlarında, ikincil kemikleşme merkezlerinin oluşumu gözlenir. İkincil kemikleşme merkezleri, kıkırdak modelinin uçlarındaki 'Epifiz' adı verilen şişkinliklerde oluşur. Birincil ve ikincil kemikleşme merkezlerinde zamanla kemik iliği ile dolan boşluklar oluşur. İkincil kemikleşme merkezlerinde, kemiğin diğer kemikler ile eklem yaptığı alanlarda ve kemiğin boyca büyümesinin gerçekleştiği epifiz bölgelerinde kıkırdak doku varlığını sürdürür. Eklem hattındaki kıkırdak alanlar, yaşam boyu varlıklarını sürdürürken, yetişkin döneme ulaşıldığında epifiz hatları tamamen kemikleşmektedir.

Epifizlerin kapanışları her kemiğe uygun kronolojik bir sırayı takip eder ve yaklaşık olarak 20'li yaşlarda tamamlanır [3]. (Şekil 2.6.)



Şekil 2.6. Uzun kemiklerin endokondral kemikleşme ile oluşum basamakları (Mescher A.L., 2016).

2.8. KEMİK DOKUNUN MİNERALİZASYONU

Kemik mineralizasyonu hücre tarafından düzenlenen hücre dışı bir olaydır. Mineralizasyon, bazı farklı dokularda da görülebildiği gibi kemikte ve kıkırdağın hücre dışı matriksinde de meydana gelmektedir [2].

Mineralizasyon, kollajen fibrillerde ve bunları çevreleyen ara maddede eş zamanlı olarak başlamaktadır. Mineralizasyon için kemik matriksine matriks veziküllerinin salgılanması gereklidir. Mineralizasyonun başlaması için kalsiyum ve fosfor iyonlarının matriksdeki konsantrasyonlarının belirli bir düzeyde olması gereklidir. [3]

Hücre dışı kalsiyumun osteokalsin ve diğer siyaloproteinler tarafından bağlanması bu iyon için yüksek bir lokal konsantrasyon sağlar. Yüksek kalsiyum konsantrasyonu osteoblastların ALP salgılamalarını uyarır ve bu da fosfor iyonlarının lokal konsantrasyonlarını artırır. Yüksek fosfor konsantrasyonu, mineralizasyonun başlayacağı alanda kalsiyum konsantrasyonunda daha fazla artışı uyarır. Hücre dışı kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun yüksek olduğu bu evrede osteoblastlar, kemik matriksi'ne ekzositozla 50-200 nm çapında küçük matriks vezikülleri salgırlar. Matriks vezikülleri, ALP ve fosfor iyonlarını, matriksin diğer moleküllerinden ayıran Pirofosfataz içermektedirler [2].

Kalsiyum biriktiren ve fosforu ayıran matriks vezikülleri lokal izoelektrik noktanın yükselmesine neden olur ve bu da çevreleyen matriks veziküllerinde kalsiyumfosfatın kristalizasyonu ile sonuçlanır. Kalsiyumfosfat kristalleri, osteoblastları çevreleyen matrikste hidroksiapatit kristallerinin oluşumu ve birikimiyle matriks mineralizasyonunu başlatırlar [4].

Osteoblast kaynaklı matriks vezikülleri, osteoiddeki ilk mineral birikim bölgesinin kontrolünde gerekli faktörlerdir. İlk hidroksiapatit kristalleri oluştuğunda, diğer matriks veziküllerinin çevrelerinde üretilen komşu kristallerle birleşinceye kadar üzerine eklenme yoluyla hızla büyürler. Bu yolla osteoid boyunca bir mineralizasyon dalgası hızla ilerler [2].

2.9. KEMİK DOKUNUN YENİDEN ŞEKİLLENMESİ

Kemik büyümesi genel olarak önceden meydana getirilmiş kemik dokunun eritilerek yıkılması ve eş zamanlı olarak yeni kemiğin oluşturulması ile ilişkilidir. Bu yöntem kemik büyürken şeklinin korunmasına olanak sağlar [3].

Yetişkinlerdeki yeniden şekillenme, iskeletin birçok yerinde eşzamanlı olarak gerçekleşen fizyolojik bir olaydır. Yetişkin olgun bir iskelette, kemiklerin yılda yaklaşık %10'luk bir oranda kayba uğramalarına rağmen total hacimleri sabit kalmaktadır [14]. Yetişkinlerde normal kemik yapının devamı için osteoklastik ve osteoblastik aktivite denge halinde olmalıdır [3].

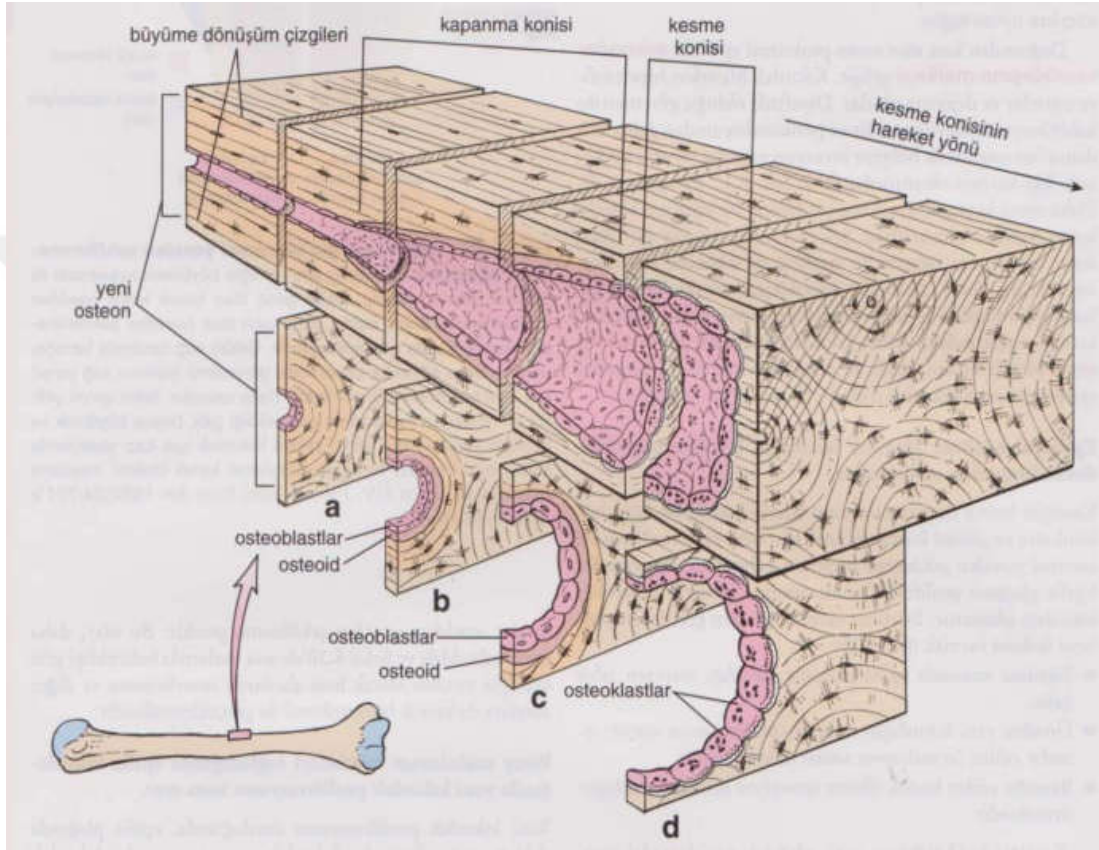
Osteoblastlar, 'Osteoblastik Osteoid' oluşumu ile yeni kemik matriksini salgılayarak, osteoklast'lar ise yeni oluşan trabeküller arasındaki kan damarlarından çekilerek "Osteoklast Delgisi" denilen kemik yıkımını sağlar [15] (Şekil 2.7.)

Kemiğin yeniden şekillenmesi birbiri ile iç içe geçmiş ancak birbirini izleyen aşamalardan oluşan bir döngü şeklindedir. Bu döngü, osteoklastların, pek çok hormon ve büyüme faktörleri tarafından uyarılmasıyla gerçekleşir [14]. Sessiz bir kemikte aktivasyon işlemi, mezenkimal kök hücrelerin osteoklastlara farklılaşmasıyla başlar. Yeniden şekillenmenin bu ilk aşaması "Sakin Dönem" olarak adlandırılır [16].

Ardından yerel sitokinler ve hormonların etkisiyle osteoklastik aktivite artar ve "Rezorbsiyon Dönemi" başlar. Bu aşama yaklaşık 2 hafta kadar sürer [7]. Kemik matriksinin yıkılması ile kemik matriksi içinde düzensiz yapıda 'Howship Boşlukları' ve 'Haversian Kanalları' şekillenir. Bu kavitelere gelmek üzere osteoblastlar aktive edilir [13].

Aktive olan osteoblastlar, kemik yıkımı sonucu açığa çıkan sitokinlerin salgılandığı bölgelerde toplanırlar. Bu aşamadan sonra artık osteoblastik aktivite başlar. Bu aşamaya ise "Tersine Dönme" denir [14]. Bu evre osteoklastların apoptozisi ile sonuçlanır. Bu aşamanın ardından osteoblastlar, osteoid sentezleyerek yeni kemik dokusunun oluşmasını sağladığı dönem olan "Yapım Dönemi" başlar [17].

Kemik yapımının tamamlanması yaklaşık 4-6 ay sürmektedir. Osteositler tarafından kontrol edilen, bütün işlemlerin sonlandığı ve normal bir kemik formunun tamamen şekillendiği dönem ise “Son Bulma” olarak adlandırılır [18].



Şekil 2.7. Kesme konisini ve kemik yeniden şekillenme basamakları (Ross M.H., 2014).

2.10. KEMİK DÖNGÜSÜNÜN KONTROLÜ

Sağlıklı bir insanın normal yaşam döngüsü çerçevesinde kemik yapım ve yıkımının harmonik bir dengede tutularak, olası patolojik kemik oluşumunu veya kemik kırıklarını engellemek amacı ile bir takım hormonal ve lokal faktörler tarafından denetlenmesi gereklidir. Bu faktörlerden bazılarının bu etkilerinin yanı sıra, vücuttaki kalsiyum-fosfor dengesinin idamesinde de rolü mevcuttur. Sistemik kontrolde birincil hormonlar 'PTH', 'D-Vitamini' ve 'Kalsitonin'dir. 'Östrojen' ve 'Tiroid Hormon'u ise ikincil etkili hormonlardır [6]. (Şekil 2.8.)

I. Paratiroid Hormon:

Paratiroid bezlerde üretilen polipeptid yapıda bir hormondur. PTH, serum kalsiyum-fosfor dengesinin en önemli düzenleyicisidir. Serum kalsiyumu fizyolojik alt değerin altına indiğinde, PTH sentezi ve aktivitesi artar. PTH etkisi ile osteoklastik aktivite uyarılarak kemik rezorpsiyonu artar ve serum kalsiyum konsantrasyonu yükseltilir [6].

PTH'nın kemik üzerinde ikili etkisi mevcuttur. Normal dozda, kortikal kemikte rezorpsiyon yaratır iken, düşük dozda, osteoblast oluşumunu uyarır ve osteoblastların yaşam süresini ve aktivitesini artırarak kemik üzerinde anabolik etki yaratır. Aynı zamanda, PTH, kemik yapımını ve mineralizasyonunu artırır [19].

II. D-Vitamini:

D-Vitamini'nin böbrek proksimal tübüllerinde aktiflenen formu olan 'Kalsitriol', serum kalsiyum ve fosfor değerlerini artıran bir hormondur. Kalsitriol'ün kemikteki etkisi ise, osteoklastik aktivite düzeyini artırarak, kemikten kalsiyum çözünümünü artırmaktır [6].

III. Kalsitonin:

Kalsitonin, Tiroid Bez'inden salgılanan ve polipeptid yapıda olan bir hormondur. Kalsitonin, doğrudan osteoklastik aktivite inhibisyonu ile kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. Kalsitonin, hem osteoklastlar'daki fırçamsı kenarların kaybolmasını hem de osteoklastların kemik üzerindeki hareketinin durmasını sağlar. Kalsitonin'in osteoblastlar üzerinde herhangi bir etkisi mevcut değildir [6].

IV. Östrojen:

Östrojen hormonu, fizyolojik kemik döngüsünde önemli bir rol oynar. Östrojen'in kemik üzerindeki etkisi, kemik hücrelerinin yaşam süresini düzenlemek ve osteoklast sentezini azaltmaktır. Osteoblastlardan OPG salınımını uyararak, osteoklastların olgun hale gelmesini engeller [6]. Östrojen, TGF-Beta üretiminin artmasına yol açarak, osteoklast apoptozisini hızlandırmaktadır.

V. Büyüme Hormonu:

Büyüme Hormonu, hipofiz bezinden salgılanan bir hormondur. Büyüme hormonu, çevre dokularda direkt veya IGF-1 üzerinden etkisini göstermektedir. IGF-1, kemik matriksinde en fazla bulunan büyüme faktörüdür. IGF-1 aynı zamanda osteoprogenitör hücreler tarafından da üretilebilir. Osteoblastların olgunlaşması için büyüme hormonu gereklidir. Kemığın yeniden şekillenmesi süresince, normal kemik dengesinin sağlanmasında da rol oynamaktadır [20].

EGF, IGF etkisinden bağımsız ve direkt olarak, büyüme plağındaki kondrositlerin çoğalmasını artırarak ve olgunlaşmasını baskılayarak kemik gelişimini uyarır. Osteoblastların çoğalmasını artırarak, farklılaşmasını inhibe ederek ve osteoklastların oluşumunu ve aktivitesini uyararak kemiğin yeniden şekillenmesini düzenlemektedir [8].

VI. Tiroid Hormonu ve Glukokortikoidler:

Tiroid hormonu, çocuklarda aksiyal büyümei sağlar ve kırıkta gelişimi ve farklılaşması için gereklidir. Erişkinde ise kemik rezorbsiyonunu artırır [6].

Glukokortikoidler, osteoblastlarda apoptoz artışına neden olur. Kemik yapımında azalma ve kemik yıkımında belirgin bir artışa neden olur [6].

VII. Receptör Activator of Nuclear Factor-KappaB:

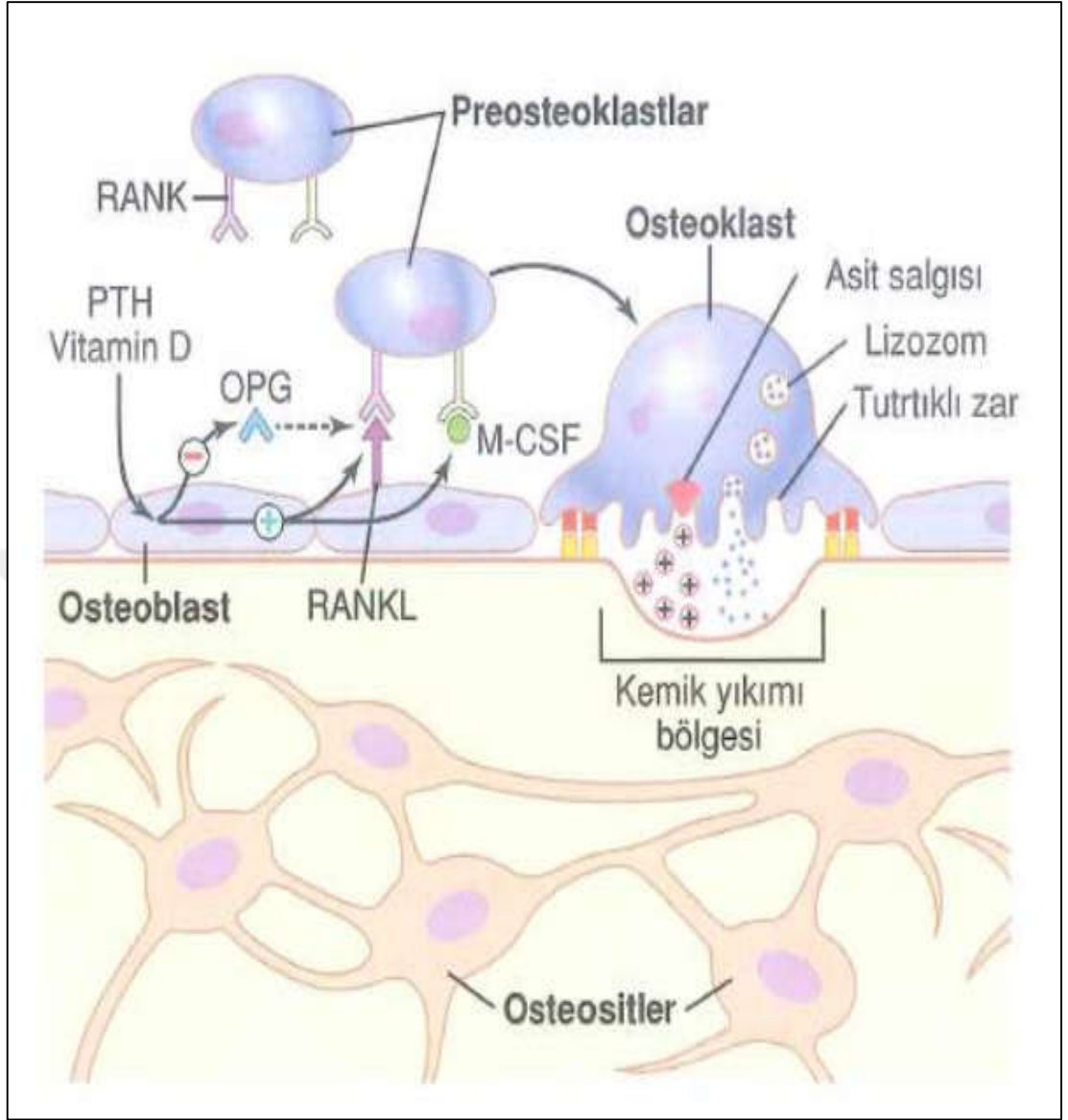
Lokal olarak üretilen en önemli osteoklastojenik sitokin 'Receptör Activator of Nuclear Factor-KappaB'dir. RANK, osteoklast öncül hücresinde bulunur ve osteoklastta farklılaşmasını uyarır. RANK sistemini aktifleyen RANK-Ligand, osteoblastlardan salgılanır. Olgun osteoklastın yaşaması, kemik yüzeyine bağlanması ve apoptozunun baskılanması için RANK-Ligand gereklidir [21].

VIII. Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör:

Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör, öncül osteoklastlar'ın olgun ve aktif osteoklast haline gelmesi için gerekli olan bir diğer sitokindir. M-CSF, kemik iliği ve osteoblastlardan salgılanır. Osteoklastın olgunlaşması, yaşaması ve rezorbsiyon görevini yerine getirebilmesi için RANK-L ile birlikte görev alır [21].

IX. Tuzak Reseptör Osteoprotegrin:

TNF ailesinden bir sitokin olan OPG, RANK-L/RANK etkileşimini bloke etmekle görevlidir. Temel olarak osteoblast tarafından üretilir. OPG, RANK-L ile birleşerek, osteoklast yüzeyindeki kendi özel reseptörü olan RANK'a bağlanmasını önler. RANK-L/RANK bağlantısı kesildiğinde, osteoklastların olgunlaşması ve kemik rezorbsiyonu engellenir. Ayrıca, osteoklastların apoptozunu engelleyici etkisi de mevcuttur [22].



Şekil 2.8. Kemik döngüsünün kontrolü (Hall E.J., 2017)

2.11. KIRIK TANIMI

Bir kemiğin ve çevre yumuşak dokunun yapısal devamlılığının bozulması durumuna veya başka bir tanımla kemik ve çevre yumuşak dokunun anatomik bütünlüğünün tam veya kısmi olarak bozulması durumuna kırık adı verilir [23]. Yapısal bütünlüğün bozulması makroskopik veya mikroskopik düzeyde olabilir. Kırık; kemikteki damarların, haversian kanalları'nın, periosteum ve çevresindeki yumuşak dokunun hasarlandığı, kırık uçlarındaki kemik dokunun nekroze olduğu bir yaralanmadır [5]. Bu sebeple bu tablonun bütününe kırık hastalığı terimini kullanmak daha doğru bir tanımlamadır.

2.12. KIRIK OLUŞUM MEKANİZMALARI

Sağlıklı bir kemik dokusunun, histolojik yapısı gereğince bir dereceye kadar elastisite özelliği mevcuttur. Kortikal kemik, kompresyon ve makaslama yüklerine daha dayanıklı iken gerilme yüklerine daha az dayanıklıdır. Bu sebeple, kırıkların çoğu gerilme yükleri sonucu oluşur [5, 23].

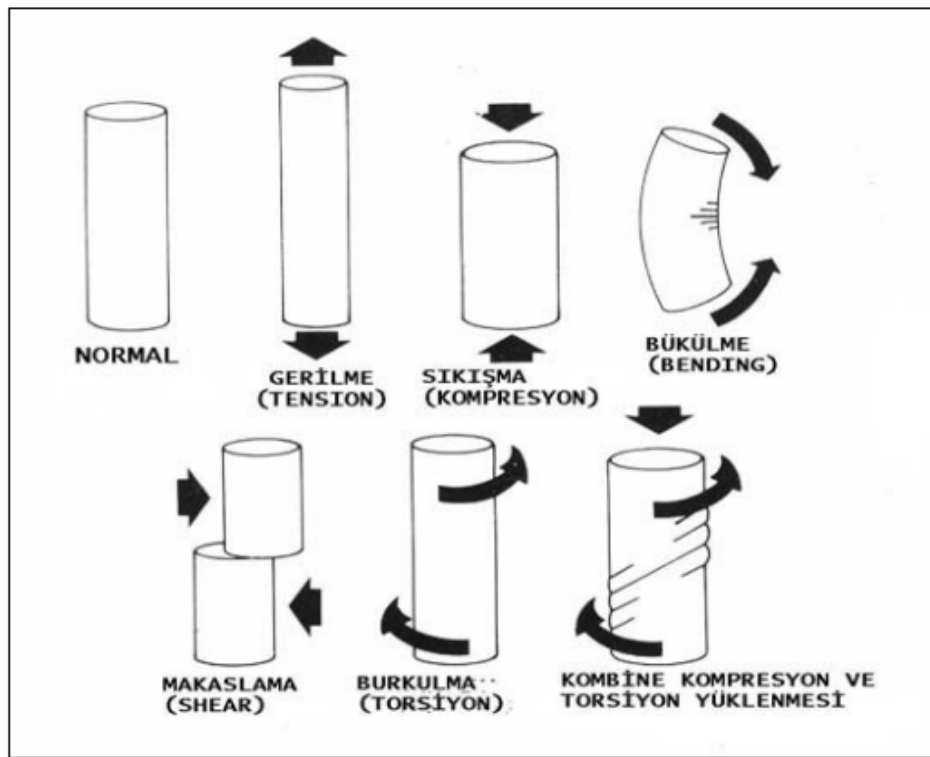
Doğrudan kemiğe veya kemiğin bulunduğu bölgeye gelen doğrudan bir kuvvet ile (vurma, ezilme, vb.) meydana gelen kırığa direkt kırık denir ve bu tip kırıklar genellikle transvers kırık şeklindedir ve yumuşak doku yaralanmaları eşlik edebilir [23].

Kemik eksenine paralel seyreden kuvvetlerin etkisi ile kemik dokunun en zayıf noktasında oluşan kırıklara ise indirekt kırık adı verilir. Bu tip kırıklar kopma, bükülme, makaslama, torsiyon mekanizmaları ile oluşabilir ve bu tip kırıklarda yumuşak doku hasarı nispeten da az görülür [5]. (Şekil 2.9.)

Bir uzun kemik üzerine binen açısal bir kuvvet, kemiği bükülmeye zorlar. Kemik doku ilk etapta bu kuvvete elastikiyeti ölçüsünde cevap verir. Ancak bu kuvvet, kemiğin elastisite sınırını aşar ise, kemiğin dışbükey tarafında aşırı gerilme nedeni ile kortikal kemik bütünlüğü bozulur. Bu kopma, bütün kemiği içine alırsa transvers veya oblik kırık oluşur.

Eğer kemik üzerine, döndürücü bir kuvvet biner ve elastisite sınırını aşar ise, kemikte spiral kırık meydana gelir. Kemik üzerine eğer ani bir çekme kuvveti gelir ise, kemiğe yapışan bağ veya tendonlar kemiğin bir kısmını çekerek avülsiyon (kopma) kırığına yol açarlar.

Spongioz kemik, kompresyon kuvvetlerine, kortikal kemiğe kıyasla daha az dayanıklıdır. Ani ve şiddetli bir kompresyon kuvveti kompresyon kırığı oluşturur [5,23].



Şekil 2.9. Kırık oluşum mekanizmaları (Alturfan A.K., 2002).

I. Kopma veya Gerilme Mekanizması ile Oluşan Kırıklar

Kemiklerin uç kısımlarına yapışan tendon, bağ vb. yapıların ani ve aşırı gerilmesi sonucu patella, olekranon, humerus tüberkulum majus vb. bölgelerde oluşan kırıklardır.

II. Bükülme Mekanizması ile Oluşan Kırıklar

Kemik üzerine gelen bükülme kuvveti, kemiğin en çok eğildiği yerde genellikle transverse nitelikte bir kırık oluşturur. Kırığı oluşturan kuvvet, kemiğin ortasına etki uygular ise, kırığın olduğu yerde kelebek tarzı parçalar oluşabilir. Kırığı oluşturan kuvvet, kemiğin her iki ucuna etki ederek de bükülme kırığı meydana getirebilir.

III. Kompresyon Mekanizması ile Oluşan Kırıklar

Kemik eksenine paralel fakat zıt yönlerde gelen kuvvetlerle oluşan kırıklardır. Genellikle spongiöz kemiklerde meydana gelir. Yüksekten düşme sonucu kalkaneus veya femurda görülen kırıklar ile omurga cisminde görülen kırıklar bu tip kırıklara örnektir.

IV. Makaslama Mekanizması ile Oluşan Kırıklar

Eğer kırığı oluşturacak olan kuvvetler, birbirlerine zıt ve paralel yönde zorlama yaparak kırık oluşturur ise, kemikte transverse kırık meydana getirirler.

V. Torsiyon Mekanizması ile Oluşan Kırıklar

Bu kırıklar en sık tibiada görülmektedir. Kırık hattı genellikle spiral karakterdedir.

2.13. KIRIK İYİLEŞMESİ

Yukarıda bahsedilen kırık oluşum mekanizmaları sonrası, anatomik ve fizyolojik bütünlüğün yeniden tesisi amacı ile, vücut, hasarlanan dokunun tamiri için bir takım mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmaların tümüne kırık iyileşmesi adı verilir [23].

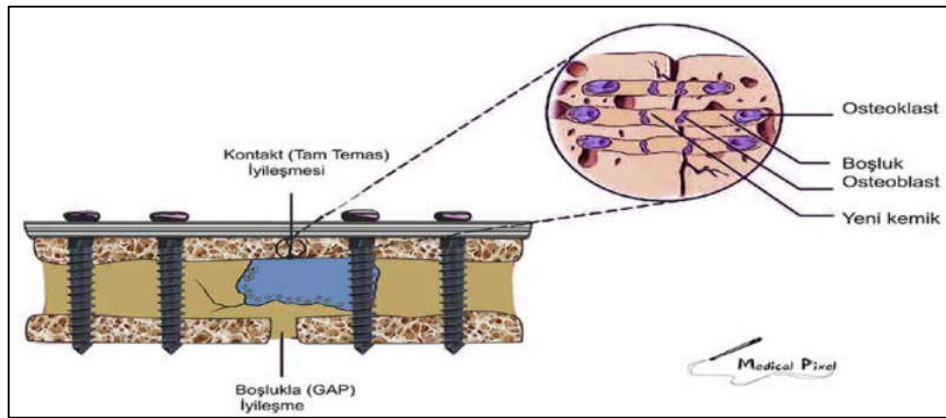
Kırık iyileşmesi, kemiğin yaralanma öncesi durumuna döndürülmesi amacı ile, özgün ve ileri derecede bütünlüğe ulaşmış olaylar silsilesini içermektedir [25]. Kırık iyileşmesi birçok anatomik, biyomekanik, biyokimyasal faktörün etkileşimiyle gerçekleşir. Bu nedenle, kemik; birçok dokudan farklı olarak, hasarlı bölgenin biyokimyasal ve biyomekanik olarak tamamen yeniden şekillenmesiyle iyileşir [5].

Kırık iyileşmesi Direkt veya Dolaylı yolla gerçekleşmektedir.

2.13.1. Direkt Kemik İyileşmesi:

Dolaylı Kemik İyileşmesi'ne nazaran daha az sıklıkla görülür ancak daha hızlı olan iyileşme türüdür.

Direkt iyileşmenin en önemli özelliği, kallus dokusunun oluşmadan, doğrudan osteoblastik ve osteoklastik aktivitenin kombinasyonu ile oluşan iyileşme türü olmasıdır [27]. (Şekil 2.10.)



Şekil 2.10. Doğrudan kemik iyileşmesi (Tanrıkulu S., 2017)

2.13.2. Dolaylı Kemik İyileşmesi:

Genel olarak daha sık karşılaşılan kırık iyileşme mekanizmasıdır. Kırık uçları arasında mikro-hareket olduğu zaman gözlenir. Kırık uçları arasında kallus dokusu oluşarak gerçekleşir. Kırık uçlarında ve periost dışında enkondral kemikleşme ile yumuşak kallus, kırık bölgesinde subperiosteal alandan intramembranöz kemikleşme ile medüller sert kallus oluşur [26].

Dolaylı kemik iyileşmesi temel olarak 3 ana fazdan oluşur (Şekil 2.11.).

- I. İnflamatuvar Dönem
- II. Onarım Dönemi
- III. Yeniden Şekillenme Dönemi

I. İnflamatuvar Dönem

Kemik kırığı takiben, kırık çevresi ile periosteal damarların yaralanmasından ve medüller kanaldan kaynaklanan kanamayı takiben kırık bölgesinde hematoma oluşur. Oluşan hematoma içerisinde kemik iliği hücreleri de mevcuttur. Hematom içerisinde, hematomu sınırlandırmakla görevli olan koagülatör hücreler ile koagülasyon sonucunda oluşan fibrin, onarıcı hücreler için çatı görevi görür ve bu hücrelerin bölgeye yerleşmesini uyarır. Ek olarak trombositlerden de çeşitli büyüme faktörleri salgılanarak lokal etki ile kırık iyileşmesi uyarılır. Sonuç olarak, hematoma, hematopoietik kök hücrelerin ve büyüme faktörlerinin kaynağını oluşturur [25].

Bu bölgedeki hasarlı osteositler ve matriks dokusu nedeni ile bir takım inflamatuvar mediatörler oluşur. Bu mediatörlerin başında gelen TNF-Alpha, TGF-Beta, IL-1 Beta, IL-6, IL-11, IL-17, IL-18 ve IL-23, damarlarda vazodilatasyona ve inflamasyondan sorumlu hücreler olan PMNL, lenfosit ve özellikle makrofajların bölgeye göçüne sebep olur. İnflamatuvar sitokinlerin uzun süreli salınımlarının kemik üzerindeki olumsuz etkileri bildirilmiştir, ancak kısa süreli kontrollü inflamatuvar yanıtın, kırık iyileşmesinde hayati olduğu bilinmektedir [5].

Travmadan sonra gözlenen vazokonstriksiyon sonrasında kırık bölgesinde hipoksi oluşur ve kırık uçlarındaki osteositlerde nekrotik değişiklikler görülür [26]. Makrofajlar, nekrotik yapıları fagosite eder ve bir takım sinyal molekülleri olan

BMP-2, BMP-7, FGF, TGF-Beta, PDGF ve IGF gibi büyüme faktörleri ile rejenerasyonu başlatır. Bu büyüme faktörleri; mezenkimal kök hücrelerin göçü, toplanması ve çoğalmasında rol oynamaktadır ve bu kök hücrelerden anjioblast, kondroblast, fibroblast ve osteoblast oluşumundan sorumludurlar [25].

Endotelial hücreler, fibroblastlar ve osteoblastlar; granülasyon dokusu oluşturarak kırık uçları arasındaki boşluğu doldururlar. İnflamatuvar dönem sırasında, ilkel bir kallus oluşur ve kırık uçları arasındaki kontrolsüz hareketi bir miktar da olsa sınırlandırır [26].

İnflamatuvar ve mezenkimal hücreler, farklılaşmayı uyarıcı etkilerini, osteoblast ve osteoklastlarda bulunan TNFR-1 ve TNFR-2 reseptörleri aracılığı ile gösterir. TNFR-2 sadece kırık iyileşmesinde gözlenir. Kırık iyileşmesinde pek çok inflamatuvar mediatör etkili olsa da, IL-1 ve IL-6'nın etkilerinin daha kritik olduğu bilinmektedir. Makrofajlar aracılığı ile salınan IL-1, osteoblastlardan IL-6 salınımını artırır. IL-6 etkisi ile kırıkta kallus oluşumu uyarılır ve ILR-1 ve ILR-2 reseptörleri aracılığı ile de anjiyogenez uyarılır. IL-6 ise sadece akut fazda salgılanır ve VEGF salınımını artırıcı, anjiyogenez uyarıcı ve osteoblast-osteoklast farklılaşmasını uyarıcı etkiye sahiptir [25].

Kambium tabakasında bulunan mezenkimal kök hücrelerin de iyileşmede kritik önemi bulunmaktadır. Bu kök hücrelerin artışından da BMP-2 ve BMP-7 sorumlu tutulmaktadır [26].

Lenfositler, kırık iyileşmesinin başlangıcında etkin değildirler, ancak kırık iyileşmesinin normal bir seyirde ilerlemesi için, sağlam bir hücresel yanıtı ihtiyaç vardır. Genel olarak doku hasarı, lenfositler immün sistemi tetikler ve genel bir immüsupresyon durumu yaratır. Stres hormonları ve inflamatuvar sitokinler, PgE2 ve Nitrik Oksit gibi inflamatuvar sitokinler T-Lenfosit sayısını azaltır ve aktivitesini kısıtlar. B-Lenfositler de, T-Lenfosit fonksiyon kısıtlılığına ikincil olarak hasardan olumsuz olarak etkilenmektedir [25].

Kırık bölgesinde eksprese edilen TNF-Alfa ve IL-1 aracılığı ile, nötrofil kemotaksiyonu artırılarak kırık bölgesine göçü sağlanır. Ancak, diğer hücreler, nötrofil göçünden olumsuz olarak etkilenmezler [26].

İnflamatuvar cevabı takiben, fibröz kallus dokusunda ve yeni oluşan kemik dokuda makrofajlar gözlenmiştir. Makrofajlar, kırık iyileşmesinin erken döneminde, kondrosit farklılaşmasını uyarmakta ve vaskülarizasyonu düzenlemektedir. Makrofajların, öncül hücrelerin farklılaşmasında da rolü olduğu düşünülmektedir [28].

Akut inflamatuvar yanıt, ilk 24 saatte en yüksek seviyeye çıkar ve 7. güne kadar devam eder. Başlangıç evresinde TNF-Alfa, IL-1, IL-6, IL-11 ve IL-18 düzeyinde artış görülür. TNF-Alfa ilk 24 saatte en yüksek seviyeye ulaşır ve 72. saatte tekrar normal seviyeye iner ve kemotaktik etkisiyle ikincil inflamatuvar etki yaratır [29].

Sonuç olarak, inflamatuvar dönemde, nekrotik dokular yok edilir, inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler sayesinde anjiogenez uyarılır. Kırık hattına göç eden mezenkimal hücreler, fibroblastlar ve osteoblastlar çoğalarak bir granülasyon dokusu oluşturur [26].

II. Onarım Dönemi

Hasarlı dokunun yerini granülasyon dokusuna bırakmasının ardından, artan hücre sayısı ve matriks üretimi ile kırık hematomunun organizasyonu başlar. Onarım dönemi ile, kallus dokusu oluşmaya başlar ve damarsal oluşum, osteoid salgılanması ve kollajen fibrillerin oluşumu ile karakterizedir [30].

İyileşme sürecinde BMP-2 aracılığı ile mezenkimal hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre göçü görülmektedir. mezenşimal kök hücreler, hipoksik ortamda, kondrositlere farklılaşırlar ve kondrositler aracılığı ile yumuşak kallus dokusu oluşur. Kondrositlerin farklılaşması, TGF-Alfa, PDGF, IGF-1 ve BMP-2 aracılığı ile uyarılmaktadır [31].

Dolaylı iyileşmede hem intramembranöz hem de encondral kemikleşme gözlenir. (Şekil 2.12.) İnflamatuvar dönemde oluşan granülasyon dokusunun ardından, kırık uçları arasında santral bölgede ve periostun dış kısmında encondral kemikleşme başlar. Bunun sonucunda, daha çok fibröz ve kıkırdak dokudan oluşan yumuşak kallus meydana gelir. Oluşan bu yumuşak kallus dokusunun mineralizasyonu, kondrositlerin apoptozu, anjiyogenez ve osteoblastların çoğalması ve encondral kemikleşme ile sert kallusa dönüşür [26].

Eş zamanlı olarak, subperiostal alanda, fragmanları birbirine bağlayan intramembranöz kemikleşme ile de sert kallus dokusu oluşur. İntramembranöz kemikleşmede mezenkimal kök hücreler ve osteoblastlar aracılığı ile de direkt kemik oluşumu sağlanır. TNF-Beta etkisi ile kırık dokunun oluşumu ve enkondral kemikleşme uyarılırken, BMP-5 ve BMP-6 ile de intramembranöz kemikleşme için gerekli hücrelerin çoğalması sağlanır [25].

İyileşme sürecinin başarılı olması için yeniden kanlanmanın sağlanması gerekir. Enkondral kemikleşmede kondrositlerin apoptozu, hücrelerin ve matriks dokusunun uzaklaştırılması, kan damarlarının bu bölgeye doğru büyümesi ve ilerlemesini sağlar. Damarlanma hem Anjiyopoetin ile hem de VEGF'ye bağlı olarak gerçekleşir. İyileşmenin erken döneminde Anjiyopoetin-1 ve Anjiyopoetin-2 artar. VEGF ise endotelial mezenkimal hücre çoğalmasını uyarır ve damar invazyonu ile avasküler kırık dokusunun vasküler kemik dokusuna dönüşümünü uyarır. Ayrıca mekanik uyarı ile kırık bölgesinde VEGFR-2 reseptörü üzerinden anjiyogenik etki gösterir [32].

Yumuşak kallusun, sert kallusa dönüşümünde de pek çok mediatör rol oynamaktadır. Bunların başlıcaları M-CSF, RANKL, OPG, TNF-Alfa'dır. Bu mediatörlerin etkisi ile mineralize kırık doku rezorpsiyonu başlar. Ayrıca bu mediatörlerin osteoklast ve osteoblastlar üzerine etkileri de mevcuttur. TNF-Alfa'nın hem kondrosit apoptozunda, hem de mezenkimal kök hücrelerin uyarılmasında etkisi mevcuttur [5].

Kallus dokusunda oluşan kondrositlerin sitoplazmasında mineral depolanması ile hidroksiapatit kristalleri oluşur. Sert kallus oluşumunun 14. günde en yüksek olduğu bildirilmiştir [33].

Sert kallus oluşumu arttıkça, mineralize kırık dokunun yerini örgü kemik almaya başlar ve iyileşme dokusu daha katı bir hale gelir. Onarım, kırık uçlarında kortikal kemik uçlarında birleşme oluncaya kadar devam eder. İyileşme dokusunun oluşum hızı, miktarı, içeriği ve şekli pek çok faktörden etkilenmektedir [5].

III. Yeniden Şekillenme Dönemi

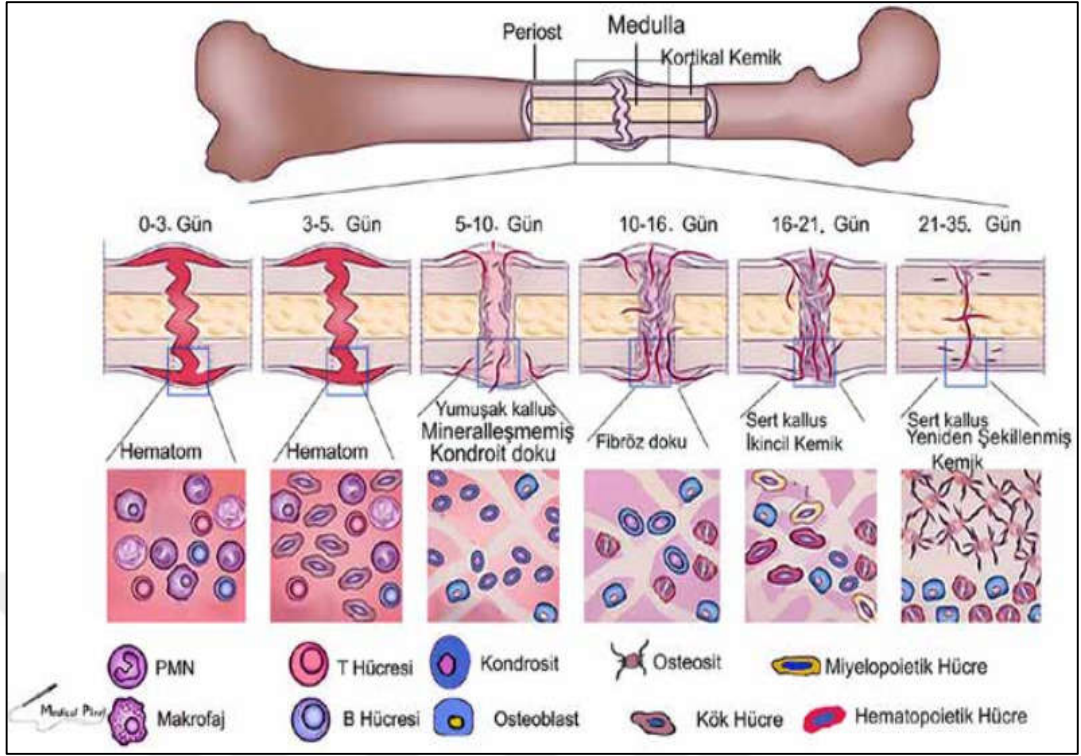
Sert kallus dokusu, stabiliteyi sağlayan daha katı bir yapı olmasına rağmen, biyomekanik olarak yeterli değildir. Bunun için sert kallusun santral kavitesi olan lamellar kemiğe dönüşmesini gerektiren bir sürece ihtiyaç vardır. Yeniden şekillenme döneminde bu yapı oluşmaktadır [26].

Bu dönemde, bir taraftan osteoklastların etkisi ile sert kallusun rezopsiyonu gerçekleşirken diğer taraftan osteoblastların etkisi ile yeni lamellar kemik oluşumu görülmektedir. Kırık onarımı esnasında 3-4. haftalardan itibaren başlayan bu süreç, yıllarca devam edebilmektedir [26].

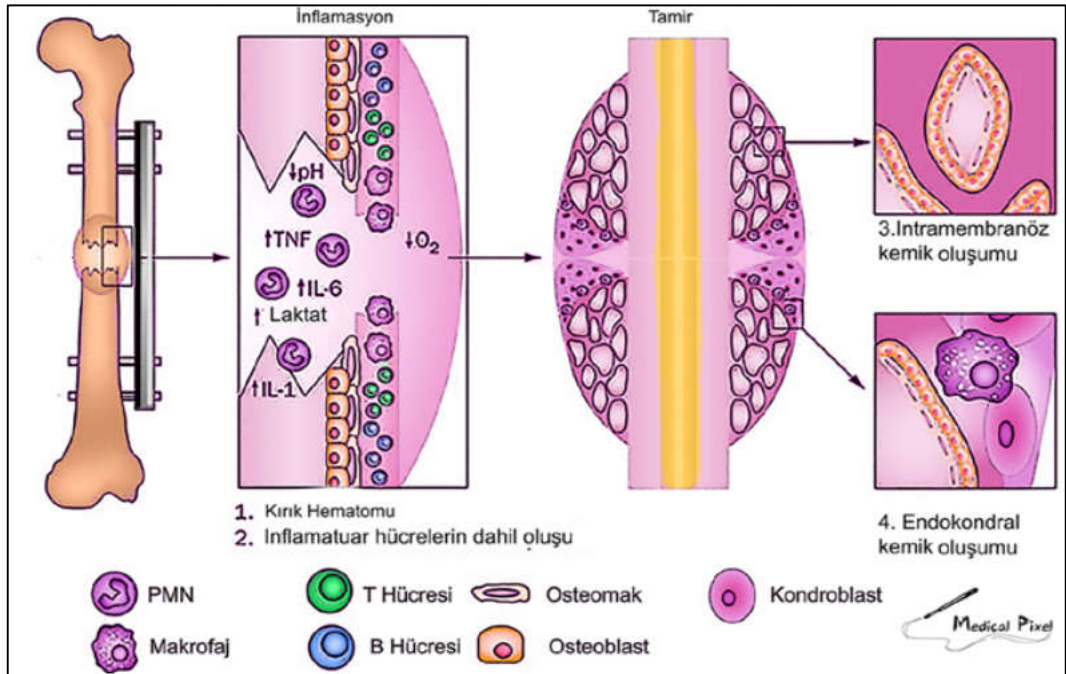
Osteoklastların mineralize yüzeylere yapışması ile kemik yeniden şekillenmesi devam eder. Osteoklast aktivitesi ile howship lakünaları oluşur ve bu bölgelere yerleşen osteoblastlar tarafından yeni kemik oluşumu sağlanır [34].

Diğer iki dönemde de olduğu gibi, bu dönemde de birtakım sitokinler rol oynamaktadır. Proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-1, IL-6, IL-11 ile artmış TNF-Alfa, IL-12 ve Interferon-Gama seviyeleri temel rol oynamaktadır. Ek olarak, bu dönemde, Büyüme Hormonu ile PTH da anahtar rol oynamaktadır [35].

Kemik, maruz kaldığı streslere bağlı olarak yeniden şekillenir. Aksiyel yüklenmeyle birlikte, kristalize dokuda oluşan elektriksel polariteye bağlı, elektropozitif konveks yüzeyde osteoklast; elektronegatif konkav yüzeyde osteoblast aktivitesini uyarır. Dış kallus dokusu lamellar kemiğe, iç kallus Medüller Kaviteye dönüşür. Onarım fazında oluşan örgü kemik, lamellar kemikle yer değiştirir ve iyileşme süreci tamamlanır [26].



Şekil 2.11. Dolaylı kemik iyileşmesi (Tanrıkulu S., 2017)



Şekil 2.12. Dolaylı kemik iyileşmesinde intramembranöz ve endokondral kemikleşme mekanizmaları (Tanrıkulu S., 2017)

2.14. KIRIK İYİLEŞMESİNİN DÜZENLENMESİ

Kırık oluşumu sonrasında, kırık iyileşmesinde görevli olan başta osteoblastlar ve osteoklastlar olmak üzere, hücrelerin toplanması ve bir düzen içerisinde görevlerini yapabilmesi için birtakım düzenleyicilerin rol oynaması esastır. Hüresel ve moleküler biyoloji alanında araştırmaların gelişmesi ile birlikte, bu mekanizmalar da daha anlaşılabilir hale gelmiştir.

Kırık iyileşmesinin erken döneminde, hücre döngüsü ve hücre-hücre etkileşimi ile ilgili genlerin ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır [36].

I. Prostaglandinler:

Hücre membranında bulunan Araşidonik Asit'ten üretilirler. Araşidonik Asit'ten Siklooksijenaz enzimi yardımıyla her biri doymamış bağlantıya sahip iki yan zincirle birlikte bir veya iki halka yapıdan meydana gelen değişik Prostaglandinler oluşur.

Prostaglandinler hücre duvarının ve kollajenin yaralandığı durumlarda sentezlenir. Prostaglandinlerin kemotaktik etkisi mevcuttur ve akut inflamasyonda görevlidirler. Güçlü vazodilatatör etkileri mevcuttur. Hücre çoğalmasını hızlandırır ve antikor yapımını düzenlerler [37].

PgE-2 ve PGI-2'nin kemik geri emilim gücü fazladır ve yeni kemik yapımını artırır. PGE-1 ve PGE-2 yeni kemik oluşumunu artırır. PGF-2 kondrojenizde görevlidir. Kemik geri emiliminde görevli olan ajanlardan EGF, TGF-Alpha, PDGF, Bradikinin ve Trombin etkilerini PGE2 aracılığı ile gösterir [38].

II. Dönüştürücü Büyüme Faktörü – Beta:

İnflamasyon ve doku rejenerasyonundan sorumludur. Tüm hücrelerden salgılanabilir ve vücutta bulunan tüm hücrelerde reseptörleri mevcuttur. Kemik matriksi ve travma sonucu açığa çıkan trombositlerden çok miktarda salgılandığı görülmüştür [39]. Ayrıca, kondrositler ve osteoblastlarda da sentezlenir. Kırıkta

hücre çoğalması ve encondral kemikleşme esnasında kemik matrikste birikir. Makrofajlardan da salınarak kemotaksisi artırır [36].

Hücrelerde bulunan reseptörlerini uyararak kollajen, fibronectin ve proteoglikanların oluşumunu artırır. Proteolitik enzimlerin baskılanmasını da sağlayarak granülasyon dokusunun oluşumuna yardım eder [26].

III. Kemik Morfogenetik Proteini:

Hasarlı kemik dokusu kaynaklı morfogenetik bir proteindir. BMP'lerin, kondrogenez ve osteogenez ile sonuçlanan oluşum kaskadını indüklediği bildirilmiştir [36]. Bu indüksiyonu mezenkimal, osteoprogenitör ve anjiogenik hücrelerin kemotaksisi, proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlayarak yapmaktadır. Kemik matriks sentezinde de rolü mevcuttur. 10 alt türü olduğu belirtilmiştir [26].

IV. Fibroblast Büyüme Faktörü:

Fibroblastlar ve osteoblastlar için mitojeniktir. Kırık oluşumu aşamasında kallusu genişletir. Oluşan kallusun vaskülarizasyonunda da görev alır [39].

V. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü:

İnflamasyon döneminde trombositlerden salgılanır. Başta fibroblast ve osteoblast olmak üzere diğer kemik hücreleri için de mitojeniktir [39]. Hem kırık hattındaki hematomda hem de kan dolaşımında bulunur. Bağ dokusunda kollajen sentezini artırır. Fibroblast ve mezenşimal kök hücre mitozunu artırır. Makrofajların kemotaksisinde de etkilidir [26].

VI. İnterlökinler:

Makrofaj kökenli lokal faktörlerdir. Fibroblast proliferasyonunda ve osteoklastlar üzerindeki etkisi ile kemik geri emilimde etkilidir. Kırık oluşumunun erken döneminde oluşan IL-1 ve IL-6'nın, kırık bölgesinde, kırık oluşumundan 1 gün sonra en yüksek düzeyde bulunduğu bildirilmiştir [26].

VII. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü:

Kırık kallusunda, hipertrofik kondrositler tarafından salgılanır. Temel etkisi, kırık dokunun damarlar tarafından sarılarak vasküler kemik dokusunun oluşturulmasıdır. Osteoblast çoğalması ve farklılaşmasını da uyarır [40].

VIII. Epidermal Büyüme Faktörü:

EGF reseptörleri, osteoblastlar, osteoklastlarda bulunmaktadır. EGF ligandları, osteoblastlar tarafından üretilmektedir [41]. Yapılan çalışmalarda, EGF'nin kemik doku üzerine etkileri de ortaya konmuş, ancak kırık iyileşmesi olan etkisi belirlenememiştir. EGF ile ilgili detaylı bilgi Bölüm 2.17.'de verilmiştir.

2.15. KIRIK İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler genel ve lokal olmak üzere iki ayrı kısımda ele alınabilir [23]. (Tablo 2.2.)

Tablo 2.2. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler (Alturfan, 2002).

GENEL FAKTÖRLER	
Yaş	Erken yaşta kırık iyileşmesi hızlıdır.
Genel Durum	Ko-Morbid hastalıklar kırık iyileşmesini geciktirir.
Hiperbarik Oksijen	2-3 Atmosfer Basıncında uygulanan Hiperbarik Oksijen kırık iyileşmesini hızlandırır.
Bölgesel Stres	İyi tespit edilmiş kırıkta erken hareket kırık iyileşmesini hızlandırır.
Elektriksel Uyarı	Gecikmiş kaynama veya kaynamamada etkilidir.
YEREL FAKTÖRLER	
Travmanın derecesi	
Kırık uçlarının birbirine göre konumu	
Kırık bölgesinin dolaşımı	
Eklem içi kırıklar	
Eşlik eden cilt ve yumuşak doku yaralanması	
Eşlik eden enfeksiyon	
Tespit yöntemi	

I. Kırık iyileşmesini olumlu yönde etkileyen faktörler [23]:

- a. Elektrik akımı, Manyetik alan, Ultrasonografi
- b. Hiperbarik Oksijen Tedavisi,
- c. Anabolik Steroidler,
- d. D-Vitamini, Kalsitonin, PTH, Büyüme Hormonu
- e. Prostaglandinler, BMP, Büyüme Faktörleri
- f. Kemik greftleri

II. Kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen faktörler [23]:

- a. Yüksek enerjili travmalar ve geniş yumuşak doku hasarı bulunması
- b. Kırık uçların birbirinden ayrılması, araya yumuşak dokuların girmesi,
- c. Besleyici damarların hasar görmesi,
- d. Aşırı disseksiyon
- e. Kırığın transvers, parçalı veya segmenter olması
- f. Açık kırık olması
- g. Yetersiz tespit
- h. Enfeksiyon
- i. İleri yaş
- j. Eklem içi kırık olması
- k. Kemoterapi, Radyoterapi, Sigara Bağımlılığı (Nikotin) ve Kortikosteroidler

2.16. HYALÜRONİK ASİT

Yüksek molekül ağırlıklı ve lineer bir polisakkarit olan HA, hidrofilik yapısı ile vücutta bulunan ve immünojenik olmayan bir glikozaminoglikandır [42]. HA, hücre zarında üretilmekte ve tüm dokuların hücre dışı boşluklarında bulunmaktadır. HA, tüm canlı türlerinde ve aynı kimyasal yapıda bulunur [43]. Fakat, büyüme plağında bulunan hipertrofik kondrositleri saran lakünelarda, osteoprogenitör hücrelerin sitoplazmalarında ve erken kırık kallusunda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır [43-44].

Tip 1 kollajen içeren ve doğal polimer bir matriks olan HA, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon için mükemmel bir ortam oluşturmaktadır. Fakat, düşük mekanik katsayısı mevcuttur ve yeterli yapısal ve hücrel destek sağlayamamaktadır. Güncel çalışmalarda, HA'nın hem yumuşak dokuda hem de kemik dokunun yeniden şekillenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. HA'nın, granülasyon dokusu oluşumunu geciktirmesine rağmen, uygulandığı cerrahi bölgede hücre göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını artırdığı ve hücre dışı matriksin oluşumunu uyardığı bildirilmiştir [45]. In-vitro yapılan çalışmalarda, HA'nın artmış mezenkimal hücre farklılaşması ve göçünü uyarak osteoblastik aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir [43]. Ek olarak, West ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, HA'nın anjiyogenez üzerine etkisi olduğunu da bildirilmiştir [45].

HA, kemik dokuya uygulandığında, erken osteogenik olaylarda etkisini göstermektedir. HA, başta FGF-2, VEGF olmak üzere çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin etkilerini artırmaktadır [46]. Ek olarak, HA, kemik üzerine kalsitonin ve BMP-2 benzeri etki ile kemik dokuyu uyarmaktadır. Bhakta ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı in-vivo ektopik kemik modeli çalışmasında, BMP-2 etkisini artırarak osteogenezin indüklendiği gösterilmiştir. Ek olarak, fibrinojen, fibrin, fibronektin ve kollajen proteinlerini bağlayarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır [45].

Bu bilgiler ışığında, HA ve türevleri, günümüzde ortopedik cerrahilerde pek çok farklı alanda kullanılmaktadır. HA'nın enjektele veya biyoçözünebilir formları, tek başına veya başka maddeler ile kombine edilerek, eklem içi kırık hasarlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır [47, 48]. Giannini ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, ayak bileği artroskopisi cerrahisinde, talus çatısının

osteokondral lezyonlarında, hücre desteği ve çoğalmasını sağlamak amacı ile biyoçözünür çatı olarak Hyalograft 1-c (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy) kullanılmıştır [49].

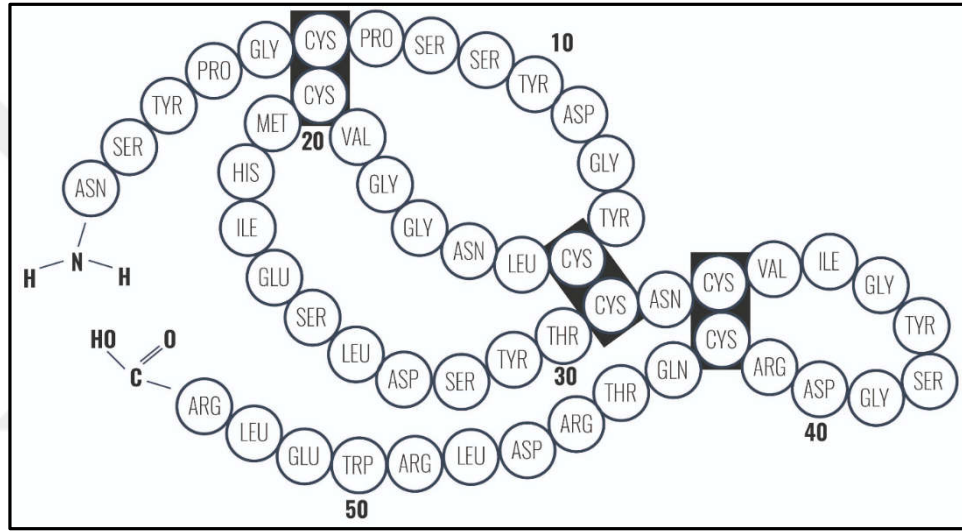
Spinal cerrahi [50], revizyon artroplasti cerrahisi [51], artrodez cerrahisi, travma cerrahisi gibi kemik dokunun etkilendiği cerrahi girişimlerde de HA türevleri izole veya çeşitli büyüme faktörleri veya farklı ajanlar ile kombine edilerek klinik çalışmalarda kullanılmaktadır.

Travma cerrahisinde, HA'nın farklı formları, farklı klinik çalışmalarda uygulanmıştır. Terboo ve arkadaşlarının 2016'da yaptıkları bir çalışmada, HA'nın hidrojel formu, gentamisin ile kombine edilerek kırık fiksasyonunun incelendiği bir deneysel tavşan modelinde kullanılmıştır [52]. Tekin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, HA, psödoartroz cerrahisinde, kemik defektlerini doldurmak amacı ile insanlarda uygulanmıştır [53]. HA'nın benzil esterini içeren yama formu olan Hyalonekt®, periostal benzeri etki oluşturması amacı ile, dikilebilir form olarak, tavşanlarda oluşturulan tibial defektler modelinde uygulanmıştır [45, 54].

HA'nın biyoçözünebilir, 3 boyutlu, benzil esteri yapısında, hyalin benzeri kırıkta rejenerasyonu için 2009 yılında üretilmiş formu olan Hyalofast® (Anika Therapeutics, İtalya / Soylu Medikal, Türkiye), günümüzde kondral ve osteokondral dokunun tamirinde kullanılmaktadır. Hyalofast®, steril, örgü yapıda olmayan ped şeklindedir ve bu yapısı sayesinde çeşitli maddelerin kombine edilerek kullanımına olanak sağlamaktadır. Ped yapısında olması, kolayca kesilerek uygun şekil ve boyutlarda kullanımına olanak sağlamaktadır. HA'nın diğer formları gibi, Hyalofast® da uygulandığı alanda mezenşimal kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Hyalofast®, uygulanan dokuda, zamanla çözünerek, lezyon bölgesinde embriyonik dönem benzeri mikroçevre oluşturmaktadır. Hyalofast® tarafından salgılanan ancak doku tarafından kullanılmayan fazla HA ise, vücut tarafından güvenli bir biçimde metabolize edilebilmektedir [55].

2.17. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

EGF, 1207 amino asitlik öncülün işlenmesi sonucu 53 amino asit kalıntısından oluşan, 6045 Dalton molekül ağırlığa sahip, tek polipeptid zinciri yapısında bir büyüme faktörüdür. Uzaysal olarak sistein kalıntıları arasındaki ilişki ile oluşan 3 molekül içi disülfid bağı içermesi ile karakterizedir. Bu disülfid bağları, EGF'nin biyolojik aktivitesi için gereklidir ve bu bağların bozulması, EGF'nin aktivasyonunun kaybolması ile sonuçlanır [41] (Şekil 2.13.).

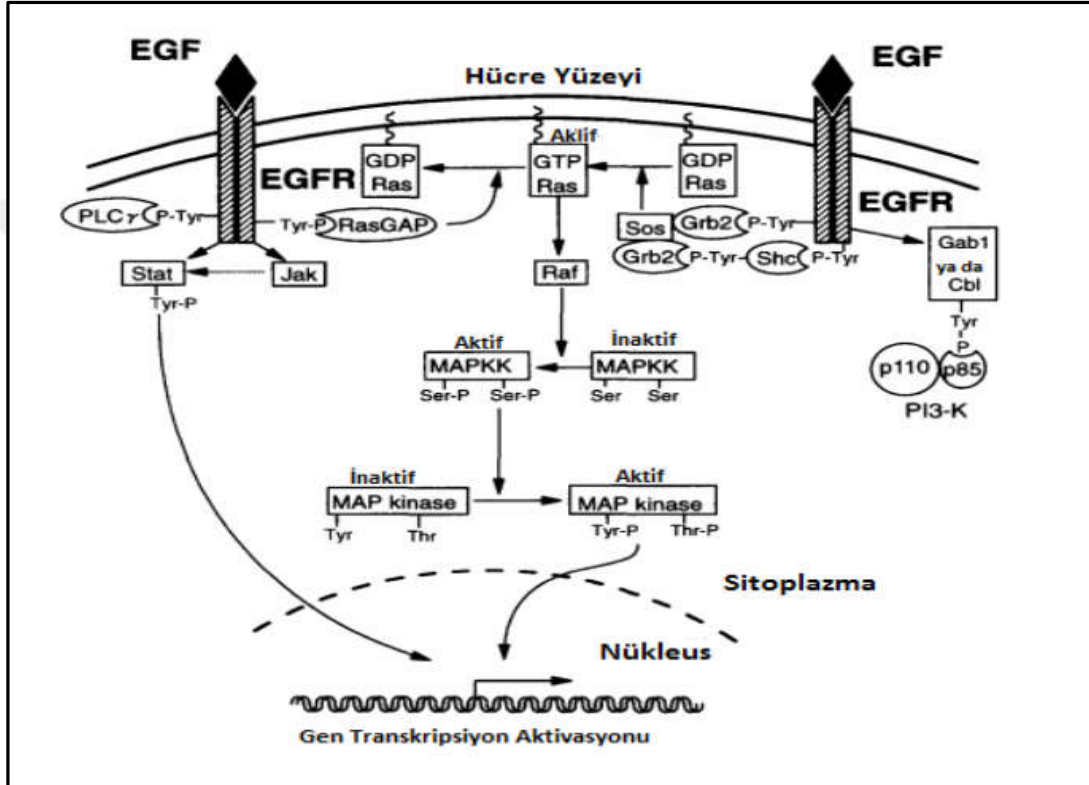


Şekil 2.13. EGF aminoasit dizilimi (Wölker V., 2015).

EGF ailesinde, EGFR etkileyen çeşitli ligandlar mevcuttur. Bunlar EGF, Heparin Bağlı-EGF (HB-EGF), Betacelulin (BTC), TGF- α , Epigen (EPGN), Amphiregulin (AREG), Epiregulin (EREG) ve Neuregulinler (NRG 1-4) dir. EGF-ligandları, hedef hücrelerde etkisini 4 grup transmembran tirozin kinaz reseptörleri aracılığı ile göstermektedir. Bunlar EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3 ve ErbB4 reseptörleridir. Uyarılan EGFR'lerinin %50'si, lizozomlar tarafından parçalanmakta, geri kalanı ise tekrar hücre zarında eksprese olmaktadır [56].

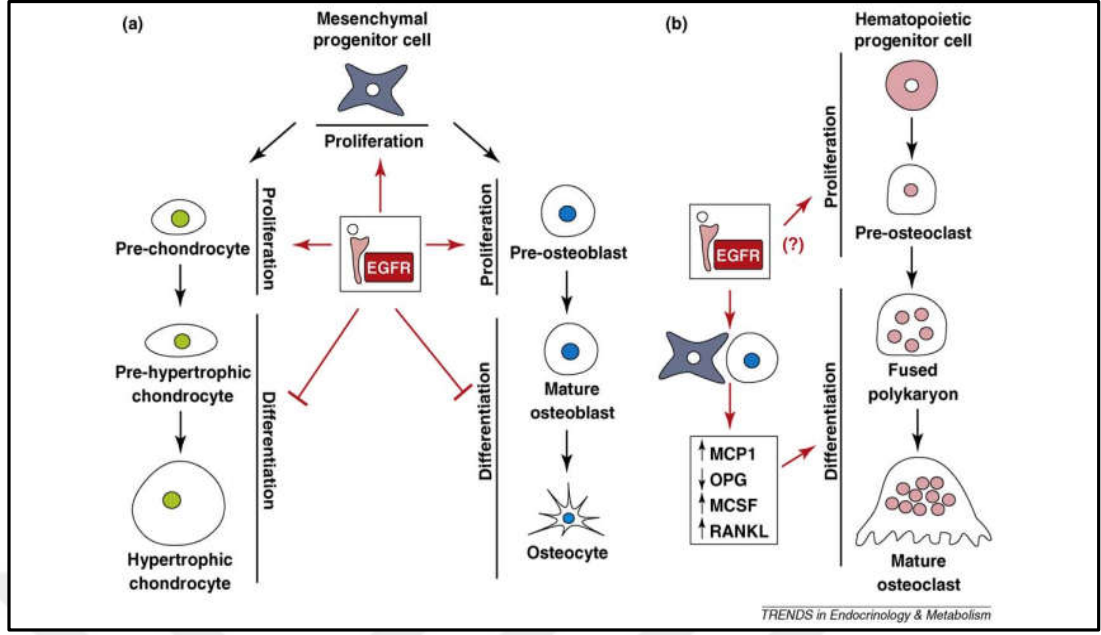
EGF-Ligandlarının EGF reseptörlerini uyarması sonucu, PI3 kinaz, MAP kinaz ve STAT yolları aracılığı ile hücre içi sinyal yolları tetiklenmektedir [41]. Bu sinyal yollarının aktivasyonu sonucu hücre çoğalmasında artma ve apoptozda

azalma görülmektedir [57] (Şekil 2.14.). Özellikle MAP kinaz yolağının aktivasyonunun, osteoblast metabolizması üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [58] (Şekil 2.14). Ratlar üzerinde yapılmış bir çalışmada, osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlarda EGFR'nin bloklanmasının, kemik üretimini bozduğu gösterilmiştir [59].



Şekil 2.14. EGF hücre içi etki mekanizması (Yarım G.F., 2016).

Tarihsel olarak ilk kez ratların submaksillar tükürük bezinden elde edilen EGF'nin, yapılan ilk deneysel çalışmada korneal iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir [61]. Bu tarihten itibaren, farklı alanlarda kullanılan EGF'nin, yara iyileşmesinde de etkili olduğu bildirilmiştir [62]. 1979 yılında, Gospodarowicz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, EGF'nin anjiyogenik aktivitesi tanımlanmıştır [63]. 2010 yılında Tamama ve arkadaşları tarafından EGF'nin kemik iliği mezeneşimal hücrelerinde VEGF'nin üretimini artırdığı bildirilmiştir [64].



Şekil 2.15. EGF'nin kemik hücreleri üzerindeki etkileri (Schneider M.R., 2009).

EGFR eksik olan ratlarda majör organ defektleri olduğu gözlenmiş ve in-utero veya erken postnatal dönemde öldükleri gözlenmiştir. Yapılan bir başka deneysel çalışmada, EGFR defektli ratlarda büyüme patolojileri ve iskelet defektleri gözlenmiştir [65]. 1999 yılında Jann ve arkadaşları ile 2004 yılında Tsubone ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda ise, EGF'nin tenoblastlar üzerinde mitojenik etkisi olduğu ve inflamatuvar dönemde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [66, 67]. Bu özelliklerinden dolayı günümüzde EGF, başta diyabetik hastalarda gelişen cilt ülserlerinin tedavisi olmak üzere, yara iyileşmesinde lokal olarak uygulanmaktadır [68, 62].

EGF'nin, hedef hücrede hem PI3K, hem de endotelial NO sentezini artırarak, anjiogenezi artırdığı gösterilmiştir. Yara iyileşmesi üzerinde yapılan bir çalışmada, EGF uygulamasının, yara bölgesinde yeni damar oluşumunu artırdığı gösterilmiştir [41].

EGF'nin, mitojenik ve anjiogenik özelliklerinden dolayı, tümör etyolojisinde de rol oynadığı düşünülmüştür. EGFL-7'nin kolorektal kanser, hepatoselüler karsinom, meme kanseri, laringeal karsinom ve malign glioma gibi kanserlerde rol

oynadığı ve EGFL-7'nin yüksek konsantrasyonlarının, ileri düzey metastaz ve damar invazyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [69]. Yapılan çalışmalarda, osteosarkom vakalarında, EGFR'nin %55-81 oranında bulunduğu bildirilmiş ancak klinik özelliği tanımlanamamıştır [70]. EGFR antagonistleri de çeşitli çalışmalarda tedavi amacı ile denenmiştir [71, 72]. Kemik dev hücreli tümöründe ve osteosarkomda, EGFR'nin sayısının artmış olduğu gösterilmiş ve bunun tümörün agresyonu ile korele olduğu bildirilmiştir [73].

EGF'nin kemik biyolojisinde de önemli bir rol oynadığı yakın zamanda kesinlik kazanmıştır. EGF reseptörlerinin, osteoblastlar, osteoklastlar ve endotelial hücreler de dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunduğu bildirilmiştir. Güncel olarak, EGF-Ligandlarının osteoklastların farklılaşması sırasında açığa çıktığı ve osteoblastlar tarafından üretildiği gösterilmiştir [41]. Ekzojen olarak uygulanan EGFR-Ligandlarının, osteoblastların çoğalmasını uyardığı ve mineralizasyon kapasitelerini azalttığı gösterilmiştir [74]. Foley ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, EGFR aktivasyonunun osteoklastogenezi artırdığı ve kemik döngüsünü uyardığı gösterilmiştir [75]. Ek olarak, Chim ve arkadaşları tarafından, BMU'de EGF üretiminden sorumlu genlerin eksprese edildiği gösterilmiştir [41]. Wang ve arkadaşları tarafından EGFR eksikliği olan ratlarda yapılan bir çalışmada, büyüme plaklarında, hipertrofik kondrosit bölgesinin arttığı ve osteoblastların dağılımının düzensiz olması nedeni ile birincil kemikleşmenin geciktiği gösterilmiştir [76]. Yapılan çalışmalarda, EGF'nin kemik doku üzerine etkileri de ortaya konmuş, ancak kırık iyileşmesi üzerine olan etkisi belirlenememiştir.

Çalışmamızda, EGF preparatı olarak Heberprot-P® (Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Küba / Has Biotech, Türkiye) 75 µg liyofilize toz kullanılmıştır. Diyabetik ülser tedavisi için ruhsat alınmış olan bu ilaç, çalışmamızda kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacı ile, kırık hattına tek dozluk lokal uygulama ve HA ile kombine halde olarak kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA PLANI

Hipotezin belirlenmesinden sonra, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'a başvuruldu. 26.02.2019 tarih ve Etik-2019/02 Etik Kurul Kayıt Numarası ile etik kurul onayı alındı. Çalışmamızda 48 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat kullanıldı ve deney aşaması ile postoperatif bakım aşaması Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Hayvan Deneyleri Laboratuvarı'nda (Etlik/ANKARA) uygulandı.

48 adet ratın ortalama yaşı 8,2 ay, (6-12 ay) ve ortalama ağırlıkları 392 gram (350-450 gram) idi. Tüm ratlar, girişim öncesi 7 gün boyunca, her biri 21-24° C'lik sıcaklık ve %50'lik hava nemi ile 2'şerli bir şekilde ratlar için özel standart bir kafeste tutuldu. 12 saatlik otomatik aydınlık/karanlık döngüsü korundu. Deney süresince ratların standart pelet yeme ve taze içme suyuna (Ad libitum) ulaşması sağlandı.

48 adet rat, deney öncesi randomize olarak her grupta 12 adet rat olacak şekilde 4 ayrı gruba ayrıldı (Tablo 3.1.) (Fotoğraf 3.1.). Kırık iyileşmesini etkilememek adına, ratlara deney öncesi veya sonrası sistemik antibiyotik profilaksisi uygulanmadı.

Tablo 3.1. Deney Hayvanları Dağılım Tablosu

Grup Adı	4. Hafta	6. Hafta
Kontralateral Grup	0	4
Kontrol Grubu	4	4
EGF Grubu	5	5
HA Grubu	5	5
Kombine Grup	5	5



Fotoğraf 3.1. Ratlar 4 ayrı grup olarak ayrılarak takip edildi.

Cerrahi sonrası ilk 24 saat içinde Kontrol grubunda 3 ex, HA grubunda 2 ex, EGF grubunda 1 ex, Kombine grupta 2 ex gözlemlendi. Takip süresince, 2. haftada Kontrol grubunda 1 ex, 3. haftada EGF grubunda 1 ex gözlemlendi. Cerrahi sonrası ilk 24 saatte HA grubundan 1 rat, Kombine gruptan 1 ratın cilt sütürünün açıldığı ancak fasya dokusunun açılmadığı gözlemlendi. Yara yeri SF ile yıkandıktan sonra aynı cerrah tarafından tekrar sütüre edildi. Takiplerde hiçbir ratta yara yeri veya sistemik enfeksiyon gözlemlenmedi.

4. ve 6. haftalar sonunda, randomize olarak seçilen Kontrol grubundan 4'er adet; EGF, HA ve Kombine gruplarından 5'er adet rata anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifikasyon uygulandı. Sakrifikasyonun ardından tüm ratlara sol femurları kalça ve diz ekleminden olacak şekilde dezartikülasyon uygulanmasının

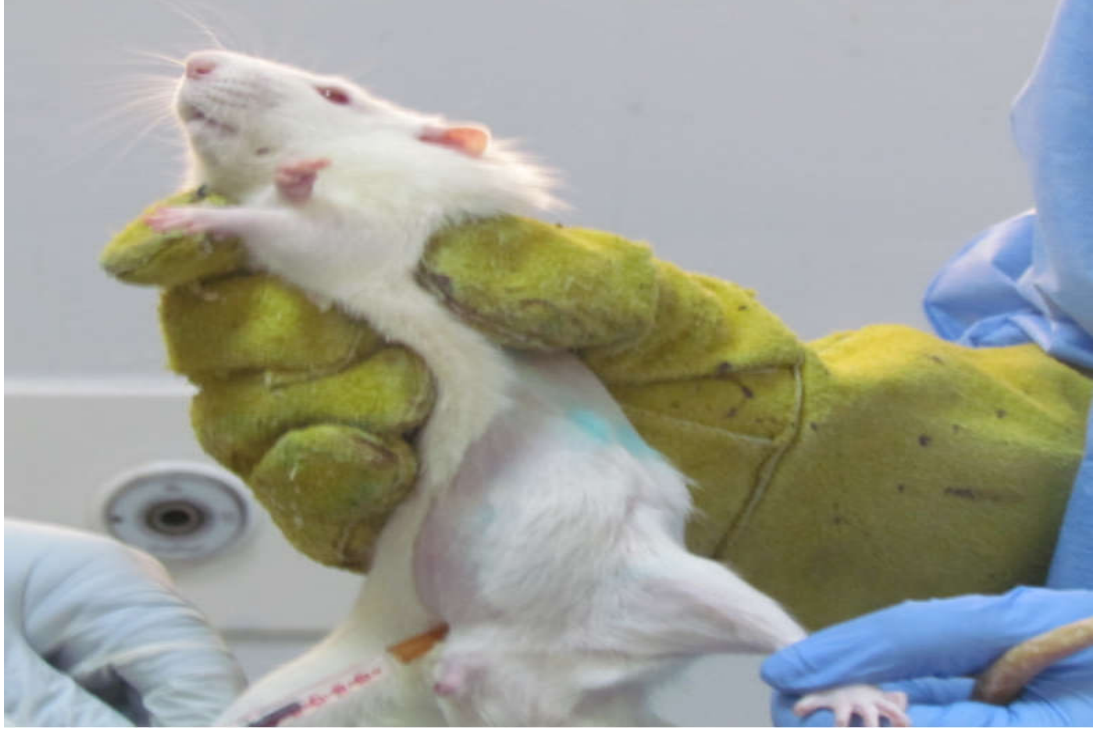
ardından femurlar rezeke edildi (Fotoğraf 3.2.). Femur üzerindeki tüm yumuşak dokular, kallus dokusuna zarar verilmeden temizlendi. Deney sonunda randomize olarak seçilen 4 ratın kontralateral femurları da inceleme için çıkarıldı. Tüm femurlar radyolojik, biyomekanik ve histolojik incelemeye alındı.



Fotoğraf 3.2. Ratların sakrifikasyonundan sonra femurları rezeke edildi.

3.2. CERRAHİ TEKNİK

Gerekli takip ve hazırlıkları yapılan denekler cerrahi işlem amacı ile ameliyathaneye alındı. Sterilizasyon amacı ile, tüm deneklerin sol femur bölgeleri traş edildi. Anestezik ajan olarak Ketamin (Ketalar®, Pfizer, Türkiye) 90mg/kg + Ksilazin (Rompun®, Bayer, Türkiye) 10mg/kg kombinasyonu kullanıldı. Anestezik kombinasyonu intraperitoneal olarak karın sağ alt kadranda bölgesinden uygulandı (Fotoğraf 3.3.). Cerrahi süresince anestezi kombinasyonunun etkinliği, bacak çekme testi kullanılarak kontrol edildi. Cerrahi teknik olarak, Naegeu ve arkadaşları ile Claes ve arkadaşları tarafından tanımlanan femoral osteotomi modeli uygulandı [77, 78].



Fotoğraf 3.3. Ratlara anestezi kombinasyonu uygulandı.

Cerrahi masasına alınan deneklerin tüm sol alt ekstremiteleri Povidon İyodür (Batticon®, ADEKA, Türkiye) ile boyandıktan sonra, steril delikli örtü ile sol alt ekstremiteleri açıkta kalacak şekilde örtüldü (Fotoğraf 3.4.)



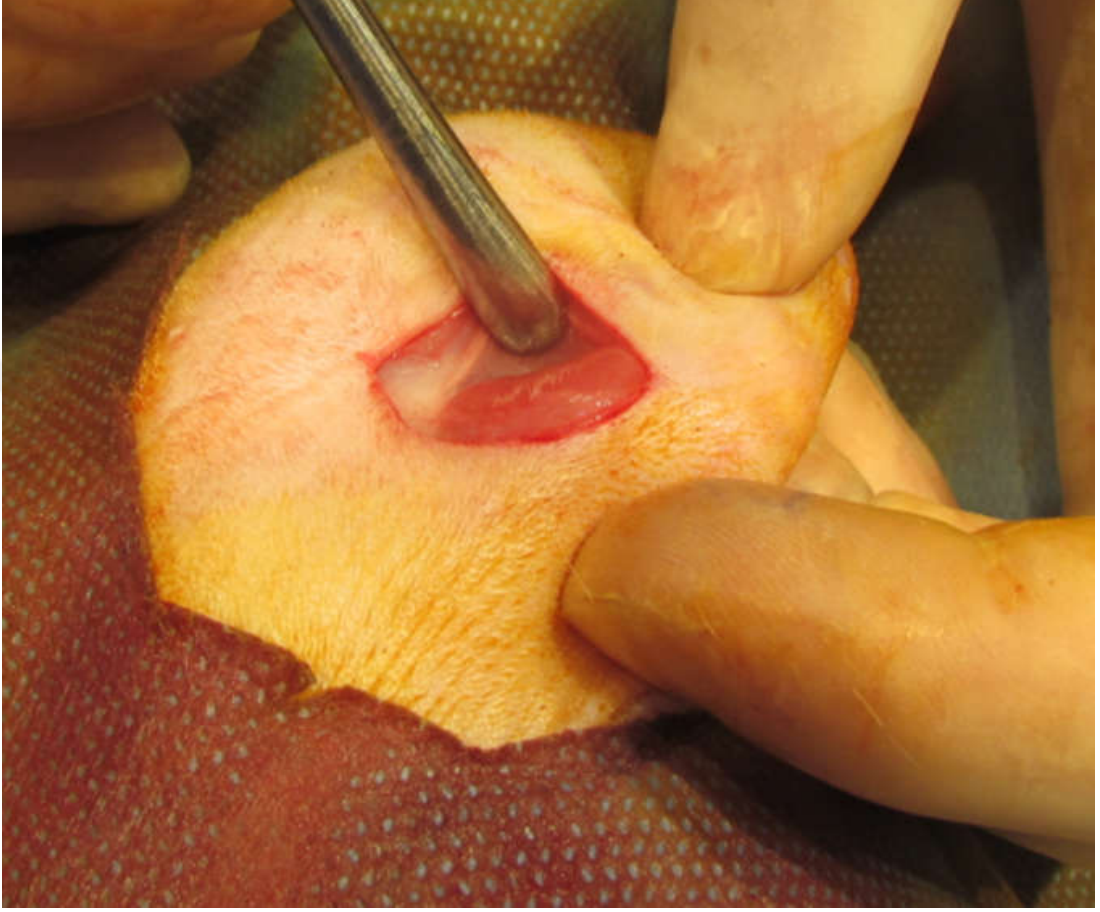
Fotoğraf 3.4. Ratlar cerrahi işlem öncesi steril olarak hazırlandı.

Sol femur lateralinden 2 cm'lik insizyon ile cilt-cilt altı geçildi. Femur shaftı üzerinden fasya dokusu künt diseksiyon ile geçildi (Fotoğraf 3.5.).



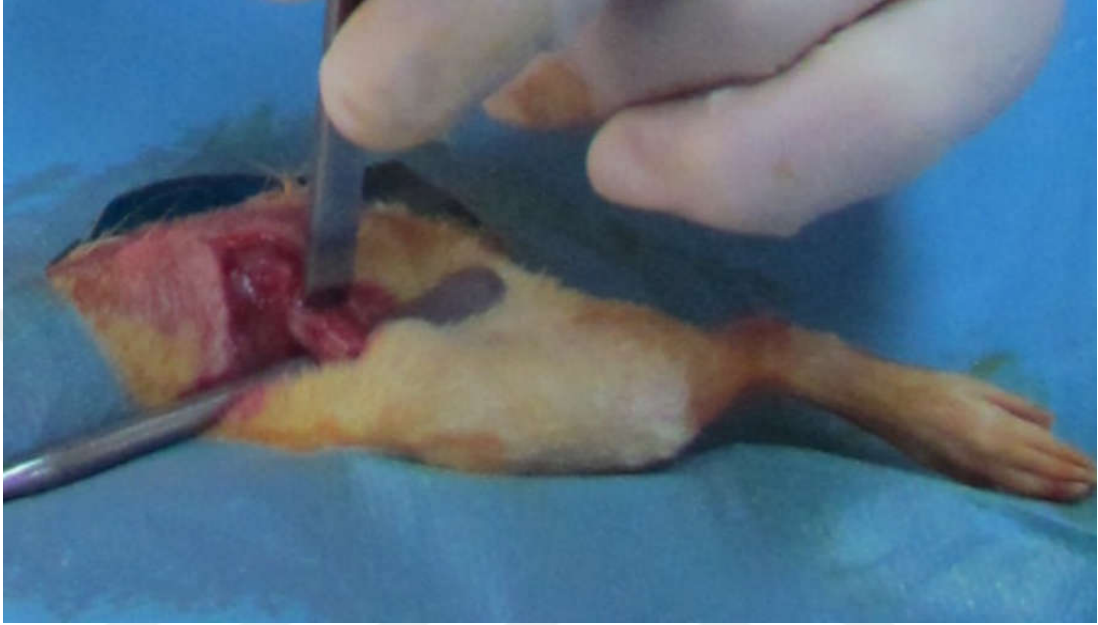
Fotoğraf 3.5. Cilt-cilt altı geçildikten sonra fasya dokusuna ulaşıldı.

‘Tensor Fascia Lata’ kasının inferioru ile ‘Biceps Femoris’ kasının süperioru arasından künt diseksiyon ile geçilerek femur şaft bölgesine ulaşıldı (Fotoğraf 3.6.).



Fotoğraf 3.6. Künt diseksiyon ile femur şaftına ulaşıldı.

0,75mm çapındaki K-teli (Orthaus®, Türkiye) ile her iki korteks geçilerek korteks zayıflatıldı. Ardından 1 mm genişliğindeki osteotom ile kırık oluşturarak tüm deneklerde tek tip ve 2 parçalı kırık oluşturuldu (Fotoğraf 3.7, Fotoğraf 3.8).

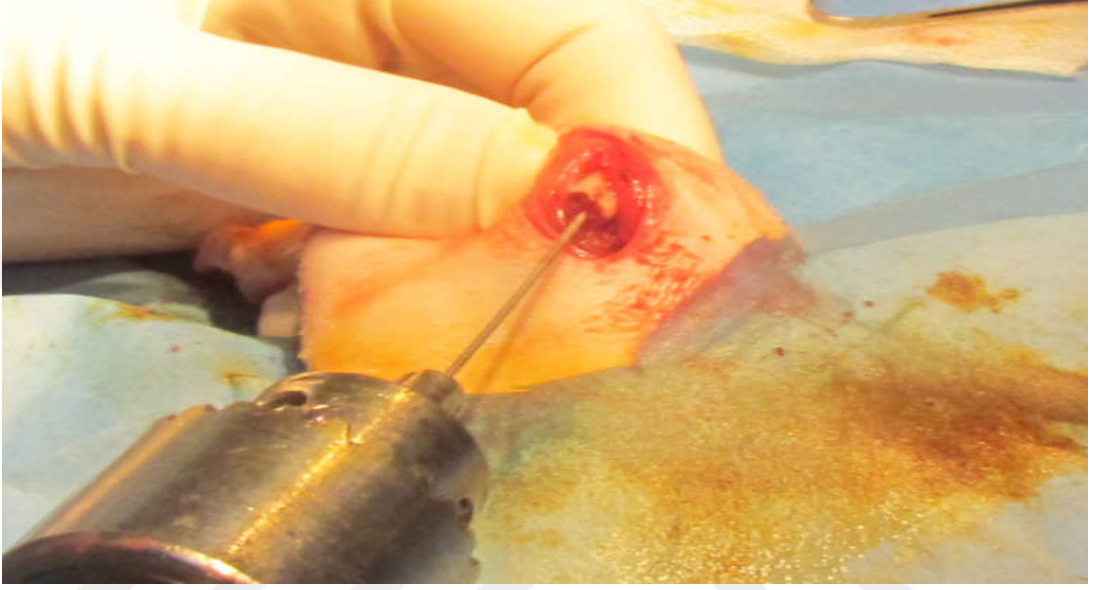


Fotoğraf 3.7. Osteotom ile femur şaft kırığı oluşturuldu.

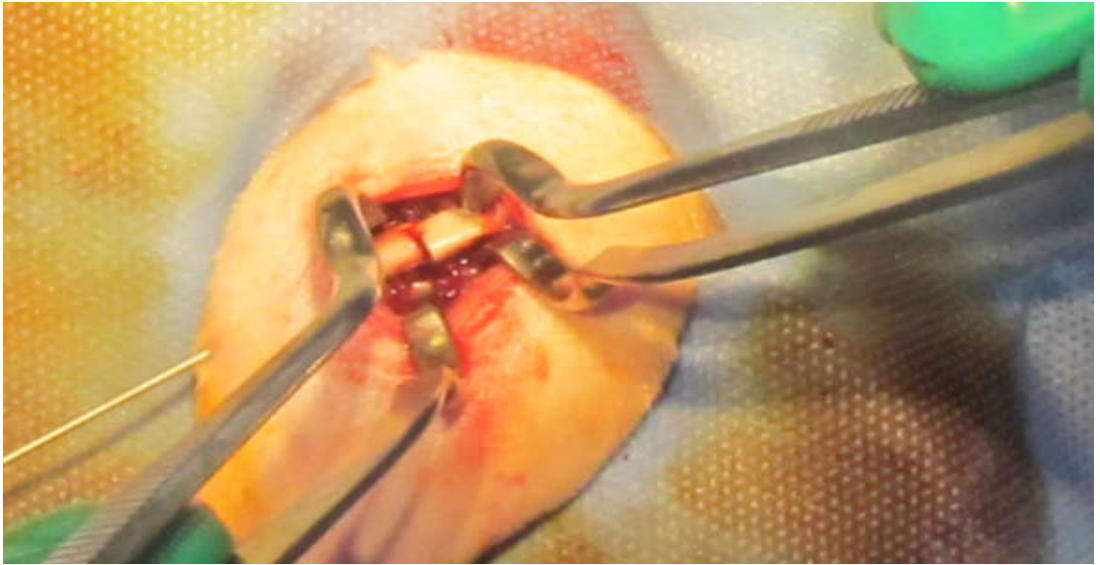


Fotoğraf 3.8. Oluşturulan femur şaft kırığı fikse edilmeden önce.

Fiksasyon için her ucu sivri 1 adet K-teli, motor yardımı ile önce anterograd yönde ilerletilerek diz ekleminde çıkartıldı. K-teli, geri çekilerek kırık hattında redüksiyonun sağlanması için ardından retrograd yönde ilerletilerek ‘Trokanter Majör’ hizasında korteks geçildi (Fotoğraf 3.9. ve Fotoğraf 3.10.).

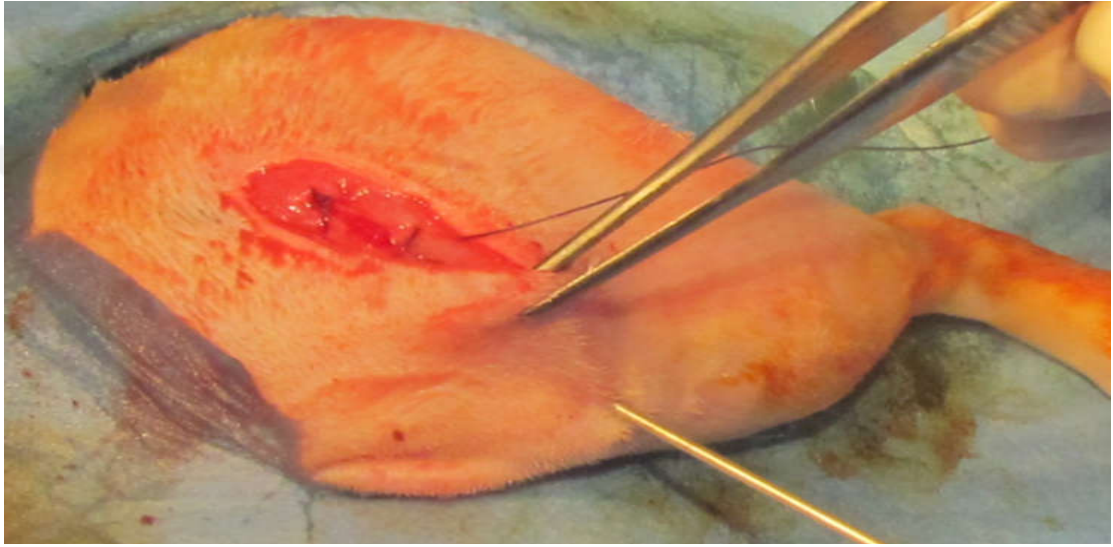


Fotoğraf 3.9. K-teli intramedüller olarak anterograd yönde ilerletildi.



Fotoğraf 3.10. Redüksiyon sağlandıktan sonra K-teli retrograd yönde ilerletilerek fiksasyon sağlandı.

Redüksiyonun uygunluğu değerlendirildikten sonra 3,0 Vicryl sütür ile (Ethicon®, Johnson&Johnson, ABD) fasya tabakası dikildi (Fotoğraf 3.11.). 2,0 Prolen sütür ile (Doğsan®, Türkiye) cilt dikişi uygulandı. Cilt zerine Neo-Caf Sprey (Intervet®, İtalya) uygulanarak işlem sonlandırıldı (Fotoğraf 3.12.). Cerrahi işlemin tamamlanmasının ardından denekler, postoperatif takip amacı ile gözlem odasına alındı.



Fotoğraf 3.11. Fasya tabakası 3,0 Vicryl sütür ile kapatıldı.



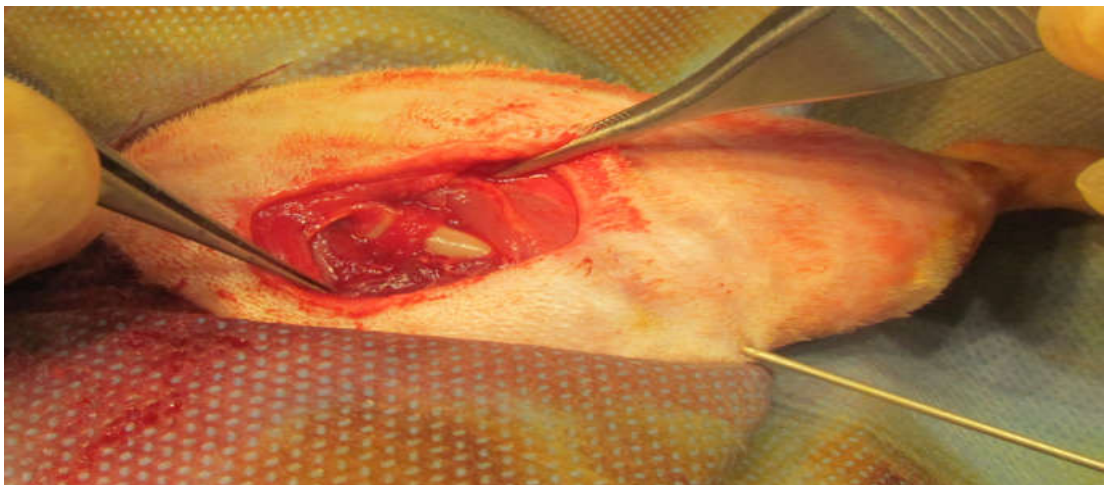
Fotoğraf 3.12. İşlemin sonlandırılmasından sonra denekler postoperatif takibe alındı.

EGF grubunda, Kontrol grubunda uygulanan işlemlerin ardından, 10cc SF ile sulandırılan 7,5µg'lık Heberprot-P®, rat başına 0,75 µg/1cc olacak şekilde kırık hattına lokal olarak uygulandı (Fotoğraf 3.13.).



Fotoğraf 3.13. Heberprot-P® kırık hattına lokal olarak uygulandı.

HA grubunda, Kontrol grubunda uygulanan işlemlerin ardından, bir Right-Angle cerrahi klembi ile kırık hattı etrafından geçildi (Fotoğraf 3.14.). Önceden hazırlanan 2x0,5cm'lik Hyalofast®, kırık hattını tamamen kaplayacak şekilde femura sarıldı.



Fotoğraf 3.14. Hyelofast® kırık hattı etrafına sarıldı.

Kombine grupta ise, önceden hazırlanan 2x0,5cm'lik Hyalofast® üzerine 0,75 µg/1cc'lik Heberprot-P® emdirildi. Oluşan kombinasyon, bir Right-Angle cerrahi klembi ile kırık hattı etrafından geçilerek, kırık hattını tamamen kaplayacak şekilde femur şaftına sarıldı (Fotoğraf 3.15.).



Fotoğraf 3.15. Heberprot-P® ile Hyelofast® kombine edildi.

3.3. RADYOLOJİK İNCELEME

Denekler sakrifiye edilip, femurlar rezeke edildikten ve K-telleri çıkartıldıktan sonra, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Rıdvan Ege Hastanesi Radyoloji A.D. bünyesinde radyolojik inceleme uygulandı.

Mamografi cihazı (General Electric®, SENOGRAPHIE DMR) kullanılarak tüm femurların Anteroposterior ve Lateral olacak şekilde 2 yönlü radyolojik görüntüleri alındı. Radyografiler, 1987 yılında Lane ve Sandhu tarafından tanımlanan skorlama sistemi kullanılarak [79], çalışmadan bağımsız 2 ayrı ortopedist (B.G., D.K.) tarafından değerlendirildi. (Tablo 3.2.)

Direkt radyolojik inceleme sonrasında, tüm femurlara 80 kV, 40mA, 0,625 mm kesitli kalınlıkta Bilgisayarlı Tomografi (General Electric®, LightSpeed – 16) uygulandı. Alınan kesitlere Radiant DICOM Viewer (versiyon 5.5.1) kullanılarak 3 boyutlu rekonstrüksiyon uygulandı.

Tablo 3.2. Radyolojik Bulguları Değerlendirmek için Kullanılan Lane - Sandhu Skorlama Sistemi (Lane J.M., 1987)

Skor	Radyolojik Bulgular
0	Kallus dokusu yok, Kırık hattı açık
1	%25 kallus dokusu, Kırık hattı açık
2	%50 kallus dokusu, Kırık hattı bulanık
3	%75 kallus dokusu, Kırık hattı zorlukla görülebilmekte
4	%100 kallus dokusu, Kırık hattı görülmemekte

3.4. BİYOMEKANİK İNCELEME

Radyolojik incelemenin ardından, femur örnekleri, ‘3 Nokta Bükülme’ testi uygulanarak biyomekanik olarak incelendi. Biyomekaniksel inceleme Orta Doğu Teknik Üniversitesi Malzeme ve Metalurji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan Instron 5565-A (Instron Company®, Massachusetts, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

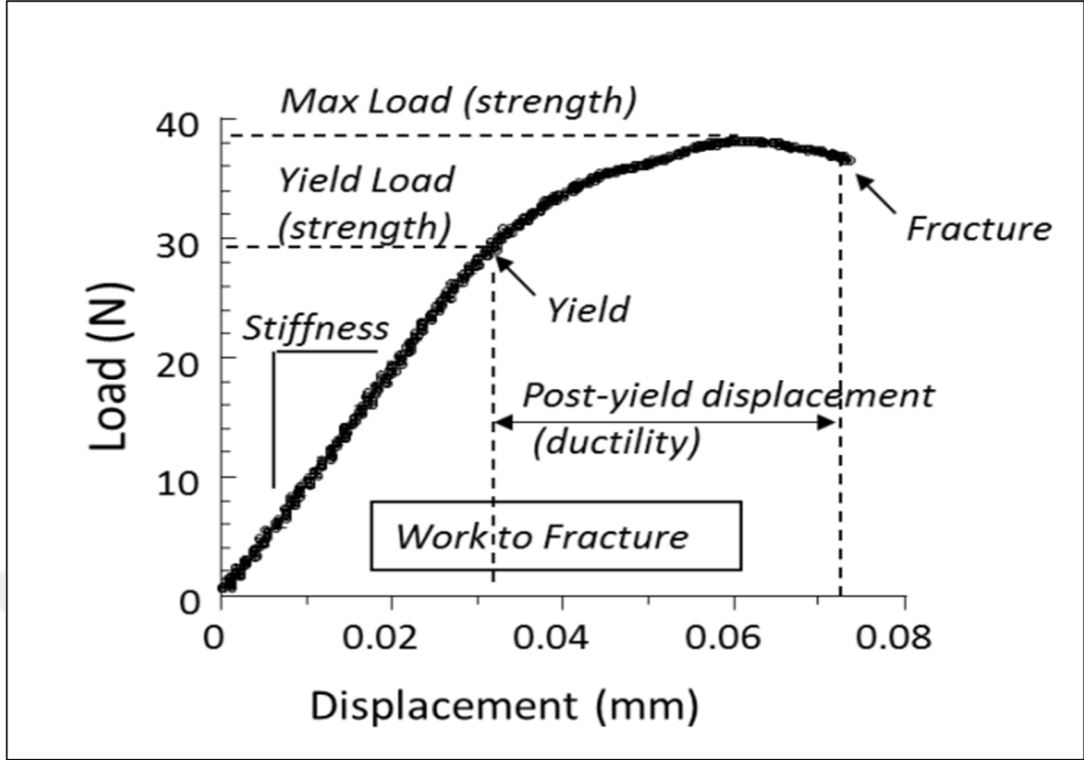
3 Nokta Bükülme Testi, doğrusal şekle sahip bir materyalin biyomekanik özelliklerini ölçmek için kullanılan, klasik bir deney yöntemidir [80]. Materyal, Antero-Posterior düzlemde 2 destek üzerine yerleştirilir [78, 81]. Kemiğin deforme olmadığı başlangıç noktasında, yük noktası kemiğe küçük bir ön yük uygular. Bunun amacı kemiği yerinde tutmaktır. Daha sonra, yük noktası kemiğe artan oranlarda kuvvet uygulayarak kemiğin merkeze kıyasla bükülme yer değiştirmesini kayıt altına alır [82]. (Fotoğraf 3.16.)

Kemikte kırık oluşturan en yüksek kuvvete maksimum kuvvet adı verilir ve bu değerden itibaren kemiğin absorbe edebildiği kuvvet aniden düşer. Bu değer kemiğin maksimum kuvvete verebildiği mukavemeti temsil etmektedir [82].

Cihaz tarafından sunulan veriler ışığında elde edilen kuvvet – yer değiştirme grafiğinden, kemiğe ait çeşitli biyomekaniksel özellikler tespit edilebilir (Şekil 3.1.). Kemiğe uygulanan kuvvetin kalıcı deformite yaratabildiği yük değerine akma noktası adı verilir. Bu değer, kemiğin elastik özelliği bozulmadan ne kadar yük taşıyabileceğini ifade etmektedir. Bu değer öncesi alan elastik deformiteyi göstermekte ve kemiğin gücünü yansıtmaktadır. Bu değerden itibaren kemikte plastik deformasyon gelişir, eğim yatay bir özellik kazanmaya başlar ve maksimum kuvvet altında kırılır. Akma noktası ile kırılma noktası arasındaki alan ise kemiğin genişleyebilme yeteneğinin göstergesidir ve kırılma öncesi ne kadar kuvvete dayanabileceğini belirtmektedir [82].



Fotoğraf 3.16. Femurlar Instron 5565-A cihazında (Instron Company®, Massachusetts, ABD) biyomekanik olarak incelendi.



Şekil 3.1. 3 Nokta Bükülme testinden elde edilen grafik örneği ve katılık değerinin hesaplanması (Silva M. J. 2016).

Elastik deformasyon yeteneği, kemik matriksinin içeriği ile doğrudan ilişkilidir ve kemiğin katılık özelliği olarak tanımlanmaktadır. Katılık özelliği, kemiğin tümünün, elastik dönemde uygulanan yerdeğiştirmeye verdiği tepki direncidir ve elastik dönemdeki eğrinin eğimi ölçülerek hesaplanmaktadır. [83].

Çalışmamızda, her bir femur örneği, her biri merkezden 2 cm uzaklıkta olan 2 adet 3.2 mm'lik desteğin arasına, Antero-Posterior düzlemde yerleştirildi. Kırık hattının ortasına, yükleme hızı 1 mm/dakika olacak şekilde yük verildi ve kırığın oluştuğu maksimum kuvvet kayıt altına alındı [84]. Bu veriler ışığında elde edilen verilerden hazırlanan grafiklerde, elastik bölgeden hesaplanan eğim değeri kemiğin katılık değeri olarak belirlendi ve kayıt altına alındı.

3.5. HİSTOLOJİK İNCELEME

Radyolojik ve biyomekanik incelemenin ardından tüm femurlar, kırık hattının 1 cm distal ve proksimalinden olacak şekilde kesilerek %10'luk formol solüsyonu içerisinde iki hafta süre ile bekletildi. Ardından Bouin's solüsyonunda iki gün süre ile fiksasyon işlemi uygulandı. Fiksasyon işlemi sonrası %10'luk asetik asit, %0,85'lik NaCl ve %10'luk formalin solüsyonunda dekalsifikasyon işlemi uygulandı. Daha sonra parafin bloklara gömülen örnekler 3–4 mikronluk longitudinal kesitler halinde kesilerek hazırlandı. Tüm preparatlar Hematoksilen Eosin ile boyandı. Hazırlanan preparatlar, ışık mikroskopisi (Zeiss Light Microscope®, Jena, Almanya) altında x200 büyütme ile incelendi. İyileşmenin histolojik olarak sınıflaması Huo ve arkadaşları [85] tarafından oluşturulan skorlama sistemi kullanılarak derecelendirildi (Tablo 3.3.).

Scanning Elektron Mikroskopik inceleme amacı ile, tüm femurlara 48 saat süre ile %2,5 gluteraldehid solüsyonu içerisinde ilk fiksasyon işlemi uygulandı. Akabinde, tüm örnekler Sorenson Fosfat Buffer solüsyonu (pH:7.4) ile yıkandı ve %1 Osmium Tetroksit solüsyonunda 2 saat tutularak ileri fiksasyon işlemi uygulandı. İleri fiksasyon sonrasında, Sorenson Fosfat Buffer solüsyonunda (pH:7.4) tekrar yıkandı. Daha sonra, doku örnekleri artan konsantrasyonda aseton ile muamele edilerek dehidrate edildi ve çift taraflı yapışkan bantlar kullanılarak metal kuyulara yerleştirildi. Örnekler, Quorum SC 7620 püskürtümlü kaplayıcı (London, East Sussex) kullanılarak 100 Angstrom kalınlığında altın paladyum püskürtüldü. Tüm örnekler, Atılım Üniversitesi Metal Şekillendirme Mükemmeliyet Merkezi'nde bulunan Zeiss Evo LS 15 (Jena®, Almanya) Scanning Elektron Mikroskopu kullanılarak 5-30 kV hızlandırma gerilimi altında incelendi.

Tablo 3.3. Histolojik Bulguları Değerlendirmek için Kullanılan Huo Sınıflaması (Huo M. H., 1991).

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 olgunlaşmamış- örgü kemik
6	Eşit oranda kıkırdak ve olgunlaşmamış kemik
7	Ağırlıklı olarak olgunlaşmamış kemik ve az oranda kıkırdak
8	Tamamen olgunlaşmamış – örgü kemik
9	Olgunlaşmamış kemik ve az miktarda olgunlaşmış kemik
10	Olgunlaşmış – Lamellar Kemik

3.6. İSTATİSTİKSEL İNCELEME

Verilerin elde edilmesinin ardından, istatistiksel analiz SPSS v. 11,5 for Windows (IBM™ New York, A.B.D.) paket programı kullanılarak yapıldı.

Değerlendirmede, gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis, One Way Anova testleri kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bulunduğu takdirde, grupların ikişerli karşılaştırılması için Mann Whitney U testi uygulandı.

Nicel veriler arasındaki ilişkilerde Spearman Rank korelasyon analizi uygulandı ve istatistiksel anlamlılık sınırı olarak (p) 0,05 olarak kabul edildi.

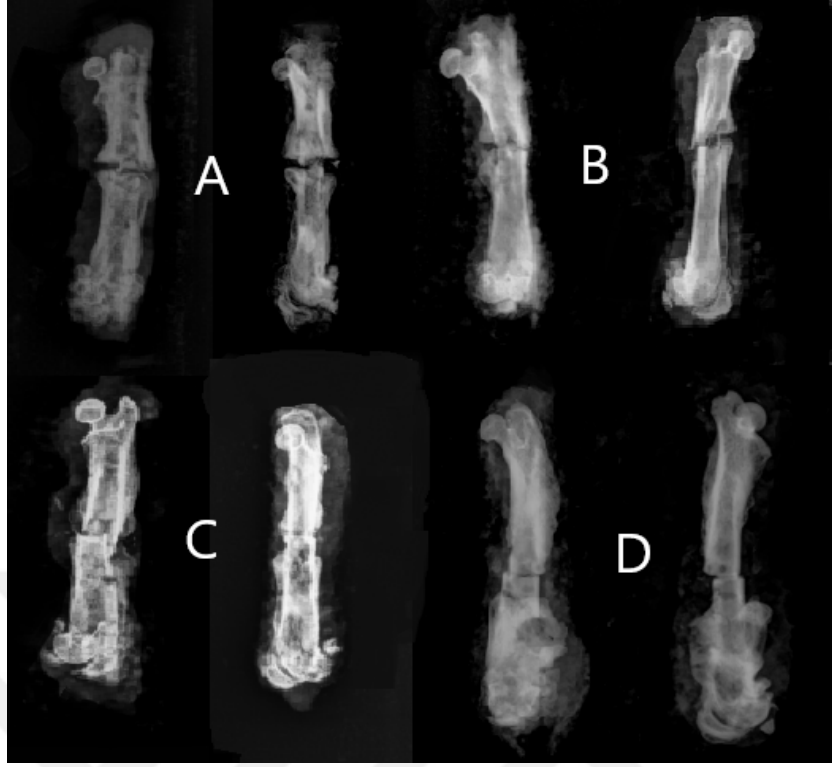
4. BULGULAR

4.1. RADYOLOJİK BULGULAR

Çalışmamızda bulunan kontrol, EGF, HA ve Kombine gruplarındaki ratlara, postoperatif 4 ve 6. haftalarda genel anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifikasyon uygulandı. Tüm ratların femurları dezartikülasyon sonrası rezeke edildi ve yumuşak dokularından sıyrıldıktan sonra röntgen kasetlerine yerleştirilerek Anteroposterior ve Lateral olmak üzere 2 yönlü grafileri alındı (Şekil 4.1., Şekil 4.2.). Ardından tüm femurlara bilgisayarlı tomografi sonrası 3 boyutlu rekonstrüksiyon işlemi uygulandı.



Şekil 4.1. 4. haftada sakrifiye edilen grupların radyolojik örnekleri. A: Kontrol, B: EGF, C: HA, D: Kombine



Şekil 4.2. 6. haftada sakrifiye edilen grupların radyolojik örnekleri. A: Kontrol, B: EGF, C: HA, D: Kombine

Tüm grafiler, Lane-Sandhu skorlama sistemi kullanılarak, çalışmadan bağımsız iki ayrı ortopedist tarafından incelendi (BG, DK). Lane-Sandhu sınıflamasına göre, kontrol grubunun ortalama skorları 4. haftada 0 ile 0, 6. haftada 0,13 ile 0,38 olarak belirlenmiştir. EGF grubunun ortalama skorları 4. Haftada 0,3 ile 0,4; 6. Haftada 1,3 ile 1,4 olarak belirlenmiştir. HA grubunun ortalama skorları 4. Haftada 0,2 ile 0,2; 6. Haftada 0,8 ile 0,8 olarak belirlendi. Kombine grubun ortalama skorları 1,4 ile 1,4; 6. Haftada 2,2 ile 2,1 olarak belirlendi. Tablo 4.1. – Tablo 4.8.’de tüm grupların skorları ve ortalama puanları gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Kontrol grubu radyograflerinin 1. Ortopediste göre değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Ön-Arka	Yan	Toplam	Ortalama
4. Hafta	Kontrol 1	0	0	0	0
	Kontrol 2	0	0	0	0
	Kontrol 3	0	0	0	0
	Kontrol 4	0	0	0	0
	Toplam	0	0	0	0
6. Hafta	Kontrol 1	0	0	0	0
	Kontrol 2	0	0	0	0
	Kontrol 3	0	0	0	0
	Kontrol 4	0	1	0	0,5
	Toplam	0	1	1	0,13

Tablo 4.2. Kontrol grubu radyograflerinin 2. Ortopediste göre değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Ön-Arka	Yan	Toplam	Ortalama
4. Hafta	Kontrol 1	0	0	0	0
	Kontrol 2	0	0	0	0
	Kontrol 3	0	0	0	0
	Kontrol 4	0	0	0	0
	Toplam	0	0	0	0
6. Hafta	Kontrol 1	0	0	0	0
	Kontrol 2	0	0	0	0
	Kontrol 3	1	0	1	0,5
	Kontrol 4	1	1	2	1
	Toplam	2	1	3	0,38

Tablo 4.3. EGF grubu radyograflerinin 1. Ortopediste göre değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Ön-Arka	Yan	Toplam	Ortalama
4. Hafta	EGF 1	0	0	0	0
	EGF 2	0	1	1	0,5
	EGF 3	1	0	1	0,5
	EGF 4	0	0	0	0
	EGF 5	1	0	1	0,5
	Toplam	2	1	3	0,3
6. Hafta	EGF 1	1	1	2	1
	EGF 2	1	2	3	1,5
	EGF 3	2	1	3	1,5
	EGF 4	1	1	2	1
	EGF 5	1	2	3	1,5
	Toplam	6	7	13	1,3

Tablo 4.4. EGF grubu radyograflerinin 2. Ortopediste göre değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Ön-Arka	Yan	Toplam	Ortalama
4. Hafta	EGF 1	0	0	0	0
	EGF 2	0	1	1	0,5
	EGF 3	1	0	1	0,5
	EGF 4	0	1	1	0,5
	EGF 5	1	0	1	0,5
	Toplam	2	2	4	0,4
6. Hafta	EGF 1	1	1	2	1
	EGF 2	2	2	4	2
	EGF 3	2	1	3	1,5
	EGF 4	1	1	2	1
	EGF 5	1	2	3	1,5
	Toplam	7	7	14	1,4

Tablo 4.5. HA grubu radyograflerinin 1. Ortopediste göre değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Ön-Arka	Yan	Toplam	Ortalama
4. Hafta	HA 1	1	0	1	0,5
	HA 2	0	0	0	0
	HA 3	0	0	0	0
	HA 4	0	0	0	0
	HA 5	1	0	1	0,5
	Toplam	2	0	2	0,2
6. Hafta	HA 1	1	1	2	1
	HA 2	0	1	1	0,5
	HA 3	1	1	2	1
	HA 4	0	1	1	0,5
	HA 5	1	1	2	1
	Toplam	3	5	8	0,8

Tablo 4.6. HA grubu radyograflerinin 2. Ortopediste göre değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Ön-Arka	Yan	Toplam	Ortalama
4. Hafta	HA 1	0	0	0	0
	HA 2	0	1	1	0,5
	HA 3	0	0	0	0
	HA 4	1	0	1	0,5
	HA 5	0	0	0	0
	Toplam	1	1	2	0,2
6. Hafta	HA 1	1	1	2	1
	HA 2	0	1	1	0,5
	HA 3	1	1	2	1
	HA 4	0	1	1	0,5
	HA 5	1	1	2	1
	Toplam	3	5	8	0,8

Tablo 4.7. Kombine grubu radyograflerinin 1. Ortopediste göre değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Ön-Arka	Yan	Toplam	Ortalama
4. Hafta	Kombine 1	1	1	2	1
	Kombine 2	1	1	2	1
	Kombine 3	2	1	3	1,5
	Kombine 4	2	2	4	2
	Kombine 5	2	1	3	1,5
	Toplam	8	6	14	1,4
6. Hafta	Kombine 1	2	3	5	2,5
	Kombine 2	2	2	4	2
	Kombine 3	2	2	4	2
	Kombine 4	2	2	4	2
	Kombine 5	2	3	5	2,5
	Toplam	10	12	22	2,2

Tablo 4.8. Kombine grubu radyograflerinin 2. Ortopediste göre değerlendirme bulguları.

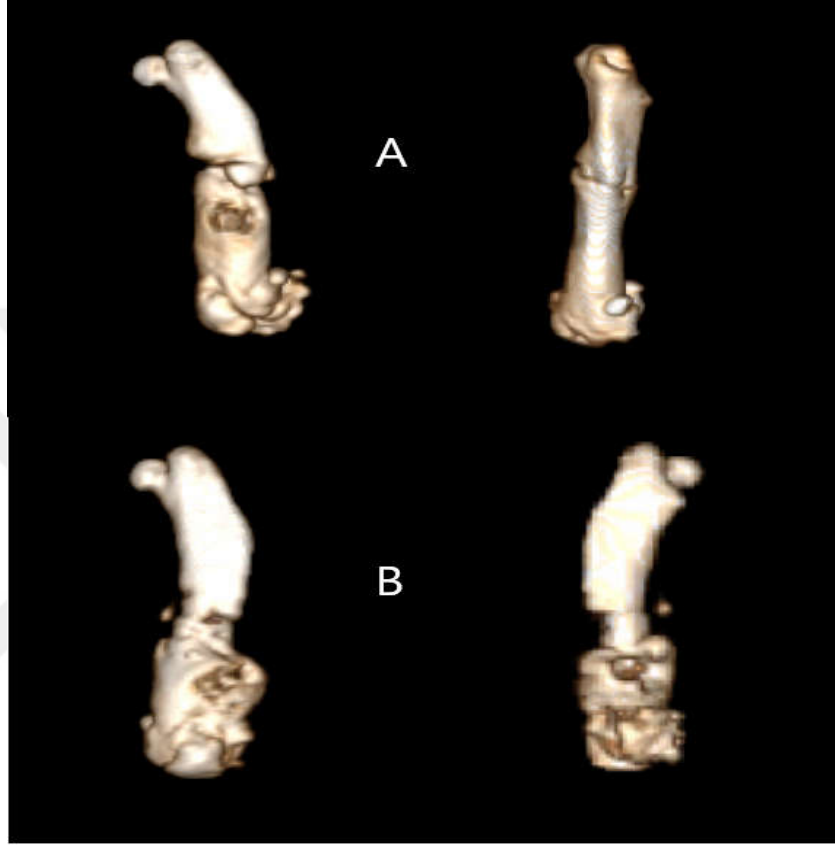
Hafta	Rat	Ön-Arka	Yan	Toplam	Ortalama
4. Hafta	Kombine 1	1	1	2	1
	Kombine 2	1	1	2	1
	Kombine 3	2	1	3	1,5
	Kombine 4	2	1	3	1,5
	Kombine 5	2	2	4	2
	Toplam	8	6	14	7
6. Hafta	Kombine 1	2	2	4	2
	Kombine 2	2	2	4	2
	Kombine 3	2	2	4	2
	Kombine 4	2	2	4	2
	Kombine 5	2	3	5	2,5
	Toplam	10	11	21	2,1

Her iki ortopedistin gruplar özelinde ortalama puanları Tablo 4.9.'da gösterilmiştir. Direkt radyografilerin sonunda tüm femurlara bilgisayarlı tomografi uygulandı.

Tablo 4.9. İki ayrı ortopedist tarafından değerlendirilen radyolojik bulguların dağılımı.

Hafta	Grup	1. Ortopedist	2. Ortopedist
4. Hafta	Kontrol	0	0
	EGF	0,3	0,4
	HA	0,2	0,2
	Kombine	1,4	1,4
6. Hafta	Kontrol	0,13	0,38
	EGF	1,3	1,4
	HA	0,8	0,8
	Kombine	2,2	2,1

3 boyutlu rekonstrüksiyon sonucu 6. hafta EGF grup ile 4 ve 6. hafta Kombine grup femurlarının distal metafizyel bölgelerinde kistler tespit edilmiş olup, kistlerin ölçüleri Tablo 4.10.– Tablo 4.11.'de verilmiştir. (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Bilgisayarlı Tomografi uygulanan femur örnekleri. A: EGF grubu - 6. hafta, B: Kombine grup - 6. hafta.

Tablo 4.10. 3 boyutlu rekonstrüksiyon sonrası 4. hafta Kombine grupta tespit edilen kistlerin ölçüleri.

Grup	Lokasyon	Boyut
Kombine 1	Anterior	0,80 mm x 1,11 mm
Kombine 2	Posterior	1,11 mm x 1,74 mm
Kombine 3	Mevcut değil	Mevcut değil
Kombine 4	Mevcut değil	Mevcut değil
Kombine 5	Anterior	0,92 mm x 0,85 mm

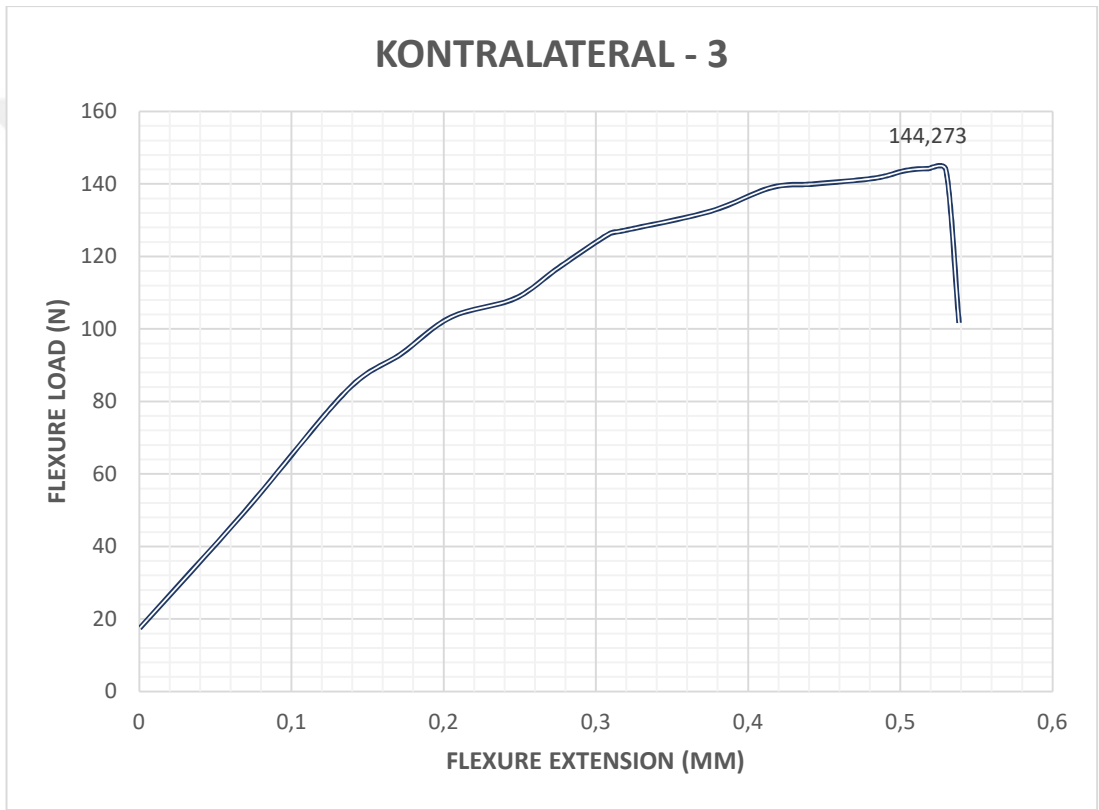
Tablo 4.11. 3 boyutlu rekonstrüksiyon sonrası 6. hafta EGF ve Kombine gruplarında tespit edilen kistlerin ölçüleri.

Grup	Lokasyon	Boyut
EGF 1	Anterior	5,29 mm x 3,75 mm
EGF 2	Mevcut değil	Mevcut değil
EGF 3	Mevcut değil	Mevcut değil
EGF 4	Posterior	3,42 mm x 2,73 mm
EGF 5	Anterior	3,75 mm x 2,97 mm
Kombine 1	Posterior	2,95 mm x 2,70 mm
Kombine 2	Anterior	4,65 mm x 1,93 mm
Kombine 3	Anterior	4,53 mm x 2,52 mm
Kombine 4	Anterior	5,55 mm x 3,51 mm
	Posterior	5,32 mm x 3,17 mm
Kombine 5	Anterior	4,90mm x 2,94 mm

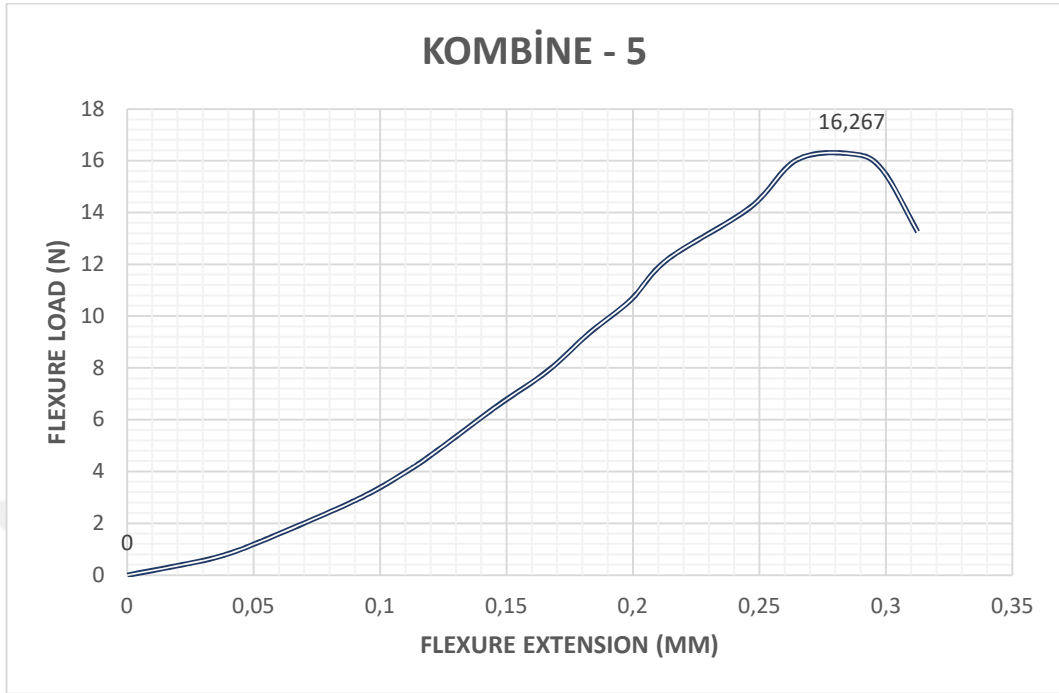
4.2. BİYOMEKANİK BULGULAR

Radyolojik incelemenin ardından, tüm femurlara 3 nokta bükülme testi kullanılarak biyomekaniksel inceleme uygulandı. Biyomekaniksel inceleme sonrası elde edilen kuvvet – yerdeğiştirme verileri kullanılarak grafikler hazırlandı ve maksimum kuvvet değeri ile katılık değeri hesaplandı (Grafik 4.1.- Grafik 4.6.).

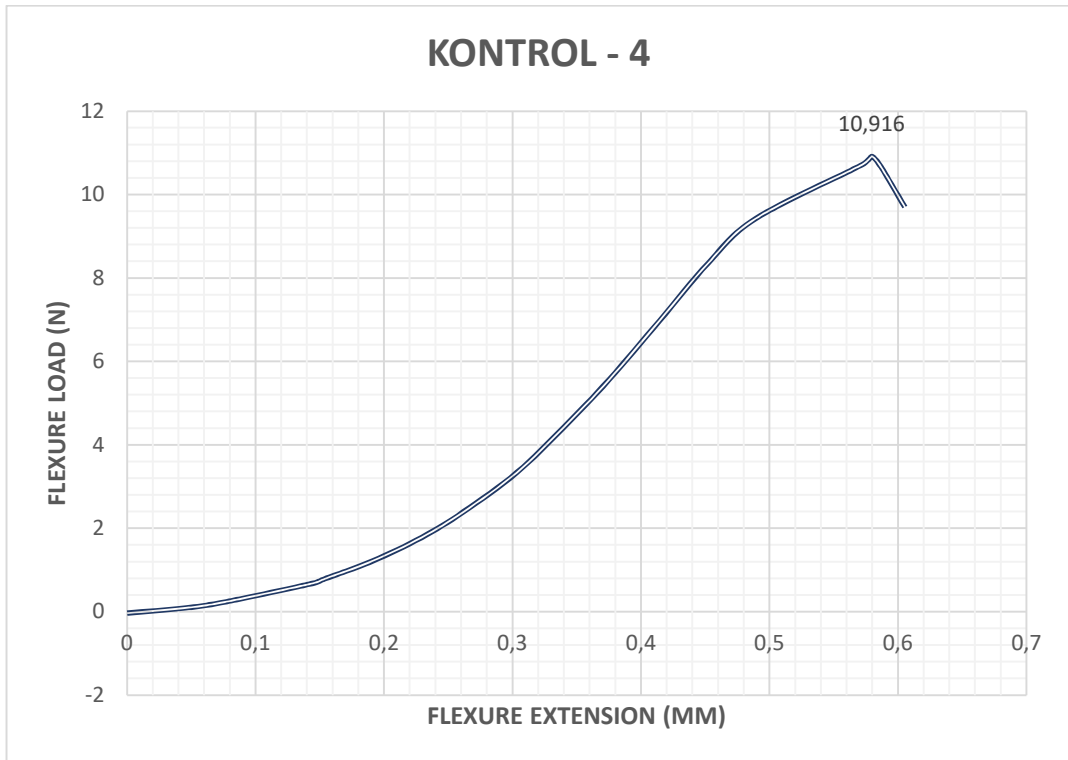
Grafik 4.1. Kontralateral grup biyomekanik bulgu grafiği.



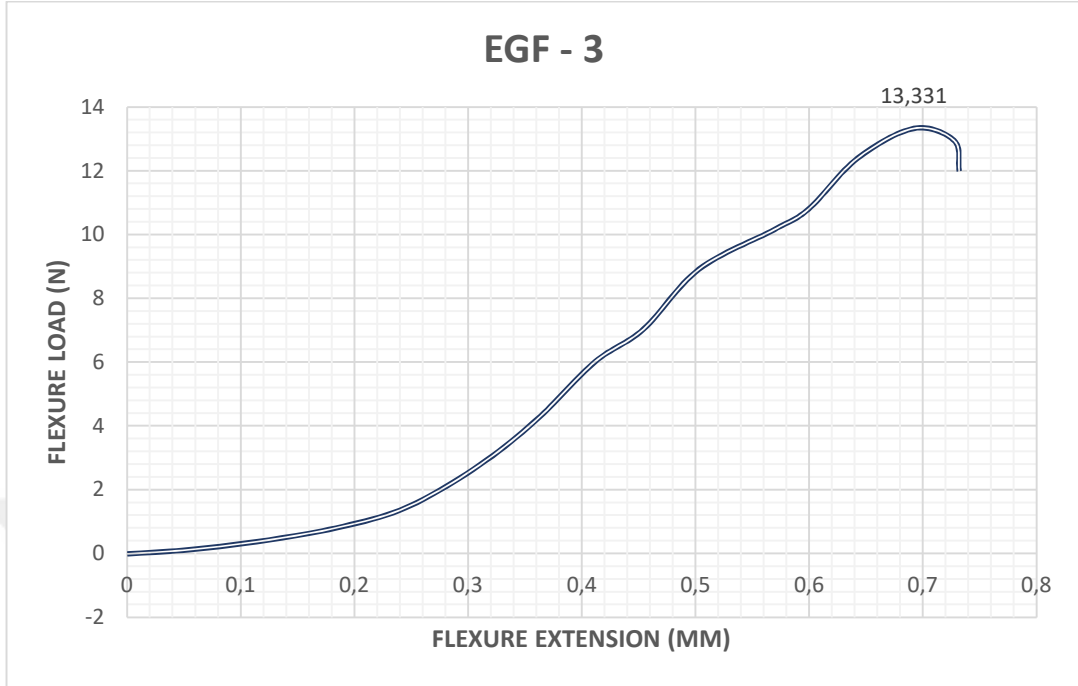
Grafik 4.2. Kombine grup- 4. hafta biyomekanik bulgu grafiği.



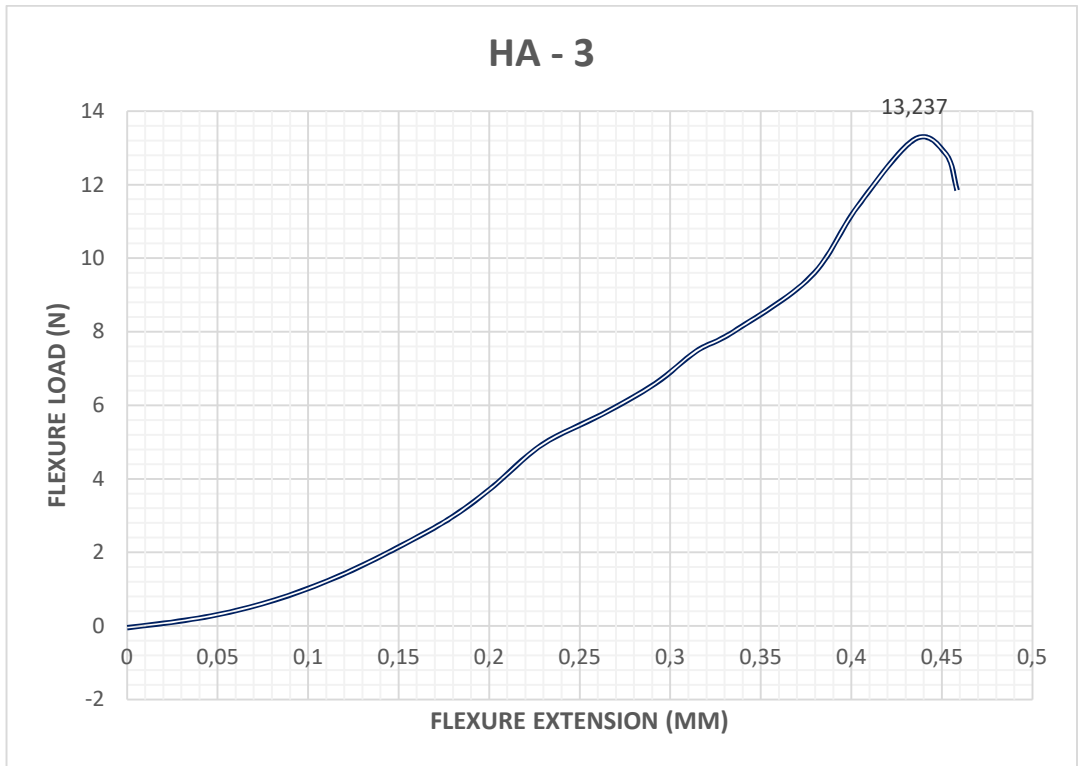
Grafik 4.3. Kontrol grubu- 6. hafta biyomekanik bulgu grafiği.



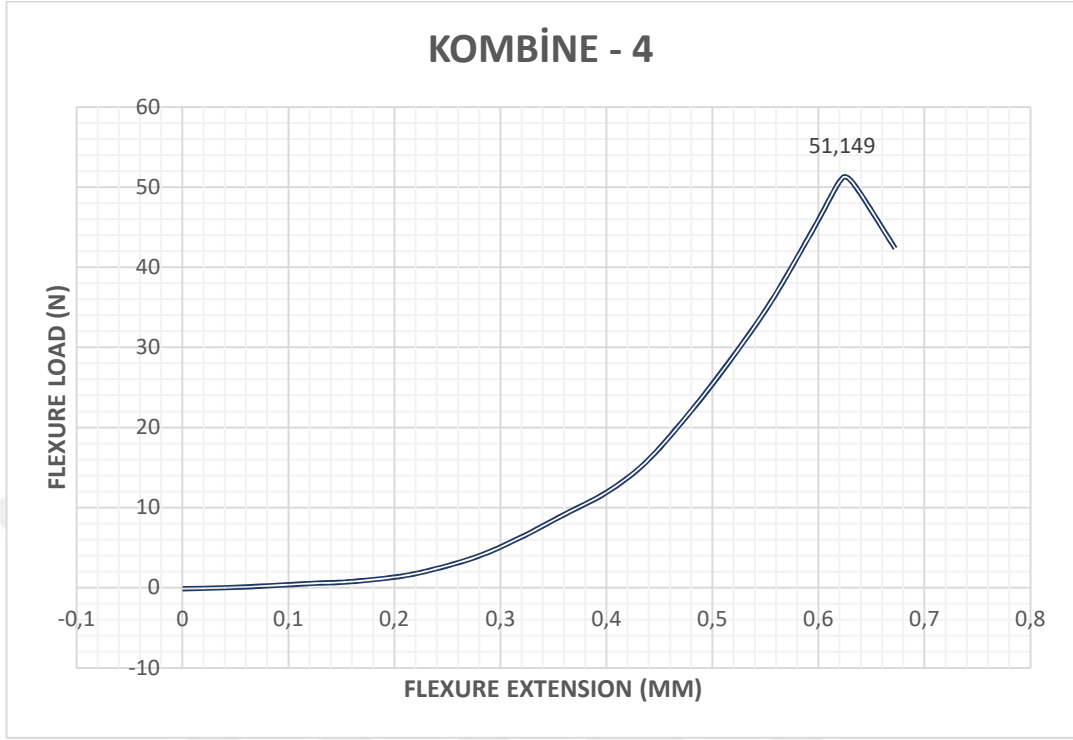
Grafik 4.4. EGF grubu- 6. hafta biyomekanik bulgu grafiği



Grafik 4.5. HA grubu- 6. hafta biyomekanik bulgu grafiği



Grafik 4.6. Kombine grup- 6. hafta biyomekanik bulgu grafiği



Maksimum kuvvet, Kontralateral grup için ortalama 145,902 N olarak hesaplandı. Sırası ile 4 ve 6. haftalarda Kontrol grubunda ortalama 0 N ile 10,925 N; EGF grubunda ortalama 0 N ile 17,700 N; HA grubunda 0 N ile 16,201 N; Kombine grupta ise 18,812 N ile 58,183 N olarak hesaplandı.

Katılık değeri, Kontralateral grup için ortalama 331,737 N/mm olarak hesaplandı. Sırası ile 4. ve 6. haftalarda Kontrol grubunda ortalama 0 N ile 36,368 N/mm; EGF grubunda ortalama 0 N ile 36,133 N/mm; HA grubunda 0 N ile 36,284 N/mm; Kombine grupta ise 56,115 N/mm ile 94,120 N/mm olarak hesaplandı.

Tüm grupların maksimum kuvvet ve katılık değeri Tablo 4.12.-4.16.'da ortalama değeri de Tablo 4.17.'de verilmiştir.

Tablo 4.12. Kontralateral gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları.

Rat	Maksimum Kuvvet (N)	Katılık (N/mm)
Kontralateral 1	149,035	233,060
Kontralateral 2	147,235	238,914
Kontralateral 3	144,273	419,553
Kontralateral 4	143,063	435,422
Ortalama	145,902	331,737

Tablo 4.13. Kontrol gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Maksimum Kuvvet (N)	Katılık (N/mm)
4. Hafta	Kontrol 1	0	0
	Kontrol 2	0	0
	Kontrol 3	0	0
	Kontrol 4	0	0
	Ortalama	0	0
6. Hafta	Kontrol 1	11,427	22,020
	Kontrol 2	9,253	64,177
	Kontrol 3	12,105	39,994
	Kontrol 4	10,916	19,282
	Ortalama	10,925	36,368

Tablo 4.14. EGF gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Maksimum Kuvvet (N)	Katılık (N/mm)
4. Hafta	EGF 1	0	0
	EGF 2	0	0
	EGF 3	0	0
	EGF 4	0	0
	EGF 5	0	0
	Ortalama	0	0
6. Hafta	EGF 1	17,740	31,759
	EGF 2	18,110	26,845
	EGF 3	13,331	18,018
	EGF 4	19,965	54,085
	EGF 5	19,356	49,958
	Ortalama	17,700	36,133

Tablo 4.15. HA gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Maksimum Kuvvet (N)	Katılık (N/mm)
4. Hafta	HA 1	0	0
	HA 2	0	0
	HA 3	0	0
	HA 4	0	0
	HA 5	0	0
	Ortalama	0	0
6. Hafta	HA 1	19,698	34,652
	HA 2	16,104	31,030
	HA 3	13,237	25,161
	HA 4	13,714	52,087
	HA 5	18,254	38,488
	Ortalama	16,201	36,283

Tablo 4.16. Kombine gruba uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme bulguları.

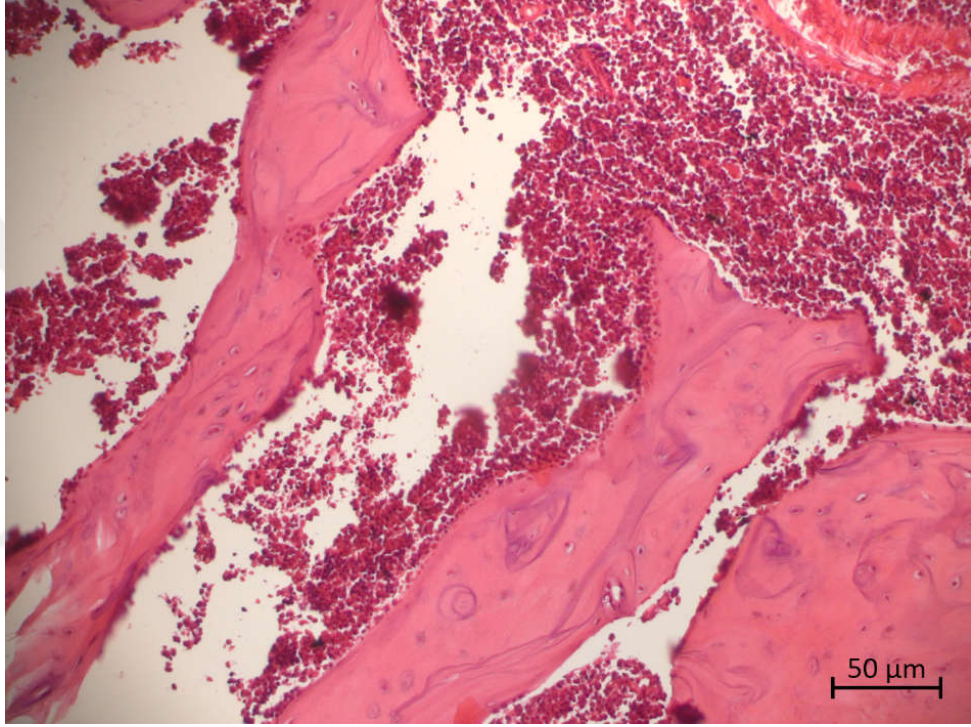
Hafta	Rat	Maksimum Kuvvet (N)	Katılık (N/mm)
4. Hafta	Kombine 1	18,031	54,488
	Kombine 2	14,571	52,870
	Kombine 3	23,208	60,587
	Kombine 4	16,267	55,547
	Kombine 5	21,984	57,085
	Ortalama	18,812	56,115
6. Hafta	Kombine 1	50,606	80,15815
	Kombine 2	65,945	52,413
	Kombine 3	59,367	141,9173
	Kombine 4	51,149	100,9622
	Kombine 5	63,849	95,14875
	Ortalama	58,183	94,120

Tablo 4.17. Tüm gruplara uygulanan biyomekaniksel testlerin değerlendirme ortalamaları.

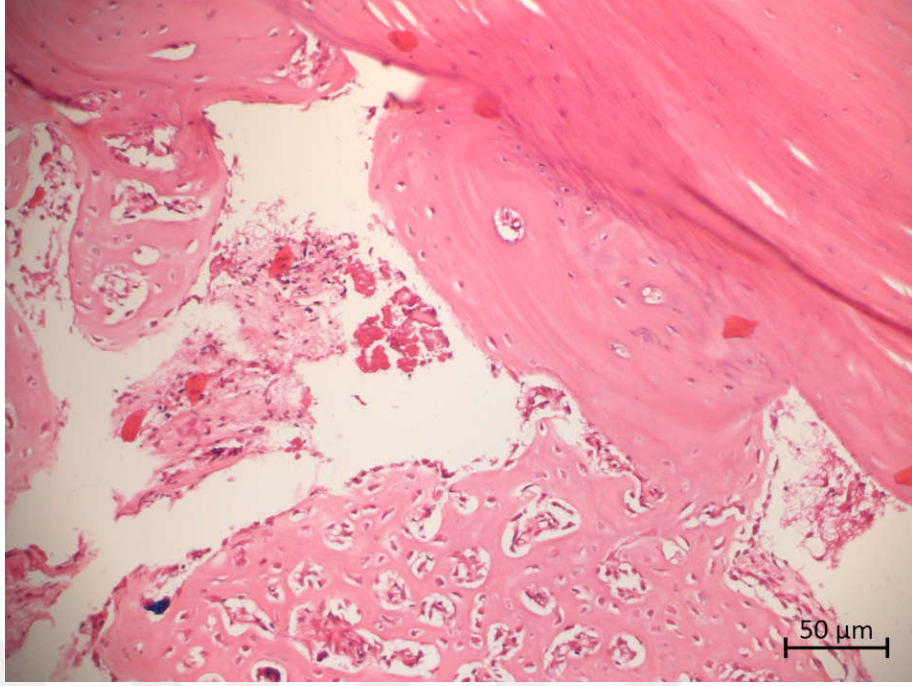
Hafta	Grup	Maksimum Kuvvet (N)	Katılık (N/mm)
	Kontralateral	145,902	331,737
4. Hafta	Kontrol	0	0
	EGF	0	0
	HA	0	0
	Kombine	18,812	56,115
6. Hafta	Kontrol	10,925	36,368
	EGF	17,700	36,133
	HA	16,201	36,284
	Kombine	58,183	94,120

4.3. HİSTOLOJİK BULGULAR

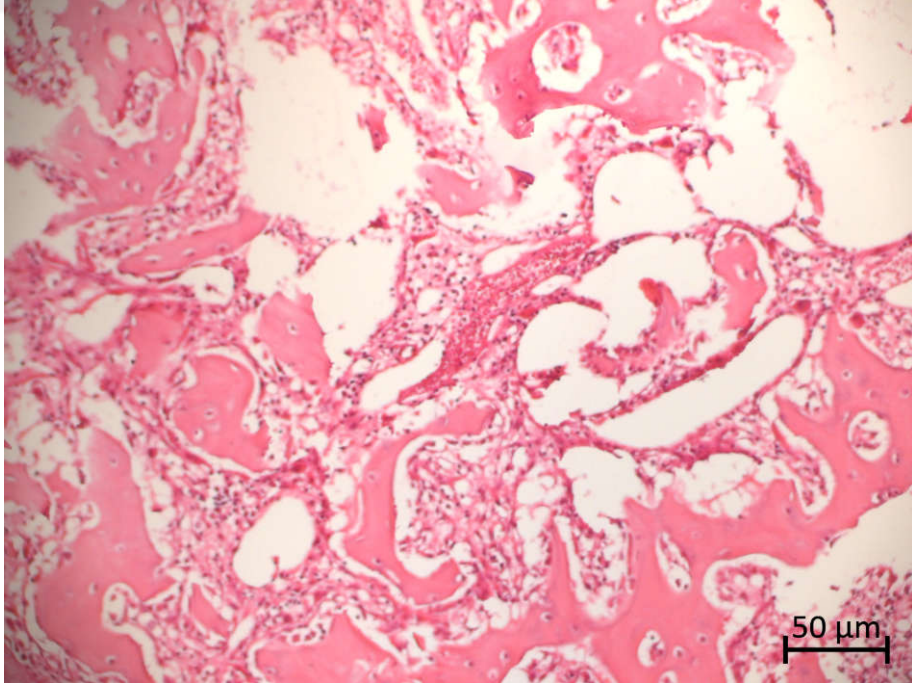
Biyomekaniksel incelemenin ardından, tüm femur örnekleri, kırık hattının 1 cm proksimal ve distalini kapsayacak şekilde kesildi. Tüm örnekler 2 parçaya ayrılarak histolojik inceleme için hazırlandı. Hazırlanan kesitler Işık Mikroskopisinde incelendi (Şekil 4.4.–Şekil 4.12.)



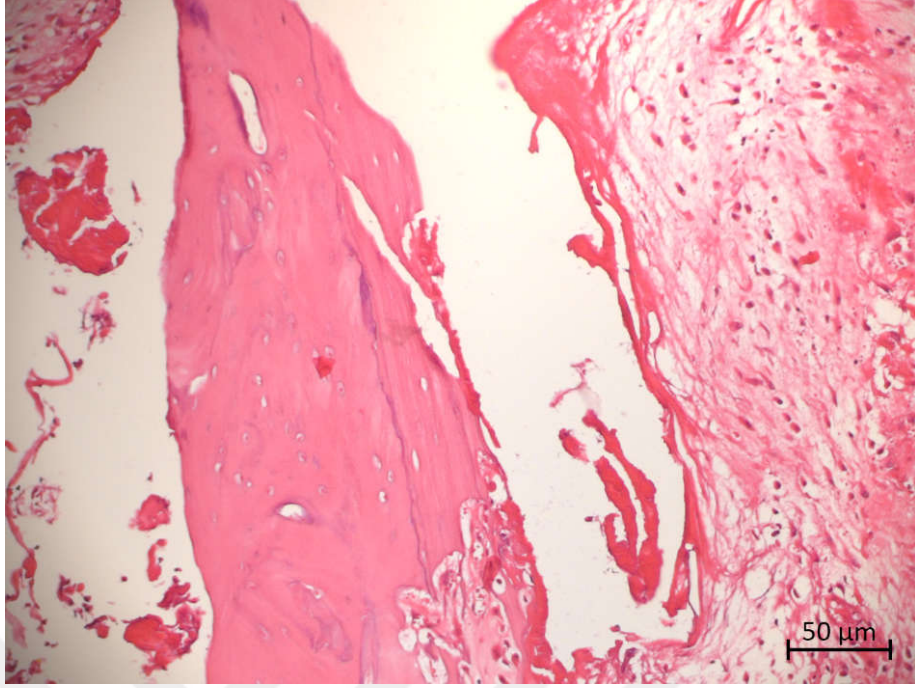
Şekil 4.4. Kontralateral grup histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü.



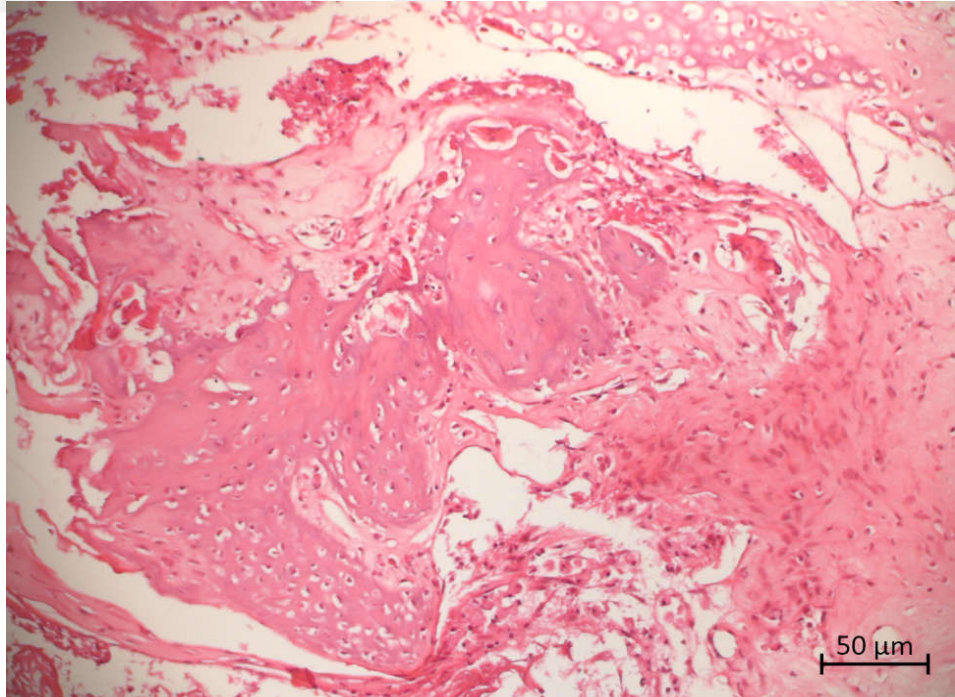
Şekil 4.5. 4. hafta Kontrol grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü. Fibröz doku oluşumu izlenmektedir.



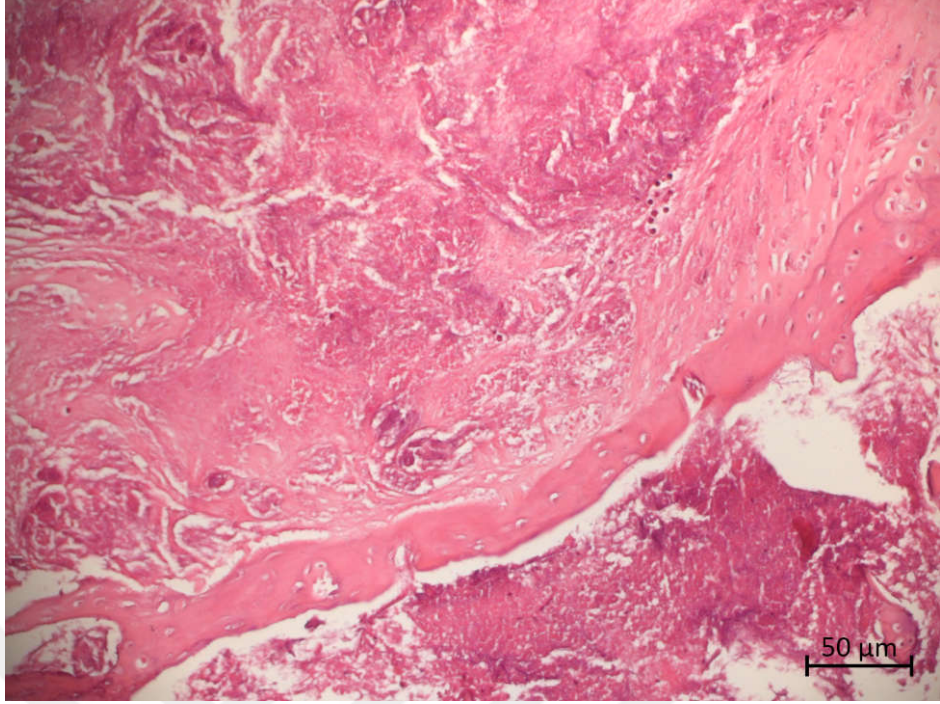
Şekil 4.6. 6. hafta Kontrol grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü. Fibröz doku hakimiyeti izlenmektedir.



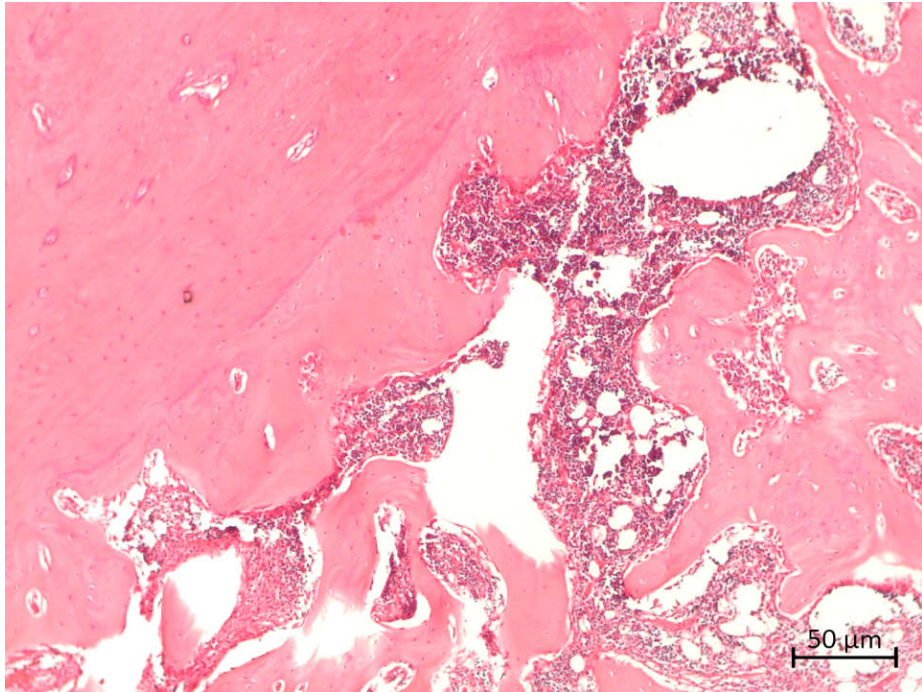
Şekil 4.7. 4. hafta EGF grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü. Kıkırdak doku oluşumu izlenmektedir.



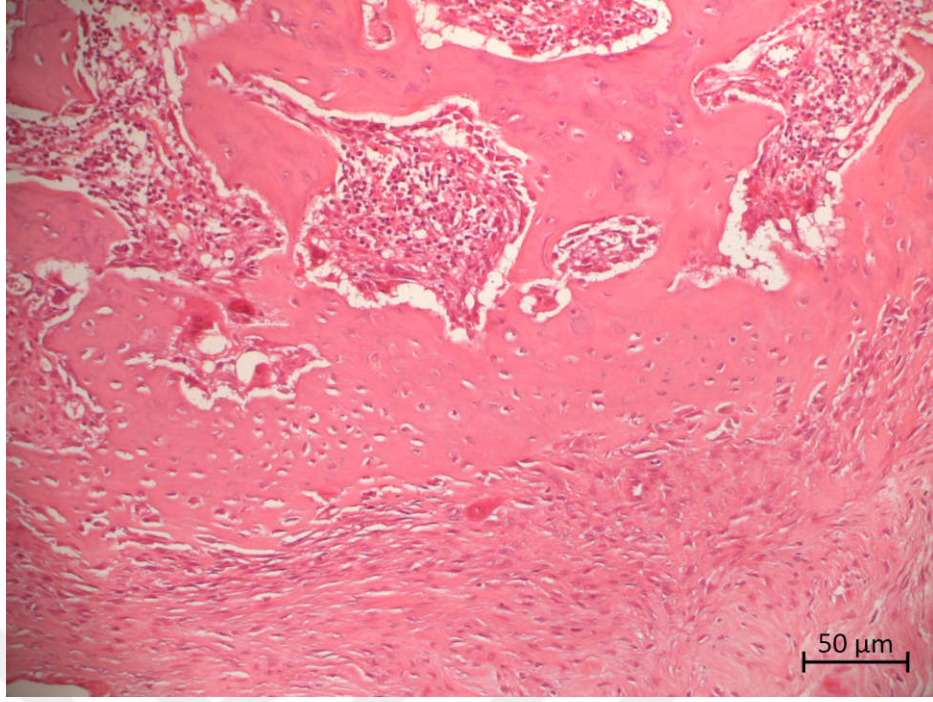
Şekil 4.8. 6. hafta EGF grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü. Kıkırdak doku hakimiyeti izlenmektedir.



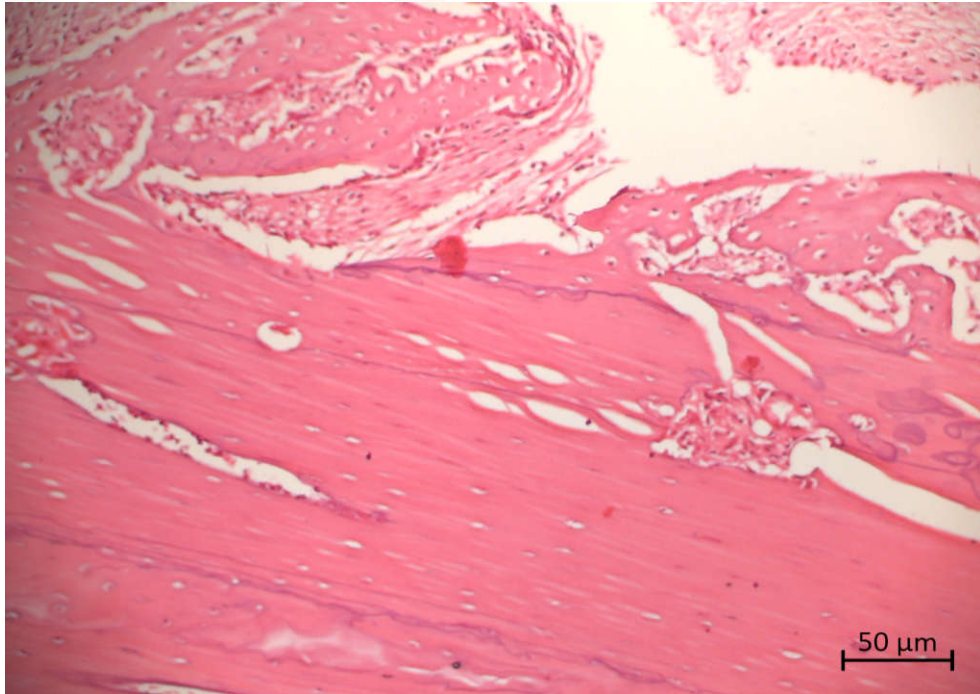
Şekil 4.9. 4. hafta HA grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü. Kıkırdak doku oluşumu izlenmektedir.



Şekil 4.10. 6. hafta HA grubu histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü. Kıkırdak doku hakimiyeti izlenmektedir.



Şekil 4.11. 4. hafta Kombine grup histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü. Yeni kemik doku oluşumu izlenmektedir.



Şekil 4.12. 6. hafta Kombine grup histopatolojik örneğinin Hematoksilen & Eozin ile boyalı görünümü. Yeni kemik doku hakimiyeti izlenmektedir.

Işık Mikroskopisi bulguları Huo ve arkadaşları tarafından yayınlanan [85] skorlama sistemi kullanılarak, Atılım Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa SARGON tarafından sınıflandırıldı.

Işık Mikroskopisi inceleme değeri, Kontralateral grup için ortalama 1 puan olarak hesaplandı. Sırası ile 4. ve 6. haftalarda Kontrol grubunda ortalama 1 puan ile 2 puan; EGF grubunda ortalama 3,6 puan ile 3,8 puan; HA grubunda 3 puan ile 3,4 puan; Kombine grupta ise 5,2 puan ile 6,6 puan olarak hesaplandı.

Tüm grupların histolojik inceleme değerleri Tablo 4.18.-4.22.'de, ortalama değerleri Tablo 4.23.'te verilmiştir.

Tablo 4.18. Kontralateral grup histolojik değerlendirme bulguları.

Rat	Huo Sınıflama Skoru
Kontralateral 1	1
Kontralateral 2	1
Kontralateral 3	1
Kontralateral 4	1
Ortalama	1

Tablo 4.19. Kontrol grubu histolojik değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Huo Sınıflama Skoru
4. Hafta	Kontrol 1	1
	Kontrol 2	1
	Kontrol 3	1
	Kontrol 4	1
	Ortalama	1
6. Hafta	Kontrol 1	2
	Kontrol 2	2
	Kontrol 3	2
	Kontrol 4	2
	Ortalama	2

Tablo 4.20. EGF grubu histolojik değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Huo Sınıflama Skoru
4. Hafta	EGF 1	3
	EGF 2	3
	EGF 3	4
	EGF 4	4
	EGF 5	4
	Ortalama	3,6
6. Hafta	EGF 1	4
	EGF 2	4
	EGF 3	4
	EGF 4	4
	EGF 5	3
	Ortalama	3,8

Tablo 4.21. HA grubu histolojik değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Huo Sınıflama Skoru
4. Hafta	HA 1	3
	HA 2	3
	HA 3	3
	HA 4	3
	HA 5	3
	Ortalama	3
6. Hafta	HA 1	4
	HA 2	4
	HA 3	3
	HA 4	3
	HA 5	3
	Ortalama	3,4

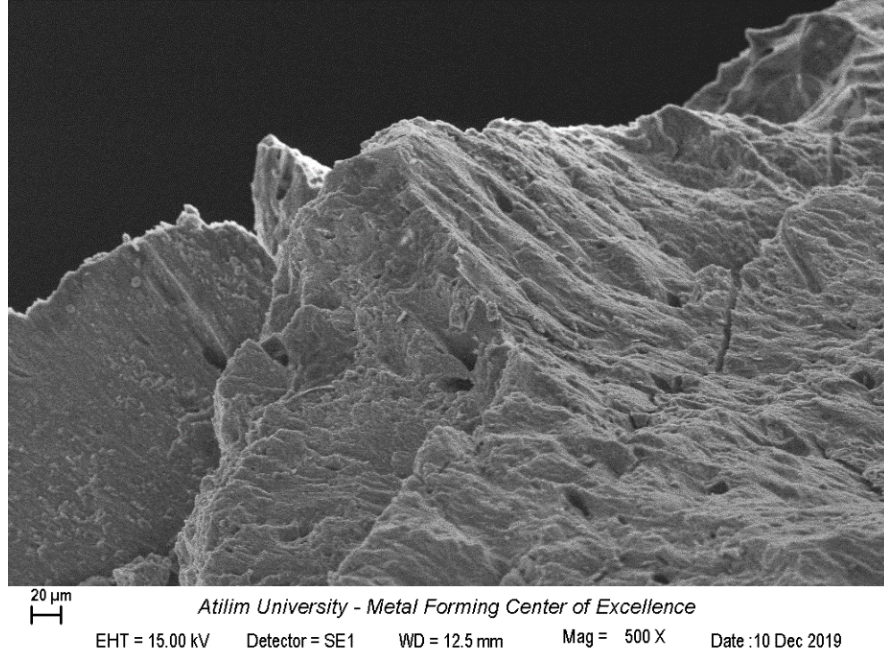
Tablo 4.22. Kombine grubu histolojik değerlendirme bulguları.

Hafta	Rat	Huo Sınıflama Skoru
4. Hafta	Kombine 1	5
	Kombine 2	5
	Kombine 3	5
	Kombine 4	5
	Kombine 5	6
	Ortalama	5,2
6. Hafta	Kombine 1	7
	Kombine 2	7
	Kombine 3	7
	Kombine 4	6
	Kombine 5	6
	Ortalama	6,6

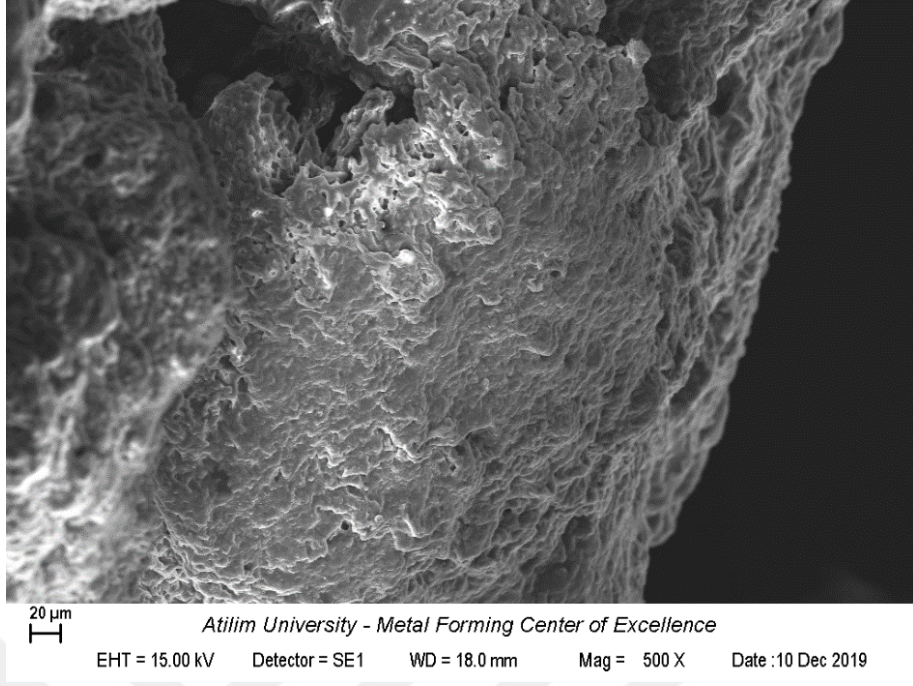
Tablo 4.23. Tüm gruplara uygulanan histolojik inceleme ortalamaları.

Hafta	Grup	Huo Sınıflama Skoru
	Kontralateral	1
4. Hafta	Kontrol	1
	EGF	3,6
	HA	3
	Kombine	5,2
6. Hafta	Kontrol	2
	EGF	3,8
	HA	3,4
	Kombine	6,6

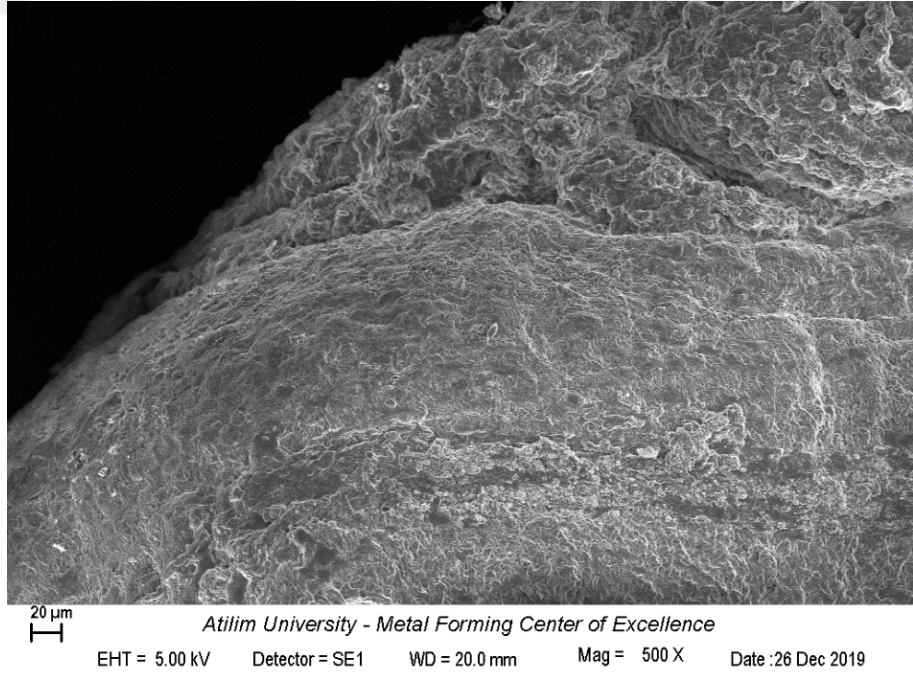
Femur kesitlerinden alınan örneklerin SEM inceleme bulguları kalitatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.13.–Şekil 4.21.). Değerlendirme bulguları Tablo 4.24’te verilmiştir.



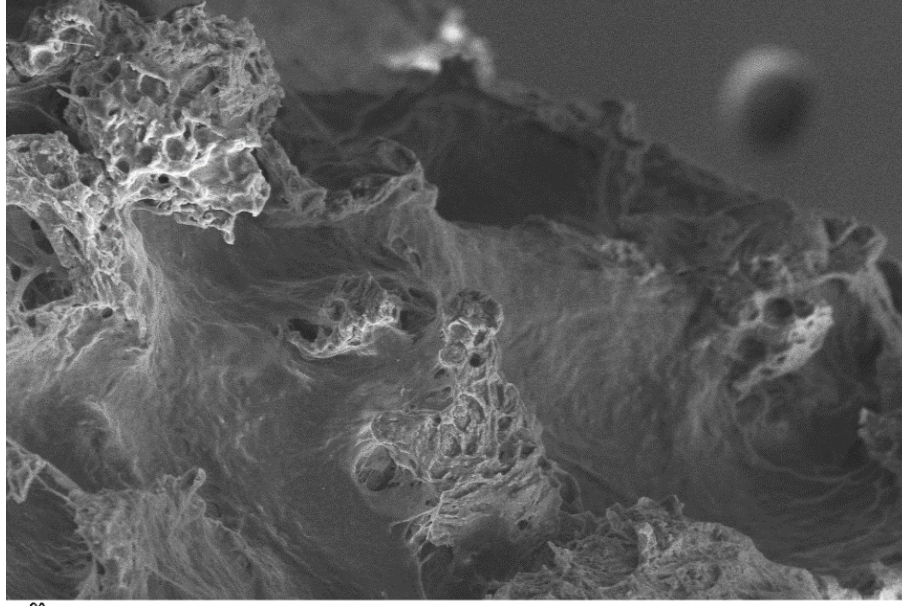
Şekil 4.13. Kontralateral grup SEM görüntüsü. Kırık ucu gözlenmektedir.



Şekil 4.14. 4. hafta Kontrol grubu SEM görüntüsü. Kırık ucunda fibröz doku gözlenmektedir.



Şekil 4.15. 6. hafta Kontrol grubu SEM görüntüsü. Kırık ucunda eser miktarda yeni oluşan kemik doku gözlenmektedir.

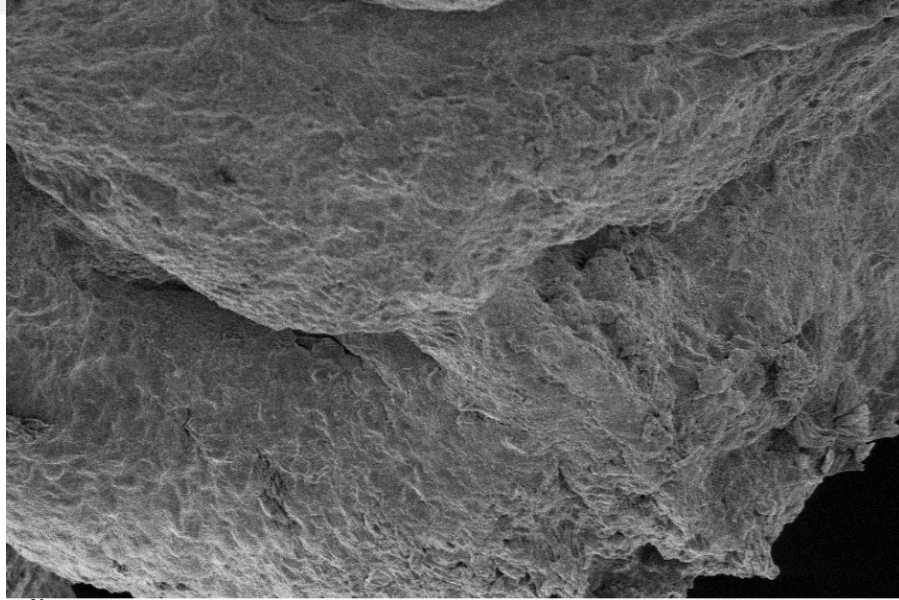


20 μ m

Atilim University - Metal Forming Center of Excellence

EHT = 15.00 kV Detector = SE1 WD = 8.5 mm Mag = 500 X Date :10 Dec 2019

Şekil 4.16. 4. hafta EGF grubu SEM görüntüsü. Kırık hattı çevresinde trabeküler kemik doku artışı gözlenmektedir.

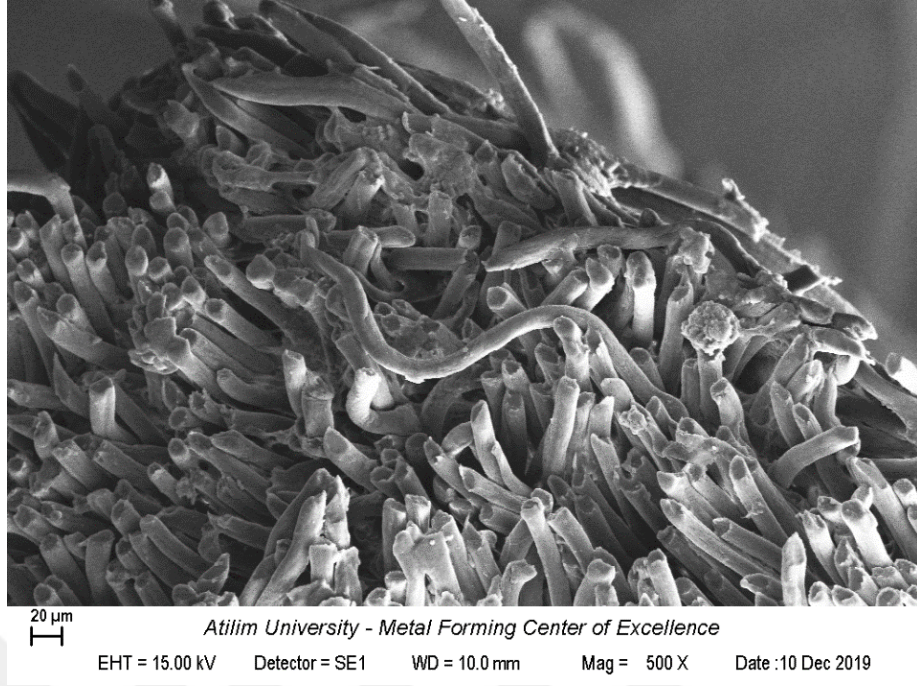


20 μ m

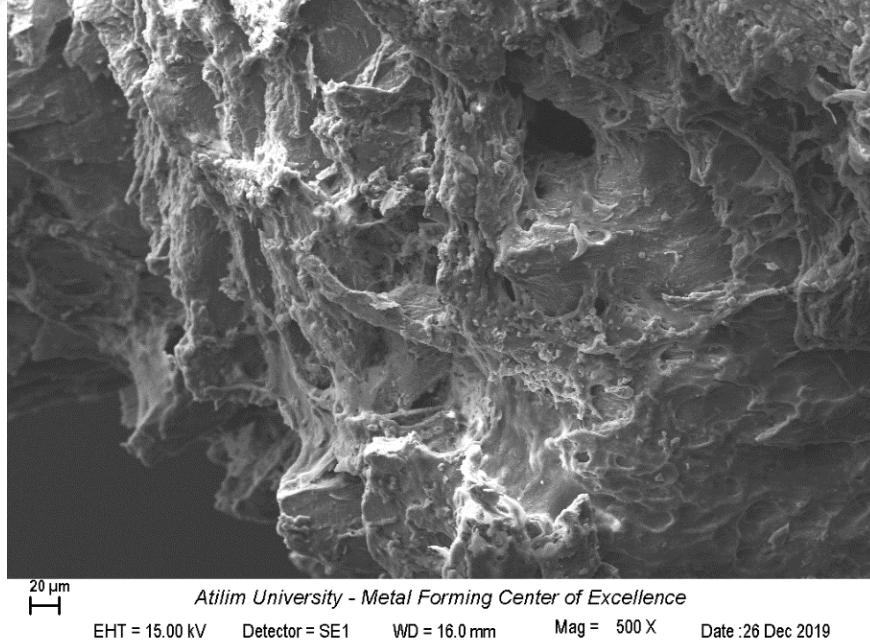
Atilim University - Metal Forming Center of Excellence

EHT = 5.00 kV Detector = SE1 WD = 17.0 mm Mag = 500 X Date :26 Dec 2019

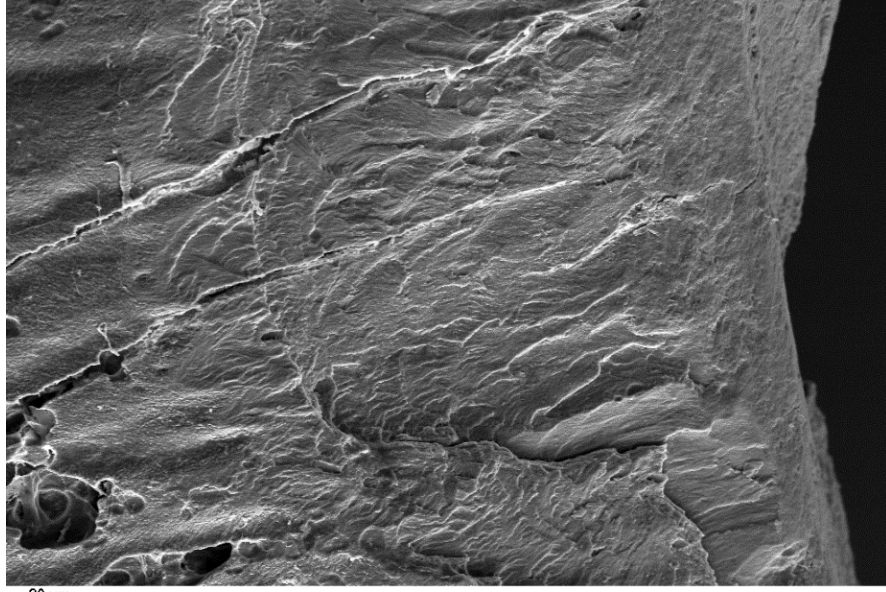
Şekil 4.17. 6. hafta EGF grubu SEM görüntüsü. Kırık hattı çevresinde yaygın trabeküler kemik doku artışı gözlenmektedir.



Şekil 4.18. 4. hafta HA grubu SEM görüntüsü. Kırık hattı çevresinde yaygın fibröz doku lifleri gözlenmektedir.

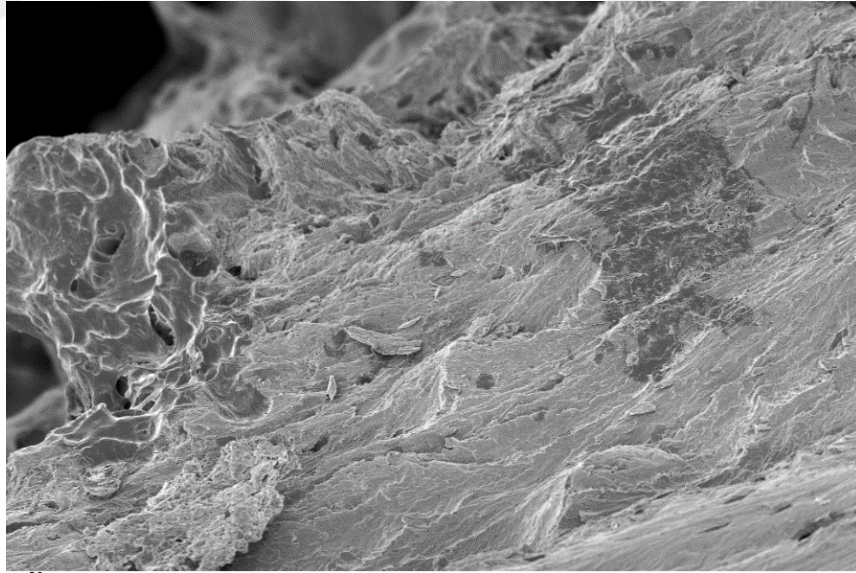


Şekil 4.19. 6. hafta HA grubu SEM görüntüsü. Kırık hattı çevresinde yaygın fibröz doku ve trabeküler kemik doku oluşumu gözlenmektedir.



20 µm
Atilim University - Metal Forming Center of Excellence
EHT = 15.00 kV Detector = SE1 WD = 8.5 mm Mag = 500 X Date :10 Dec 2019

Şekil 4.20. 4. hafta Kombine grup SEM görüntüsü. Yaygın yeni örgü kemik doku oluşumu gözlenmektedir.



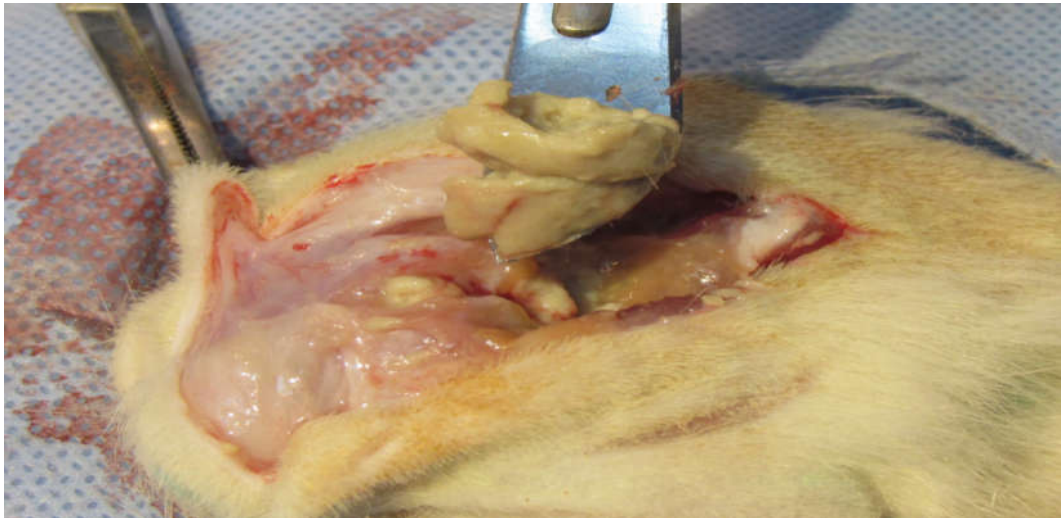
20 µm
Atilim University - Metal Forming Center of Excellence
EHT = 5.00 kV Detector = SE1 WD = 17.0 mm Mag = 500 X Date :26 Dec 2019

Şekil 4.21. 6. hafta Kombine grup SEM görüntüsü. Yaygın yeni trabeküler kemik doku oluşumu gözlenmektedir.

Tablo 4.24. Tüm gruplara uygulanan SEM histolojik inceleme kalitatif değerlendirme bulguları.

Hafta	Grup	SEM inceleme bulguları
	Kontralateral	Kırık uçları gözlenmekte
4. Hafta	Kontrol	Kırık uçları gözlenmekte
	EGF	Trabeküler yapı gözlenmekte
	HA	Bağ dokusu lifleri ve fibröz doku gözlenmekte
	Kombine	Oluşmuş yeni kemik doku ve nadir kapanmamış alan mevcudiyeti gözlenmekte
6. Hafta	Kontrol	Yüzeyde az miktarda kemik doku gözlenmekte
	EGF	Oluşmuş yeni kemik doku gözlenmekte
	HA	Fibröz doku ve oluşmuş yeni kemik dokusu gözlenmekte
	Kombine	Zengin trabeküler kemik doku ve oluşmuş yeni kemik doku gözlenmekte

EGF ve Kombine gruplarında, sakrifikasyon sonucu uygulanan rezeksiyon sonucunda, kemik doku ve kas doku arasında partiküler yapı gözlemlendi. Partiküler yapının histopatolojik incelemesinde kemik doku olduğu saptandı ve herhangi bir malignite bulgusuna rastlanmadı (Fotoğraf 4.22.).



Fotoğraf 4.22. Sakrifikasyon sonucu kemik dokuda görülen partiküler yapı.

4.4. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Yapılan istatistiksel değerlendirmede Kontralateral grup, Kontrol grubu, EGF grubu, HA grubu ve Kombine grup hem kendi ilerinde ve hem de birbirleri ile karşılıklı olarak incelenmiştir. EGF grubu, HA grubu ve Kombine grup, yapılan ‘Kruskel Wallis’ testine göre dördüncü ve altıncı hafta sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Radyolojik bulgular ele alındığında, iki bağımsız ortopedist tarafından Lane-Sandhu sınıflama sistemine göre skorlanan grupların sonuçları ‘Student’s T-test’ kullanılarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gözlenmiştir ($p=0,373$). Bu nedenle her iki ortopedist tarafından tanımlanan sonuçların ortalaması kullanılarak istatistiksel analiz uygulanmıştır.

Tüm grupların kendi aralarındaki istatistiksel analizi ‘Mann-Whitney’ testi kullanılarak incelenmiştir. (Tablo 4.25.-Tablo 4.28.)

Tablo 4.25. Tüm grupların istatistiksel dağılımları.

		Radyoloji Median (Minimum - Maksimum)	Maksimum Kuvvet (N) Ortalama (Standart Sapma)	Katılık (N/mm) Ortalama (Standart Sapma)	Histoloji Median (Minimum - Maksimum)
	Kontra Lateral	x	145,9 (± 2,73)	331,74 (± 110,78)	1,0 (1,0 – 1,0)
4. Hafta	Kontrol	0 (0 – 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1,0 (1,0 – 1,0)
	EGF	0,5 (0 – 0,5)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	4,0 (3,0 – 4,0)
	HA	0,25 (0 – 0,25)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	3,0 (3,0 – 3,0)
	Kombine	1,5 (1 – 1,75)	18,81 (± 3,69)	56,11 (± 2,93)	5,0 (5,0 – 6,0)
6. Hafta	Kontrol	0,12 (0 – 0,75)	10,92 (± 1,21)	36,37 (± 20,69)	2,0 (2,0 – 2,0)
	EGF	1,5 (1 – 1,75)	17,70 (± 2,60)	36,13 (± 15,38)	4,0 (3,0 – 4,0)
	HA	1 (0,5 – 1)	16,20 (± 2,80)	36,28 (± 10,11)	3,0 (3,0 – 4,0)
	Kombine	2 (2 – 2,5)	58,18 (± 7,08)	94,11 (± 32,66)	7,0 (6,0 – 7,0)

Tablo 4.26. 4. hafta gruplarının Mann-Whitney test sonuçları.

Gruplar	Radyoloji	Maksimum Kuvvet	Katılık	Histoloji
Kontralateral - Kontrol	x	p = 0,014	p = 0,014	p = 1,000
Kontralateral - EGF	x	p = 0,007	p = 0,007	p = 0,009
Kontralateral - HA	x	p = 0,007	p = 0,007	p = 0,005
Kontralateral - Kombine	x	p = 0,014	p = 0,014	p = 0,007
Kontrol – EGF	p = 0,028	p = 1,000	p = 1,000	p = 0,009
Kontrol – HA	p = 0,024	p = 1,000	p = 1,000	p = 0,005
Kontrol – Kombine	p = 0,010	p = 0,011	p = 0,011	p = 0,007
EGF – HA	p = 0,174	p = 1,000	p = 1,000	p = 0,050
EGF - Kombine	p = 0,008	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,006
HA - Kombine	p = 0,007	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,004

Tablo 4.27. 6. hafta gruplarının Mann-Whitney test sonuçları.

Gruplar	Radyoloji	Maksimum Kuvvet	Katılık	Histoloji
Kontralateral - Kontrol	x	p = 0,021	p = 0,021	p = 0,008
Kontralateral - EGF	x	p = 0,014	p = 0,014	p = 0,007
Kontralateral - HA	x	p = 0,014	p = 0,014	p = 0,009
Kontralateral - Kombine	x	p = 0,014	p = 0,014	p = 0,009
Kontrol – EGF	p = 0,013	p = 0,014	p = 1,000	p = 0,007
Kontrol – HA	p = 0,044	p = 0,014	p = 0,806	p = 0,009
Kontrol – Kombine	p = 0,012	p = 0,014	p = 0,027	p = 0,009
EGF – HA	p = 0,033	p = 0,465	p = 0,917	p = 0,221
EGF - Kombine	p = 0,008	p = 0,009	p = 0,016	p = 0,006
HA - Kombine	p = 0,007	p = 0,009	p = 0,009	p = 0,007

Tablo 4.28. 4. ve 6. hafta gruplarının kendi aralarında Mann-Whitney test sonuçları.

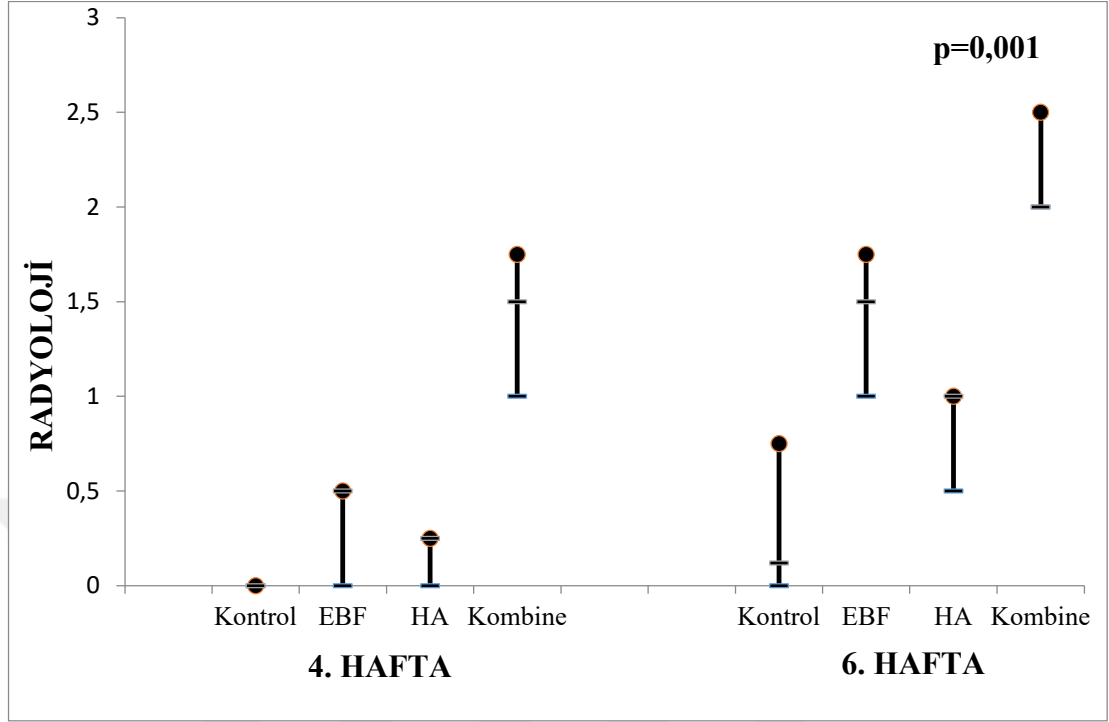
Gruplar	Radyoloji	Maksimum Kuvvet	Katılık	Histoloji
Kontrol	p = 0,131	p = 0,014	p = 0,014	p = 0,008
EGF	p = 0,008	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,513
HA	p = 0,006	p = 0,005	p = 0,005	p = 0,134
Kombine	p = 0,008	p = 0,009	p = 0,117	p = 0,011

Radyolojik bulgular incelendiğinde; 4. haftada tüm grupların radyolojik kaynama skorları, Kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Ancak EGF ve HA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

6. haftada, tüm grupların radyolojik kaynama skorları Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Yine 6. haftada, 4. haftadan farklı olarak, EGF grubunun radyolojik kaynaması HA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Radyolojik açıdan tüm gruplar 4. ve 6. haftalarda kendi aralarında incelendiklerinde, Kontrol grubu hariç diğer tüm gruplarda kaynama istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). (Grafik 4.7.)

Grafik 4.7. Radyolojik bulguların istatistiksel dağılımı.



Biyomekanik bulgular incelendiğinde; 4. haftada tüm grupların maksimum kuvvet ve katılık değerlerinin Kontralateral gruba göre anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Ancak Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, EGF ve HA gruplarında anlamlı farklılık gözlemlenmedi. Ek olarak, Kombine grup ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($p<0,05$). EGF grubu ile HA grubu arasında da anlamlı farklılık bulunmamasına karşın, Kombine grup ile EGF ve HA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ($p<0,05$).

6. haftada da tüm grupların maksimum kuvvet ve katılık değerlerinin Kontralateral gruba göre anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, maksimum kuvvet açısından EGF ve HA gruplarında anlamlı farklılık gözlemlense de ($p<0,05$) katılık açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Buna karşın, Kombine grup ile Kontrol grubu arasında hem maksimum kuvvet hem de katılık açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ($p<0,05$). EGF grubu ile HA grubu arasında da anlamlı farklılık bulunmazken, Kombine grup ile EGF ve HA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ($p<0,05$).

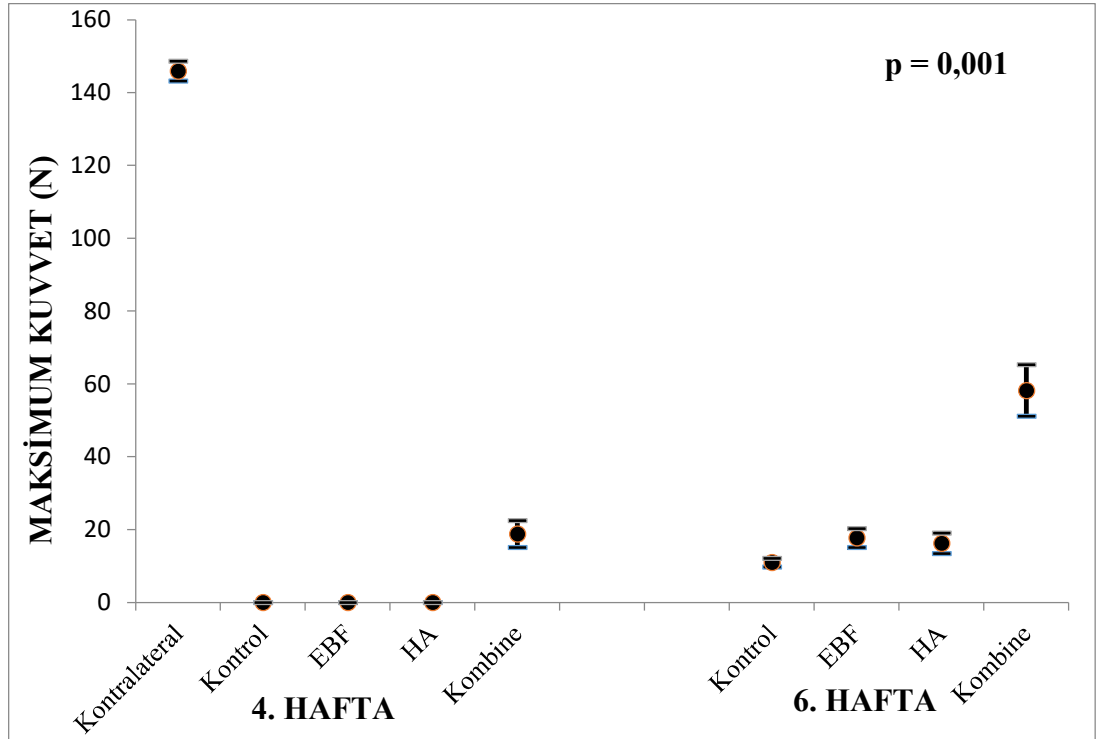
Tüm grupların kendi aralarında 4. ve 6. hafta sonuçları karşılaştırıldığında, Kontrol, EGF ve HA gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ($p < 0,05$). Ancak, Kombine grupta maksimum kuvvet açısından anlamlı farklılık gözlemlense de ($p < 0,05$), katılık açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. (Grafik 4.8., Grafik 4.9.)

Histolojik sonuçlar incelendiğinde, 4. haftada ışık mikroskopisinde Kontralateral grup ile Kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı. Ancak diğer tüm gruplar arasında anlamlı ilişki saptandı ($p < 0,05$).

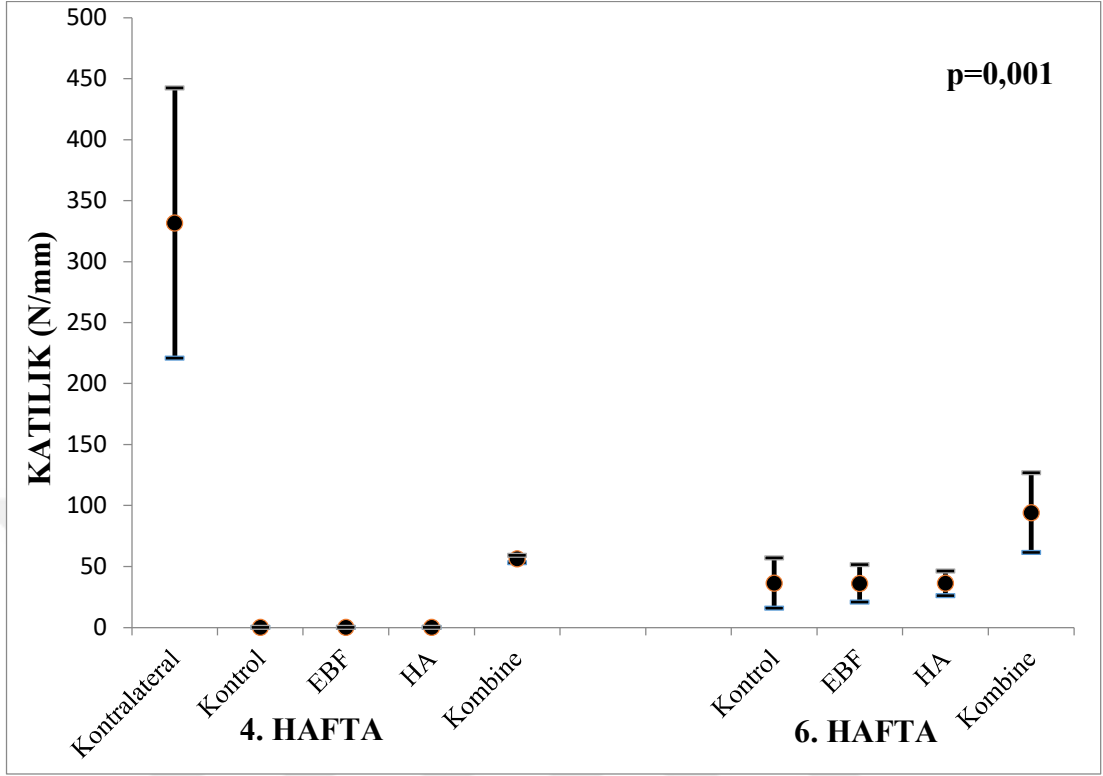
6. haftada ise tüm gruplar Kontralateral ve Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p < 0,05$). Ancak EGF grubu ile HA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, Kontrol grubu ile Kontralateral gruplarda anlamlı bir artış saptandı ($p < 0,05$). Ancak EGF ve HA gruplarında anlamlı bir artış saptanmadı. (Grafik 4.10.)

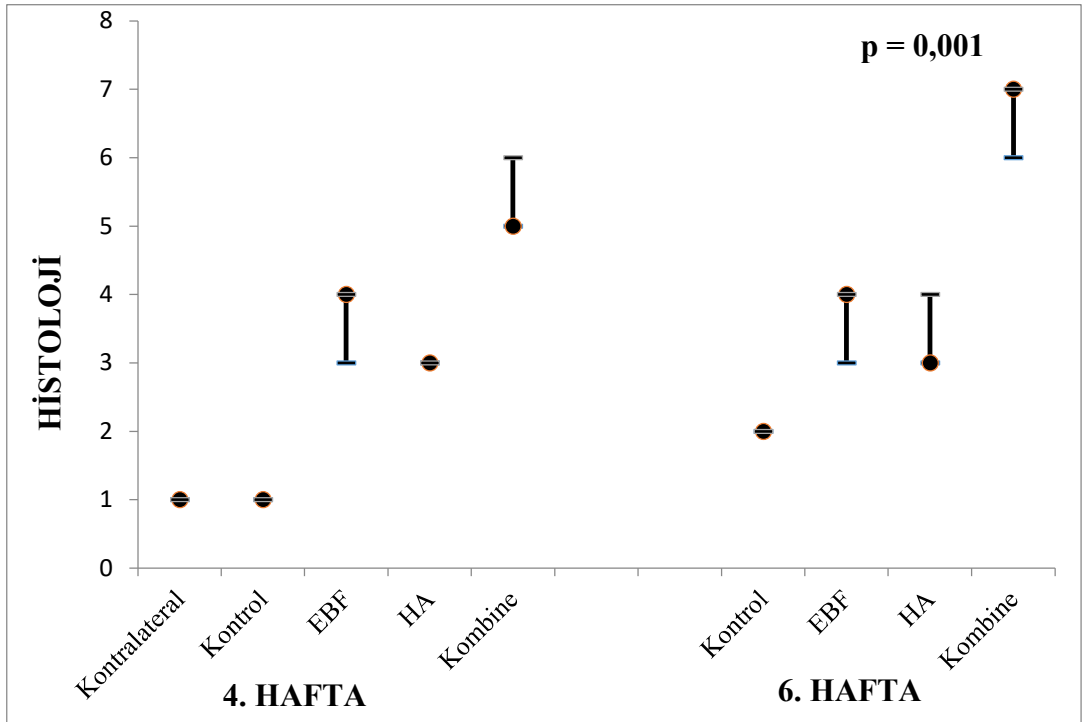
Grafik 4.8. Maksimum kuvvet bulgularının istatistiksel dağılımı.



Grafik 4.9. Katılık bulgularının istatistiksel dağılımı.



Grafik 4.10. Histolojik bulguların istatistiksel dağılımı.



5. TARTIŞMA

Kırık iyileşmesi, ayrıntıları halen tam olarak aydınlatılamamış, karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Bu mekanizmanın tam olarak aydınlatılması, tedavi sürecinin hızlandırılması açısından önemlidir. Bu nedenle son yıllarda kırık iyileşme sürecine potansiyel katkı sunabilecek çeşitli kimyasal, hormonal ve biyolojik ajanlar üzerine yapılan araştırmalar oldukça artmıştır. Güncel literatür göz önüne alınarak, söz konusu biyolojik süreci hızlandırmak amacı ile, Epidermal Büyüme Faktörü'nün ve Hyalüronik Asit'in potent ajanlar olarak kullanılabilirliğini araştıran deneysel çalışmamız gerçekleştirilmiştir.

Ortopedik çalışmalarda kırık iyileşmesini araştırmak için deneysel hayvan kullanımı, literatürde oldukça yaygındır. Tarihsel olarak, ilk kez Jackson ve arkadaşlarının 1970 yılında ratlarda pnömatik pres kullanarak oluşturdukları kapalı femur kırığı modeli gündeme gelmiştir [86]. 1984 yılında Bonnarens ve arkadaşlarının ratlarda, dizden retrograd intramedüller pin uygulaması sonrası giyotin ile kırık oluşturarak tanımladıkları yeni modellerinde; kırık hattının standart olmaması ve buna bağlı olarak kallus dokusunun standardize edilememesinin yanı sıra, derin doku enfeksiyonu ve ölüm gibi komplikasyonlara da sık rastlanmıştır [87,88]. Bu kısıtlılıklar ve komplikasyonlar göz önüne alındığında, çalışmamızda daha duyarlı karşılaştırma yapabilmek ve deneklerin perioperatif dönemde yaşamlarını sürdürebilmeleri sağlamak amacı ile bu yöntem yerine açık osteotomi modeli tercih edilmiştir.

Neagu ve arkadaşları ile Claes ve arkadaşlarının kullanmış oldukları açık femoral osteotomi modeli uygulanan çalışmamızda, daha standardize bir kırık hattı elde edilmiş, derin doku enfeksiyonu ve buna bağlı ölüm görülmemiştir [77, 78]. Bu komplikasyonların görülmemesinde; genel perioperatif asepsi – antisepsi kurallarına titizlikle uyulması, postoperatif dönemde laboratuvar kuralları gereğince denek kafeslerinin sık aralıklarla temizlenmesi ve günlük denek takibinin de etkileri görülmüştür. Ancak, literatürlerde karşılaşılan perioperatif kanama, hipovolemik şok ve buna bağlı ölüm gibi komplikasyonların da dikkate alınmasına rağmen, ilk 24 saatte

8 adet olmak üzere toplamda 10 denekte eksitus gözlenmiştir. Bu komplikasyonların görülmemesi için gelecek çalışmalarda ek önlem alınması önerilmektedir.

Travma sonrası oluşan kırık hematomunda, hem periferik kandan hem de intramedüller bölgeden göç eden inflamatuvar hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler ve etki eden büyüme faktörleri, inflamatuvar cevap oluşturarak, iyileşme sürecini başlatmaktadır. Bu sürecin hızlandırılması için olası etkili faktörler son yıllarda detaylıca araştırılmıştır [89]. Çalışmamızın ince noktası, son yıllarda popülerlik kazanan ve yapılan çalışmalarla önemi artan EGF ve HA'nın ekzojen olarak kırık hattına uygulanmasıdır.

Kırık iyileşmesinde görevli hücrelerin göçü, çoğalması, kemotaksisi, farklılaşması, inhibisyonu ve hücre dışı protein sentezi gibi moleküler kaskatlarının düzenlenmesinde çeşitli faktörler etki etmektedir [90]. Interlökin-1 ve 6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 ve 2, Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü, Fibroblast Büyüme Faktörü, Fibronektin, Matriks Metalloproteinaz gibi faktörlerin arttığı da histolojik olarak gösterilmiştir [91] Oluşan iyileşme dokusunun beslenmesi için gereken vaskülarizasyon ise FGF, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Anjiopietin 1 ve 2 tarafından sağlanmaktadır [92]. Etkileri bilinen bu faktörlerin dışında, çalışmamızda, kırık iyileşmesindeki olası rolleri halen tam olarak aydınlatılmamış olan EGF kullanılmıştır. Çalışmamızda, EGF'nin kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri makro düzeyde incelenmiş olup, moleküler kaskadlardaki rolü ortaya konulmamıştır. İleri çalışmalarda, bu faktörlerle de kombinasyon sağlanarak, mikro düzeyde de araştırılması amaçlanmaktadır.

FGF ailesinden özellikle FGF-2'nin kemik doku üzerine mitojen olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Sistemik olarak enjekte edilen FGF-2'nin ratlar üzerinde kemik oluşumunu artırdığı gösterilmiştir [94]. Kawaguchi ve arkadaşlarının ulnar osteotomi uygulanan primatlar üzerinde yaptıkları deneysel çalışmalarında, FGF-2 enjekte edilen deneklerde, kontrol grubuna kıyasla iyileşmenin histolojik, radyolojik ve biyomekaniksel (mukavemet, katılık) incelemelerde anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir [95]. Benzer incelemelerin uygulandığı çalışmamızda da, EGF'nin kırık kaynamasını artırdığı gösterilmiştir. Ancak literatürde EGF ve FGF'nin

gerek etki mekanizmalarını karşılaştıran, gerek ise kombinasyonlarının etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmalarda VEGF'nin oluşan kemik dokusunun vaskülarizasyonunda etkili olduğu ve hücre dışı matrikste bulunduğu gösterilmiştir. Street ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, VEGF'nin kırık hematomunda, plazmaya nazaran 15 kata kadar daha fazla olduğu bildirilmiştir [96]. VEGF üzerine yapılan 2 ayrı çalışmada, VEGF'nin nötrofil ve makrofaj kemotaksisini artırdığı ve kemik iliğindeki sinüzoidlerde geçirgenliği artırdığı gösterilmiştir [97, 98]. Ayrıca, VEGF, hem makrofaj sistemi üzerinden dolaylı olarak hem de doğrudan endotelial sistemi aktifleştirerek vaskülarizasyonu artırmaktadır. Ancak literatürde EGF'nin bu hücreler üzerindeki etkileri ile ilgili bir kanıt bulunamamıştır. Ek olarak, farelerde uygulanan femoral kırık modelinde, VEGF inhibisyonu sonucu, kırıkta dönüşümünün geciktiği ve yumuşak kallusun sert kallusa dönüşümünün bozulduğu gösterilmiştir [99]. VEGF'nin osteoklast farklılaşmasını desteklediği ve kemik rezorpsiyonunu artırdığı bildiren in-vivo ve in-vitro çalışmalar da mevcuttur [100, 101]. Kaigler ve arkadaşları tarafından yayınlanan deneysel bir çalışmada, VEGF emdirilmiş çatı kullanılan kemik defektlerinde, kırık bölgesinde yeni damar oluşumunun arttığı ve yeni kemik oluşumunun uyarıldığı histolojik olarak gösterilmiştir [102]. Benzer olarak çalışmamızda, EGF'nin çatı ile birlikte kullanılarak uzun salınımı sağlandığında, yeni kemik oluşumunu uyardığı gösterilmiştir. Ancak, anjiyogenez üzerindeki etkilerini gösterebilecek bir inceleme yapılamamıştır. Bu nedenle, gelecek çalışmalarda, hem EGF'nin kırık iyileşmesinde anjiyogenez üzerindeki etkilerinin, hem de VEGF ile kombinasyonunun sonuçlarının araştırılması planlanmaktadır.

Kırık iyileşmesinin erken safhasında trombositlerden salgılanan PDGF'nin de kırık hattında bulunduğu bilinmektedir. Yapılan in-vitro çalışmalarda, PDGF'nin osteoblastlar için mitojenik olduğu gösterilmiştir [103]. Nash ve arkadaşlarının tavşanlarda uyguladığı unilateral tibial osteotomi modelinde, PDGF emdirilmiş kollajen çatı uygulanan grupta iyileşmenin biyomekaniksel (mukavemet, katılık) ve histolojik incelemelerde anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir [104]. Benzer şekilde, EGF'nin kollajen çatı ile kombine olarak uygulandığında, kırık iyileşmesini biyomekanik, histolojik ve radyolojik ölçeklerde artırdığı çalışmamızda gösterilmiştir.

Bu nedenle, EGF ve PDGF'nin osteoblastlar üzerindeki etkilerinin korele olduğu dikkate alınmalıdır.

Büyüme hormonunun ve IGF ailesinin de iskelet sistemi gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Osteoporoz tedavisinde de kullanılmakta olan büyüme hormonunun, kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri de araştırılmaktadır. Kemikte etkili olan form IGF-2 olsa da, kırık iyileşmesinde IGF-1'in daha potent olduğu bildirilmiştir [108]. Bak ve arkadaşlarının, biyosentetik insan büyüme hormonunun ratlarda kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmalarında, kırık iyileşmesinin biyomekaniksel (mukavemet, katılık) olarak kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir [109]. Öte yandan, Carpenter ve arkadaşlarının tavşan tibial osteotomi modeli kullanarak yaptıkları çalışmalarında, intramusküler uygulanan IGF-1'in kaynama üzerinde biyomekaniksel olarak anlamlı etki oluşturmadığı bildirilmiştir [110]. Ancak, çalışmamızda, kırık hattına lokal EGF uygulamasının IGF-1'in aksine, kırık iyileşmesini biyomekanik olarak da artırdığı gösterilmiştir.

Polipeptid yapıda bir büyüme faktörü olan EGF ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibuler tükürük bezinden izole edilmiştir [111]. Ayrıca EGF, endojen olarak böbrek ve tiroid bezinde bol miktarda bulunmaktadır. [112]. EGF'nin etkileri hakkında güncel bilgilerin çoğu da, deneysel hayvan çalışmaları sonucunda elde edilmiştir. EGF-Reseptörü eksik farelerde cilt, akciğer, GİS kanalı epitelinde defekt, çoklu organ yetmezliği ve nörodejenerasyon geliştiği bildirilmiştir [113, 114] Ayrıca EGF-Reseptörü eksik farelerde, embriyonik gelişim ve organogenezde defekt olduğu ve çoklu organ yetmezliği nedeni ile in-utero eksitus bildirilmiştir [57]. Çalışmamızda, ekzojen EGF'nin kırık iyileşmesinde görülen potent etkisi nedeni ile, kırık iyileşmesinin çeşitli aşamalarında da EGF reseptörünün eksprese olduğu çıkarımına varmak mümkündür.

EGF'nin sinir sistemi üzerine olan etkileri de pek çok farklı çalışmada incelenmiştir. EGF santral sinir sisteminde kök hücre çoğalmasını, nöron farklılaşmasını sağlayan nörotrofik bir büyüme faktörüdür [115, 116]. Ratlarda travma sonrası hasarda EGF'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, EGF ile tedavi edilen deneklerde nöronal hücre kaybının azalması ile birlikte bilişsel fonksiyonlarda da

anamlı bir iyileşme olduğu gösterilmiştir [117, 118]. Sibia ve arkadaşları ile Nieto-Sampedro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, EGF'nin astrositlerin çoğalmasında ve farklılaşmasında etkili olduğu bildirilmiştir [114, 119]. Ayrıca EGF'nin oligodendrosit gelişiminde de önemli olduğu bildirilmiştir [120]. Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan güncel bir çalışmada, ratlarda akut omurilik yaralanması sonrası EGF uygulanmasının, kan-omurilik bariyer geçirgenliğinin bozulmasını önlediği ve lokomotor aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir [57]. Çalışmamızda EGF'nin osteoblast-osteoklast harmonizasyonu sonucu kırık iyileşmesinde görülen olumlu etkisinin, akut omurilik yaralanmaları sonrası bu çalışmada belirtilen lokomotor aktivite artışına paralellik gösterdiği düşünülmektedir. Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Spina Bifida modeli oluşturulmuş ratlarda EGF üretiminin azaldığı gösterilmiştir [121]. Kemik bütünlüğünün bozulduğu Spina Bifida patolojisinde görülen bu duruma paralel olarak, EGF'nin kemik hücreleri üzerinde harmonize bir etkisi olduğu görüşümüzü desteklemektedir.

Yapılan çalışmalarda EGF'nin hormon salınımında da etkisi olduğu gösterilmiştir. Ratlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, EGF'nin hipofiz kortikotrop [122], gonodotrop [123] ve laktotrop [122] proliferasyonunu artırdığı ve ayrıca ACTH [123], TSH [124] ve prolaktin [125] salgılanmasını arttırdığı gösterilmiştir. EGF'nin rat hipofizinden GH salgılanmasını da artırdığı bildirilmiştir [126]. EGF'nin hormonlar üzerindeki bu pozitif geri besleme etkisi de, endokrin sistem ile yakından ilişkili olan kırık iyileşmesi üzerine potent etkisini desteklemektedir.

EGF'nin; epitel, endotel, fibroblast, kondrosit ve düz kas hücrelerinde DNA sentezini uyararak bu hücrelerin çoğalmalarını uyardığı bildirilmiştir [111, 112]. EGF'nin ince bağırsak epitel hücrelerinin bazolateral membranlarını uyararak ve sodyum kanal üretimlerini artırarak sodyum emilimini artırdığı gösterilmiştir [127]. Saito ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, EGF reseptörü bloke edilmiş ratlarda, kondrositlerin olgunlaşmasında bozulma gözleendiği ve büyüme plaklarında defekt geliştiği bildirilmiştir [128]. Yasuda ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, TGF ile kombine EGF uygulamasının, ön çapraz bağ tendon-graft sağ kalımını artırdığı bildirilmiştir [129]. Yine benzer mekanizmalar ile, kırık alanında bulunan hücrelerde

bloke olmamış EGF reseptörlerinin ekzojen EGF ile uyarımının kırık iyileşmesine potent etki yapabileceği çalışmamızda gösterilmiştir.

Bildirilen bu etkilerinin üzerine, EGF, bazı hastalıkların tedavileri amacı ile çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. EGF'nin fibroblastlar üzerindeki etkisi ile granülasyon dokusunun oluşumunu artırarak ve yeni damar oluşumunu artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [130]. Atlarda yapılan deneysel bir çalışmada, korneaya lokal olarak uygulanan EGF'nin endotelial hücre çoğalmasını uyararak iyileştirmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir [131]. Diyabetik yara tedavisinde de rekombinant EGF preparatları lokal olarak uygulanmaktadır [132, 133]. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, EGF'nin yaşlı deri üzerinde rejenasyon sağladığı bildirilmiştir [134]. Sıklıkla lokal olarak kullanılan EGF'nin, sistemik dolaşıma geçmeden kırık iyileşmesi üzerine etkili olabileceği de çalışmamızda gösterilmiştir.

EGF'nin kemik dokusu üzerine etkileri de çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Yapılan in-vitro çalışmalarda, aktive edilmiş EGF reseptörlerinin büyüme plağındaki kondrositlerin çoğalmasını artırdığı gösterilmiştir [135, 136]. Ratlarda yapılan başka bir çalışmada, EGF-Reseptörü eksik deneklerde, hipertrofik kondrosit alanında anlamlı bir artış görülmüş ve EGF'nin kondrosit olgunlaşmasını engellediği gösterilmiştir [114]. Kıkırdak dokudaki etkisine paralel olarak, çalışmamızda kırık alanındaki hücrelerde EGF reseptörlerinin, ekzojen EGF ile uyarıldığında fibröz dokunun kıkırdak ve kemik dokuya dönüşümüne katkı sunarak kırık iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir.

EGF'nin kemik iliği mezenkimal hücrelerinde reseptörlerinin olduğu bildirilmiştir [137, 138]. Tamama ve arkadaşları tarafından, EGF'nin bu mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını engellemeden çoğalmasını artırdığı gösterilmiştir [64]. Karpedijeva ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, EGF'nin mezenkimal kök hücrelerin aktivitesini artırdığı gösterilmiştir [139]. Shoji ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, mezenkimal kök hücrelerden çok sayıda EGF salgılandığı bildirilmiştir [140]. Çalışmamızda, ekzojen EGF uygulamasının da mezenkimal kök hücrelerin çoğalmasını uyararak kırık iyileşmesini uyarabileceği çıkarımını yapmak mümkündür.

Bu nedenle, ek çalışmalar ile mezenkimal kök hücre sayısı ve aktivitesinin ölçümü önerilmektedir.

EGF'nin benzer bir etkisi osteoblastlarda da gösterilmiştir. Nakashima ve arkadaşları ile Chien ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, EGF'nin, osteoblast çoğalmasını uyararak ve farklılaşmasını inhibe ederek etkinliğini artırdığı gösterilmiştir [68]. Chan ve arkadaşları tarafından ratlar üzerinde yapılan başka bir deneysel çalışmada ise, artmış EGF salınımının osteoblast çoğalmasını uyardığı ve endosteum ve periosteumda osteoblast birikimini sağladığı gösterilmiştir [68]. Laflamme ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada, EGF ve BMP kombinasyonunun osteoblast çoğalmasını ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir [141]. Linder ve arkadaşları, EGF reseptör blokajı uygulanmış ratlarda, osteoblastik aktivitenin azaldığı kemikleşmenin bozulduğu gösterilmiştir [65]. Öte yandan, EGF'nin kemik yapısı ve fonksiyonunda herhangi bir değişiklik yaratmadığını bildirilen çalışmalar da mevcuttur [57, 142]. Bu özelliklerinden yola çıkılarak Basal ve arkadaşları tarafından ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, femur başı osteonekrozu tedavisinde EGF kullanılan grupta, femur başı küreselliğinin korunduğu gösterilmiştir [143]. Çalışmamızda EGF'nin kırık iyileşmesindeki potent etkisinin, osteoblast aktivitesinin senkronizasyonu ile gerçekleşebileceği varsayımı desteklenmektedir.

EGF'nin osteoklastlar üzerinde de etkisi olduğu bildirilmiştir. Ratlar üzerinde yapılan in-vitro çalışmalarda, EGF reseptörlerinin aktivasyonunun encondral ossifikasyon sırasında osteoklast sayısını ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir [70]. Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, EGF'nin osteoklastlar üzerindeki etkisini RANK sistemi ile yarışarak dolaylı olarak yaptığı gösterilmiştir [144]. Çalışmamızda, EGF uygulanan gruplarda gözlenen partiküler yapılar ve bunların histopatolojik incelemeleri sonucu artmış kemik döngüsü bulguları, EGF'nin kırık iyileşmesi sürecinde hem osteoblastik hem de osteoklastik aktivitenin senkronize artışına yol açarak kemik döngüsünü hızlandırdığı sonucunu desteklemektedir.

Endokrin sistem ele alınacak olduğunda, kemik doku üzerinde etkisi en çok araştırılan hormonlardan biri de PTH'dır. PTH, mineral hemostazının düzenlenmesinde etkili olan doğal yapıda bir hormondur ve osteoporoz tedavisinde

ilaç olarak kullanılmaktadır. PTH'nın çeşitli formları, kırık iyileşmesi üzerinde denenmiştir. Postmenapozal osteoporotik kırıklarda yapılan 2 ayrı çalışmada, PTH tedavisi uygulanan travmalı hastalarda, kırık iyileşmesinin hızlandığı radyolojik olarak gösterilmiştir [105, 106]. Alkhiary ve arkadaşlarının yaptığı deneysel bir çalışmada, ratlara uygulanan günlük subkutan 30 µg/kg dozunda PTH'nın kırık iyileşmesini biyomekanik olarak artırdığı gösterilmiştir [107]. Aynı çalışmada, PTH'nın bu etkisinin, osteoklast yoğunluğunu değiştirmeden, kırık iyileşmesinin yeniden şekillenme aşamasında, kemiğin sürdürülebilir anabolik etkisini artırarak yaptığı gösterilmiştir. EGF'nin PTH ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. Ahmed ve arkadaşları tarafından ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda, PTH tarafından uyarılan osteoblastlardan EGF salgılandığı gösterilmiştir [145]. Ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, PTH enjekte edilen ratlarda AREG hedef genlerinin aktifleştigi gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, EGF ailesinden olan AREG'in kalsitriol ve PgE2 tarafından da aktiflendiği ve AREG'in osteoblastlar üzerinde mitojen etkisinin olduğu ve trabeküler kemik oluşumunu artırdığı bildirilmiştir [74]. Yarram ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise, EGF ve kalsitriolün kombinasyonu sonucu osteoblast farklılaşması ve aktivasyonu ile hücre-dışı matriks üretiminde artış olduğu gösterilmiştir [58]. Bir büyüme faktörü olan EGF'nin hormonlar aracılığı ile salınımı sonrası parakrin olarak etki etmesi, çalışmamızda lokal uygulanım sonrası kemik döngüsünün arttığı bulgumuz ile paralellik göstermektedir.

Literatürde, EGF ile kırık iyileşmesi arasında kısıtlı miktarda çalışma mevcuttur. Bazı çalışmalarda EGF'nin kemik oluşumu üzerinde olumlu etkisi bildirilmiş olsa da [146], kemik rezorpsiyonunu artırdığını bildiren çalışmalar da mevcuttur [147]. Wang ve arkadaşları ile Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, EGF'nin iyileşmenin erken döneminde osteoblast sayısını artırarak iyileşmenin hızlandırıldığı gösterilmiştir. Ayrıca iyileşmenin geç döneminde, EGF'nin kemik farklılaşması ve mineralizasyonunda da etkili olabileceği gösterilmiştir. [148, 149]. Hernandez-Flores ve arkadaşları tarafından rat tibia defektlerinde uygulanan bir çalışmada, EGF ve askorbik asit kombinasyonunun kırık iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir [150]. Çalışmamızda EGF ve HA kombinasyonunun kırık iyileşmesini diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir. Ancak, EGF'nin HA

dışında çeşitli farklı maddeler ile kombinasyonunun da etkinliği çalışmalar ile desteklenmeli ve birbirlerine üstünlükleri kanıtı dayalı veriler ile ortaya konmalıdır.

Chim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, EGF'nin kemik yeniden şekillenmesinde parakrin bir mekanizma ile anjiogenezi de artırdığı gösterilmiştir [41]. Liuni ve arkadaşlarının femur kırıklı hastalarda yaptığı bir çalışmada ise, diyabetik hastalarda EGF seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [151]. Ancak çalışmamızda, ışık mikroskopisi veya SEM incelemelerinde EGF'nin anjiyogenezi artırdığına dair bir bulgu saptanamamıştır.

Çalışmamızda, 0,75 µgr tek doz lokal EGF kullanımının, kırık iyileşmesine olan katkısı çeşitli parametreler ile gösterilmiştir. 4. hafta incelemelerimizde, EGF kullanılan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, kırık iyileşmesinde radyolojik (p=0,028) ve histolojik (p=0,009) incelemelerde istatistiksel anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır. Ancak, oluşan kallus dokusu biyomekaniksel sonuç elde edebilecek düzeye gelememiş, bu nedenle istatistiksel olarak kontrol grubu ile anlamlı bir karşılaştırma yapılamamıştır. Işık mikroskopisi incelemelerimizde, kontrol grubunda fibröz doku hakimiyeti görülmekte iken, EGF kullanımında, çoğunlukla kıkırdak dokunun fibröz dokunun yerini aldığı görülmüştür. Biyomekaniksel olarak anlamlı bir kaynama oluşmamış olsa da SEM incelemelerimizde, kontrol grubundan farklı olarak, kırık uçlarında trabeküler kemik oluşumunun başladığı gözlemlenmiştir. Radyolojik incelemelerimizde ise, kontrol grubundan farklı olarak düşük miktarda kıkırdak doku oluşumu gözlemlendiği için, nicelik olarak az bir farklılık olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

6. hafta incelemelerimizde ise, EGF kullanımının kırık iyileşmesinde radyolojik, biyomekaniksel ve histolojik incelemelerde istatistiksel anlamlı farklılık oluşturduğu görülmüştür. Hem EGF hem de kontrol grubunda biyomekanik olarak ölçülebilir bir iyileşme saptanmıştır. Oluşan kallus dokusunun mukavemeti, EGF grubunda anlamlı olarak yüksektir (p=0,014) ancak katılık kontrol grubundan farklı değildir (p=1,000). Bu durum, oluşan kallus dokusunun kontrol grubuna göre daha güçlü olduğunu ancak yakın fibröz doku- kıkırdak doku içeriği nedeni ile aynı oranda da esnek olduğunu göstermektedir. Işık mikroskopisi incelemelerimizde, fibröz dokuya kıyasla kıkırdak doku hakimiyeti gözlemlenmiştir. SEM incelemelerimizde ise,

kırık uçlarında trabeküler kemik doku oluşumunun zenginleştiği gözlenmiştir. 4 ve 6. haftalar arasında radyolojik ($p=0,008$) ve biyomekaniksel ($p=0,005$) anlamlı artış görülmüş olsa da EGF kullanımında histolojik olarak görülen artışta istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,513$). Radyolojik incelemelerimizde ise, kontrol grubundan farklı olarak daha yoğun kırıkta doku oluşumu gözlenmesinden dolayı istatistiksel olarak da anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p=0,008$). Güncel literatürde, mevcut verilerimizi karşılaştıracak herhangi bir çalışma bulunamamıştır.

Son yıllarda, EGF'nin tümör patogenezi üzerine olan etkileri de araştırılmıştır. Çeşitli meme, akciğer, prostat ile kemik ve yumuşak doku tümörlerinde, EGF'nin etkinliğini gösteren çalışmalar yayınlanmıştır. Willeumier ve arkadaşları, küçük hücre dışı akciğer kanserlerine bağlı patolojik kırıklarda, EGFR reseptör varlığının daha iyi prognoz sağladığı gösterilmiştir [152]. Soultzis ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yayınlanan bir çalışmada, EGF'nin tümöral prostat hücrelerinden salgılandığı ve kemik metastazlarında osteoblast salınımına yol açtığı gösterilmiştir [153]. EGF reseptör inhibisyonu uygulanan ratlarda prostat kanseri metastazlarını engellediği de gösterilmiştir [154, 155]. Yine EGFR inhibisyonu yapılan böbrek karsinomlarında da kemik metastazlarının engellendiği de gösterilmiştir [156]. EGF'nin osteosarkomla ilişkisi de çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Messerschmitt ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, EGFR reseptörü inhibe edilmiş osteosarkom hücrelerinde göç, invazyon ve koloni oluşumunun azaldığı gösterilmiştir [157]. Başka bir çalışmada, EGF reseptörü aktive edilmiş ratlarda osteosarkom gelişiminin hızlandığı gösterilmiştir [65]. Wen ve arkadaşlarının osteosarkom hastalarının patolojik örnekleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, primer tümörlerin %38'inde, rekürren tümörlerin %90'unda artmış EGF reseptör ekspresyonu tespit edilmiştir [158]. Luo ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise EGF ile osteosarkom arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır [69]. EGF ile dev hücreli kemik tümörü arasında da ilişki olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur. EGF ile tümör yükü arasındaki ilişkiden yola çıkarak, yazarlar, EGF'nin osteoklastik aktiviteyi artırdığını ancak osteolizis ile anlamlı ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir [73]. Ayrıca, bir EGF reseptör tirozin kinaz inhibitörü olan Gefitinib, RANK-Ligand inhibisyonu yaparak osteoklast farklılaşmasını inhibe etmektedir. Bu özelliğinden dolayı, kemik metastazlarında da kullanılmaktadır [159].

Çalışmamızda, EGF kullanılan grupların 3 boyutlu tomografik görüntülemelerinde distal femur metafizinde kist oluşumları saptanmıştır. Sakrifikasyon işlemleri sonrası makroskopik incelemelerimizde de, kemik dokuda zengin partiküler yapılanma gözlenmiştir. Partiküler yapının mikroskopik incelemesinde ise, herhangi bir malignite bulgusuna rastlanmamıştır. Bu durumun etyopatogenezi aydınlatılamamış olup, sıvı olarak uygulanan EGF'nin tüm kemiğe yayılması ve kırıktan etkilenmemiş alanları da etkileyerek kemik döngüsünü artırabileceği düşünülmüştür. Söz konusu kistlerin, EGF grubunda gözlenip HA grubunda gözlenmemesi bu durumun ekzojen EGF uygulamasının kemik doku üzerindeki yan etkisi olduğunu düşündürmektedir.

D-Glukuronik Asit ile N-Asetil-D-Glukozamin birleşiminden oluşan HA, hücre dışı matriksin ana komponentlerinden birisidir. Esas olarak fibroblastlar ve kondrositler tarafından sentezlenen HA, hücre çoğalmasında, doku tamirinde, hücre göçünde ve bazı malign tümörlerin progresyonunda rol oynamaktadır [43]. HA'nın esas etkileri yara iyileşmesinde inflamasyonu sınırlandırmak, hücre çoğalması ve epitelizasyonu desteklemektir [160]. Günümüzde, HA bu özelliklerinden dolayı dermatoloji, romatoloji ve ortopedi alanlarında kullanılmaktadır. Rekürrent aftöz ülserleri ve oral mukozit tedavisinde HA'nın jel formu, bariyer fonksiyonu ve anti-inflamatuvar etkileri nedeni ile çeşitli araştırmacılar tarafından denenmiş ve başarılı etkileri bildirilmiştir [161]. HA, eklem sıvısının etkilendiği osteoartrit tedavisinde hastalık modifiye edici ajan olarak da günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır [162]. HA içeren enjeksiyonlar, sinovyal sıvının biyokimyasal özelliklerini artırmakta ve klinik olarak ağrı kesici etki sunmaktadır. Eklem sıvısına uygulanmasının ardından, HA, hücre içi çeşitli sinyal yollarını aktifleştirerek hücre göçünü ve çoğalmasını uyarmaktadır [163]. Ayrıca, CD-44 yolu ile aktiflenmiş makrofaj sistemini baskılayarak eklem içinde anti-inflamatuvar etki yaratmaktadır [164]. Doral ve arkadaşlarının talar osteokondral lezyonlar üzerine yaptıkları bir çalışmada, artroskopik mikrokirik uygulamasının ardından eklem içi HA enjeksiyonun, uygulanmayan gruba karşılaştırıldığında daha iyi klinik sonuç verdiği gösterilmiştir [165]. Heybeli ve arkadaşlarının diz osteoartrit tedavisinde yaptıkları başka bir çalışmada ise, cerrahi sonrası 3 doz HA eklem içi enjeksiyon uygulamasının, daha iyi klinik sonuç yarattığı bildirilmiştir [166]. Bu etkilere ve yapılan klinik çalışmalara

paralel olarak, çalışmamızda HA'nın kırık iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir. Ancak çalışmamızda, bu etkisini gösteren moleküler mekanizmalar ortaya konamamıştır.

Artan teknolojik gelişmeler ile birlikte, HA içeren çeşitli çatılar kemik-eklem hastalıklarının tedavisinde güncel kullanıma girmiştir. Çeşitli çalışmalarda, osteoartrit patogeneğinde gözlenen eklem kıkırdak harabiyetinde, HA kullanımının yaşam kalitesini artırdığı bildirilmiştir [167]. Yücekul ve arkadaşlarının koyun diz eklemine uyguladıkları deneysel çalışmalarında, HA içeren çatının, kontrol ve HA içermeyen gruplara göre osteokondral lezyonların tedavisinde etkili oldukları artroskopik, radyolojik ve histolojik olarak gösterilmiştir [168]. Gobbi ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise, mikrokırık uygulanan tam kat osteokondral lezyonlarda HA uygulanmasının, eklem kıkırdak rejenerasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir [169]. HA'nın bu etkisini kondro-indüktif ve kondro-proliferatif etki mekanizmaları ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir [170]. Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızın histolojik incelemelerinde HA'nın; gerek indüktif, gerek proliferatif etki göstererek kırık iyileşmesinde de etkili olduğu gösterilmiştir.

HA; kalsitonin ve BMP gibi osteojenik maddelerle birlikte kemik indüksiyon özelliklerini paylaşır. Çeşitli çalışmalarla fibrinojen, fibrin, fibronektin ve kollajen gibi kemik iyileşmesi için önemli olan proteinlerin HA'ya bağlandıkları gösterilmiştir [171]. HA'nın bu etkilerini gösterebilmesi için çatı oluşturacak bir yapı ile birlikte kullanılması önerilmektedir. Ateşok ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, çatı kullanımının bağ, tendon ve kıkırdak dokuda onarımı artırdığı gösterilmiştir [172]. Oakes ve Maus tarafından yapılan çalışmalarda, sadece HA kullanımının, çatı ile birlikte kullanımına nazaran kırık iyileşmesine daha az katkıda bulunduğunu bildirilmiştir [45]. HA bazlı hidrojeller ile yapılan çalışmalarda, MMP duyarlı HA'nın yeni kemik oluşumunda daha etkili olduğu in vivo olarak gösterilmiştir. HA bazlı jellerin BMP ile etkileşerek kemik oluşumunda etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur [46]. Aynı yazarlar tarafından, bu biyoaktif ürünlerin, HA salınımının süresini artırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, HA sadece çatı ile birlikte kullanıldığı için, izole etkisi hakkında herhangi bir çıkarım oluşturmak mümkün olmamaktadır. Buna karşın, EGF'nin çatı molekülüne emdirilmesi ile birlikte, hem EGF'nin hem de

HA'nın uzun salınımı sağlanarak kırık iyileşmesini artırdığı sonucuna varmak mümkündür.

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda HA'nın bakteriyostatik özelliklerinden de bahsedilmiştir [53]. Antibiyotik emdirilmiş HA içeren çatıların, enfekte kırık hattında iyileşme sağladığı bildirilmiştir. Peng ve arkadaşları ile Arens ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, antibiyotik emdirilmiş HA'nın açık kırıklarda profilaktik olarak kullanılabilceği ve kırık iyileşmesinin hızlandırılabilceği gösterilmiştir [52]. Terboo ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, *Staphylococcus Aureus* inoküle edilmiş tavşan tibia kırık modelinde, Gentamisin eklenmiş HA içeren hidrojelin enfeksiyonu engellediği ve kırık iyileşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir [52]. Herhangi bir antibiyotik profleksisi uygulanmamış olan deneysel çalışmamızda herhangi bir enfeksiyon bulgusunun görülmemesi de, HA'nın antibakteriyel özelliğini desteklemektedir.

HA içeren çatıların, periostal greft olarak kırık iyileşmesinde kullanımını da gösteren çalışmalarda, bu yapıların, doku iyileşmesi için sınırlı bir ortam sağladığı histolojik olarak gösterilmiştir [173]. Histolojik değerlendirmeler aynı zamanda ağ örgülü greftlerin canlı konak hücrelerle sürekli olarak defekt alanını yeniden doldurduğuna ve defekt alanlarını fibröz doku penetrasyonundan koruduğuna, bu şekilde yeni bir fonksiyonel kemik iliği ortamının yeniden kazanılmasına olanak sağladığına işaret etmektedir [53]. Çalışmamızda, travma cerrahisinde kullanılan ağ örgülü Hyalonekt® (Anika Therapeutics, İtalya) yerine eklem cerrahisinde tercih edilen ve süngerimsi yapıda olan Hyalofast® kullanımının da kırık iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir.

HA içeren çatıların hücre dışı matriks oluşumu, anjiogenez ve osteojenez oluşumunda etkili olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [174, 175]. Rhodes ve arkadaşları tarafından, bu moleküllerin doğal tamir mekanizmasını etkilemeden periosteum gibi hasarlanmış bağ dokuyu onarabildiği gösterilmiştir. Aynı yazarlar tarafından, HA liflerinin makrofaj kaynaklı çözümleri sırasında ortaya çıkan HA oligosakkaritlerinin etkili kemotaktik ve anjiyojenik potansiyelleri de olduğu gösterilmiştir [54]. Yapılan sintigrafik çalışmalarda ise, osteoblastik aktivitede yaklaşık %10 oranında bir artış gösterilmiştir [176]. Picke ve arkadaşlarının yaptığı

başka bir çalışmada ise, sülfür emdirilmiş HA çatılarının, diyabetik ratlarda, osteoblastik aktiviteyi artırıp osteoklastik aktiviteyi azaltarak kırık iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir [177]. Çalışmamızda, HA çatısının osteojenik etkisi histolojik olarak gösterilmiş olup, anjiogenik etkisini gösteren herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda HA içeren hücreden arındırılmış çatı kullanıldığında da, kırık iyileşmesinin arttığı çeşitli parametreler ile gösterilmiştir. 4. haftada kontrol grubuna göre radyolojik ($p=0,024$) ve histolojik ($p=0,005$) olarak anlamlı iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Ancak tek doz uygulanan EGF'de olduğu gibi, HA'nın da biyomekaniksel düzeyde sonuç verebilecek bir kaynama dokusu yaratamadığı gözlenmiştir. Işık mikroskopisinde, fibröz dokunun yerini kıkırdak dokunun almaya başladığı ancak EGF grubuna kıyasla kıkırdak doku hakimiyetinin oluşmadığı gözlemlenmiştir. SEM incelemelerimizde ise, kırık uçlarında yaygın fibröz doku hakimiyeti geliştiği görülmüştür ancak EGF grubundaki gibi bir kemik doku oluşumu saptanmamıştır. Radyolojik incelemelerimizde HA kullanılan grupta, EGF kullanımına benzer şekilde, kontrol grubu ile nicelik olarak az bir farklılık olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmektedir. Ancak, EGF ile karşılaştırıldığında, EGF'den daha düşük oranda kıkırdak oluşumu gözlendiği için, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

HA'nın 6. haftadaki etkileri de EGF ile benzerlik göstermektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, HA'nın kırık iyileşmesini radyolojik ($p=0,044$), biyomekaniksel ve histolojik ($p=0,009$) olarak artırdığı gösterilmiştir. Oluşan kallus dokusunun mukavemeti anlamlı olarak yüksek olsa da ($p=0,014$); katılığı, EGF grubunda da olduğu gibi, anlamlı bir farklılık yaratacak düzeye erişememiştir ($p=0,806$). Bu durum, oluşan kallus dokusunun EGF ile benzer yapıda olduğu sonucunu göstermektedir. Işık mikroskopisinde ise fibröz dokunun yerini kıkırdak dokunun almaya başladığı gözlenmiş olsa da EGF grubuna kıyasla daha az kıkırdak doku hakimiyeti gözlenmiştir. SEM incelemelerinde ise, kırık uçlarında yaygın fibröz doku hakimiyetine rağmen, EGF grubuna kıyasla daha az miktarda yeni trabeküler kemik doku oluşumu gözlenmiştir. 4. ve 6. haftalar arasında ise radyolojik ($p=0,006$) ve biyomekaniksel ($p=0,005$) anlamda iyileşme gözlenirken, histolojik skorların artmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ortaya çıkmamıştır ($p=0,134$).

Radyolojik incelemelerde, kontrol grubundan farklı olarak kırık doku oluşumu gözlemlendiği için, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmektedir. Ek olarak, kırık doku oluşumu, EGF kadar yoğun olmadığı için, radyolojik iyileşmede EGF grubu ile anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,033$). Literatürde, mevcut verilerimizi karşılaştıracak herhangi bir çalışma bulunmamıştır.

Güncel literatürde, EGF ve HA'nın hücreden arındırılmış çatı ile kombinasyonun kırık iyileşmesi üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma mevcut değildir. Ancak, Su ve arkadaşları tarafından 2014 yılında tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, EGF ve HA kombinasyonu yara iyileşmesi üzerinde deneysel olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, EGF ve HA kombine olarak kullanıldığında, EGF konsantrasyonunun, HA kullanılmayan grupla karşılaştırıldığında çatı üzerinde daha fazla konsantrasyonda kaldığı ve dokuya daha fazla salındığı ELISA yöntemi ile gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, yara iyileşmesinde EGF ve HA kombinasyonunun, yalnız HA ve yalnız EGF kullanılan gruplara göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada HA ile EGF ayrı ayrı karşılaştırılmamıştır [62]. Kondo ve arkadaşlarının 2012 yılında ratlarda diyabetik yara iyileşmesi üzerine yaptıkları bir deneysel çalışmada ise, EGF ve HA'in kombine kullanımında, yara dudakları arasında yeniden epitelizasyonun anlamlı olarak arttığı ancak yara iyileşmesi açısından kombine kullanımın, HA kullanımına göre anlamlı olarak farklılık yaratmadığı gösterilmiştir [178].

Çalışmamızda, EGF ve HA'nın kombine olarak hücreden arındırılmış bir çatı üzerinde kullanımının; tüm gruplara kıyasla, radyolojik ($p<0,05$), biyomekaniksel ($p<0,05$) ve histolojik ($p<0,05$) olarak anlamlı bir iyileşme oluşturulduğu gösterilmiştir. 4 ve 6. haftada, oluşan kallus dokusunun biyomekaniksel mukavemeti ve katılığının tüm gruplardan istatistiksel olarak yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak yine de, 6. hafta biyomekaniksel sonuçlarının, kırık işlemine maruz kalmamış kemikten anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır ($p=0,014$). Işık mikroskopik incelemelerimizde, 4. haftada tümüyle kırık doku hakimiyeti gözlenirken, diğer gruplardan farklı olarak 6. haftada olgunlaşmamış kemik doku oluşumu göze çarpmaktadır. SEM incelemelerimizde ise, 4. haftada kırık uçlarında oluşmuş yeni kemik doku belirgin olarak gözlenirken 6. haftada ise zengin trabeküler kemik doku hakimiyetinin yanı sıra, oluşan yeni kemik dokunun tüm alanı kapladığı

görülmektedir. Bu durum, radyolojik iyileşmeye de yansımış olup, kallus dokusunun direkt radyografilerde daha net görülebildiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, kombine grupta, çatı molekülüne emdirilmiş EGF ve HA'nın hem uzun salımlarının sağlanması, hem de sinerjistik etki göstermesi sonucu kırık iyileşmesini olumlu etkileyebileceği çıkarımına varmak mümkündür.

Kombine grupta, EGF grubunda olduğu gibi, distal femur metafizyel kistler görülmektedir. Makroskobik incelemelerde, saptanan partiküler yapının, EGF grubundan daha fazla olmasının yanı sıra, radyolojik incelemelerde de, mevcut kist yapılarının EGF grubuna göre daha fazla sayıda ve daha büyük ebatta olduğu saptanmıştır. Bu durum, kırık iyileşmesinde EGF kullanımının metafizyel kist oluşumuna neden olabileceğini göstermekte ve EGF'nin olası yan etki profili açısından ileri incelemesini gerektirmektedir.

Çalışmamızdaki kısıtlılıklar; takip süresinin görece kısalığı, hassas bir radyolojik inceleme uygulanamaması ve mikro BT çalışılmaması olmuştur. Takip süresi uzatıldığında, EGF ve HA'nın uzun dönem etkileri de gözlenerek daha detaylı çıkarımlar yapmak mümkün olabilir. Daha duyarlı bir direkt görüntüleme cihazı ile kallus dokusu daha net gözlenebilir ve daha net ölçümler elde edilebilir. Mikro BT ile biyomekaniksel çalışmalar birleştirilerek kallus alan çapı ölçülebilmesinin yanı sıra, kist boyutlarının da ölçümü daha hassas olarak çalışılabilineceği düşünülmektedir. Ek olarak, kist oluşumunun beklenmedik bir bulgu olmasından dolayı, bundan sonra yapacağımız deneysel çalışmalarımızda kist oluşumunun detaylı incelemesinin yapılması planlanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Kırık iyileşmesinin travma cerrahisindeki önemi her geçen gün artmaktadır.
2. Artan teknolojik gelişmelerin ışığında, kırık iyileşmesini etkileyen moleküller her geçen gün netlik kazanmaktadır.
3. Kırık hattına tek doz lokal 0,75 µg EGF uygulamasının 4. haftada kırık iyileşmesi üzerine etkileri:
 - a. Radyolojik Lane-Sandhu sınıflamasına göre, kırık hattının %25'inden az oranda kallus dokusu görülmektedir ancak kontrol grubuna göre anlamlıdır.
 - b. Biyomekaniksel olarak ölçüm yapılabilecek bir kaynama dokusu gelişmemiştir.
 - c. Işık mikroskopisi incelemelerinde Huo sınıflamasına göre kırık hattında kırık dokusu hakimiyeti saptanmıştır ve kontrol grubuna göre anlamlıdır.
 - d. SEM incelemelerinde kırık uçlarında trabeküler kemik doku oluşumları gözlenmektedir.
4. Kırık hattına tek doz lokal 0,75 µg EGF uygulamasının 6. haftada kırık iyileşmesi üzerine etkileri:
 - a. Radyolojik Lane-Sandhu sınıflamasına göre, kırık hattının %50'si oranında kallus dokusu görülmektedir ve kontrol grubuna göre anlamlıdır.
 - b. Biyomekaniksel olarak oluşan kallus dokusunun mukavemeti kontrol dokusuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ancak katılığı kontrol dokusu ile benzerlik göstermektedir.
 - c. Işık mikroskopisi incelemelerinde Huo sınıflamasına göre kırık hattında daha yüksek oranda kırık dokusu hakimiyeti saptanmıştır ve kontrol grubuna göre anlamlıdır.
 - d. SEM incelemelerinde kırık uçlarında oluşmuş yeni kemik doku gözlenmektedir.

5. Kırık hattına HA içeren çatı uygulamasının 4. haftada kırık iyileşmesi üzerine etkileri:
 - a. Radyolojik Lane-Sandhu sınıflamasına göre, kırık hattının %25'inden az kallus dokusu görülmektedir. Kontrol grubuna göre anlamlı olsa da EGF kullanımına göre anlamlı bir farklılık mevcut değildir.
 - b. Biyomekaniksel olarak ölçüm yapılabilecek bir kaynama dokusu gelişmemiştir.
 - c. Işık mikroskopisi incelemelerinde Huo sınıflamasına göre kırık hattında eşit miktarda fibröz doku ve kırık dokusu saptanmıştır ve kontrol grubuna göre anlamlıdır.
 - d. SEM incelemelerinde kırık uçlarında bağ dokusu lifleri ve fibröz doku gözlenmektedir.
6. Kırık hattına HA içeren çatı uygulamasının 6. haftada kırık iyileşmesi üzerine etkileri:
 - a. Radyolojik Lane-Sandhu sınıflamasına göre, kırık hattının %25'i kadar kallus dokusu görülmektedir. EGF kullanımından daha düşüktür ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur.
 - b. Biyomekaniksel olarak oluşan kallus dokusunun mukavemeti kontrol dokusuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ancak katılığı kontrol dokusu ile benzerlik göstermektedir. EGF ile hem mukavemet hem de katılık derecesinde benzerlik göstermektedir.
 - c. Işık mikroskopisi incelemelerinde Huo sınıflamasına göre kırık hattında daha az miktarda kırık dokusu hakimiyeti saptanmıştır ve kontrol grubuna göre anlamlıdır.
 - d. SEM incelemelerinde kırık uçlarında yaygın fibröz doku ve yer yer yeni kemik dokusu gözlenmektedir.
7. Kırık hattına EGF kombine edilmiş HA içeren çatı uygulamasının 4. haftada kırık iyileşmesi üzerine etkileri:
 - a. Radyolojik Lane-Sandhu sınıflamasına göre, kırık hattının %25'i ile %50'si arasındaki bir oranda kallus dokusu görülmektedir. Her üç gruba kıyasla anlamlı olarak yüksektir.

- b. Biyomekaniksel olarak oluşan kallus dokusunun hem mukavemeti hem de katılığı her 3 gruba kıyasla anlamlı olarak artmıştır.
 - c. Işık mikroskopisi incelemelerinde Huo sınıflamasına göre kırık hattında tamamen kıkırdak doku saptanmıştır ve her üç gruba göre anlamlıdır.
 - d. SEM incelemelerinde kırık uçlarında oluşmuş yeni kemik doku gözlenmiş ve kırık uçlarının kapanmaya yakın olduğu tespit edilmiştir.
8. Kırık hattına EGF kombine edilmiş HA içeren çatı uygulamasının 6. haftada kırık iyileşmesi üzerine etkileri:
 - a. Radyolojik Lane-Sandhu sınıflamasına göre, kırık hattının %50'si kadar kallus dokusu görülmektedir. Her üç gruba kıyasla anlamlı olarak yüksektir.
 - b. Biyomekaniksel olarak oluşan kallus dokusunun hem mukavemeti hem de katılığı her 3 gruba kıyasla anlamlı olarak artmıştır ancak kırık işlemine maruz kalmamış kemik ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşüktür.
 - c. Işık mikroskopisi incelemelerinde Huo sınıflamasına göre kırık hattında eşit miktarda kıkırdak doku ve yeni oluşan kemik doku saptanmıştır ve her 3 gruba kıyasla anlamlı olarak yüksektir.
 - d. SEM incelemelerinde kırık uçlarında zengin trabeküler kemik ve yeni kemik dokunun oluşumu görülmüştür.
9. EGF uygulanan femurların distal metafizyel bölgelerinde her iki dönemde de kist oluşumu gözlenmiştir.
10. EGF ve HA kombinasyonu uygulanan femurların distal metafizyel bölgelerinde her iki dönemde de kist oluşumu gözlenmiştir ve yalnız EGF uygulanan gruba göre daha fazla sayıda ve daha büyük ebatlarda olduğu saptanmıştır.
11. Yalnız EGF uygulanan ve EGF-HA kombinasyonu uygulanan grupların, gross incelemeleri sonucunda partiküler yapı gözlenmiştir. Bu yapının histopatolojik incelemelerinde normal kemik dokusu içerdiği görülmüş ve malignite bulgusuna rastlanmamıştır. İleri çalışmalarda ekzojen EGF kullanımı ile metafizyel kist oluşumu arasındaki ilişkinin araştırılması önerilmektedir.

7. KAYNAKÇA

1. **DE BOER H. H., VAN DER MERWE A. E.** Diagnostic Dry Bone Histology in Human Paleopathology. *Clinical Anatomy* 00:00-00 (2016).
2. **ROSS M. H., PAWLINA W.** Kemik. In: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Çeviri Editörü: Barış BAYKAL. *Palme Yayıncılık* Ankara 218-254 (2014).
3. **MESCHER, A. L.** Bone In: Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 14th Edition. *Lange* 138-161 (2016)
4. **FLORENCIO-SILVA R., SILVA SASSO G. R.** Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Research International* ID: 421746 (2015).
5. **TANRIKULU S., GÖNEN E.** Kırık İyileşmesi. *TOTBİD Dergisi*. 16:455-475 (2017)
6. **HALL E. J.** Kemik In. Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. 13. Baskı. Çeviri Editörü: Berrak Ç. YEĞEN. *Güneş Tıp Kitapevi*. 1001-1016 (2017)
7. **HADJIDAKIS D. J., ANDROULAKIS I. I.** Bone Remodeling. *New York Academy of Sciences*. 1092: 385-396 (2006).
8. **XIAN C. J.** Roles of Epidermal Growth Factor Family in the Regulation of Postnatal Somatic Growth. *Endocrine Reviews* 28(3):284-296 (2007).
9. **ALPARSLAN B.** Osteoporoz. *TOTEK Ortopedi ve Travmatoloji Temel Bilimler ve Araştırma Kitabı 2. Baskı* Modül 4 (2016).
10. **AUGUSTIN G., ANTABAK A.** The Periosteum Part 1: Anatomy, Histology and Molecular Biology. *Injury, International Journal of Care Injured*. 38, 1115-1130 (2007)
11. **LIN Z., FATEH A.** Periosteum: Biology and Applications in Craniofacial Bone Regeneration. *Journal of Dental Research* 93(2): 109-116. (2014).
12. **MILLER M. D., THOMPSON S. R.** Miller's Review of Orthopaedics Seventh Edition. Chapter 1 Basic Sciences. *Elsevier* (2016).
13. **INSAL B. PİŞKİN İ.** Kemik Dokunun Fizyolojisi *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 28(1): 28-32 (2017).
14. **BAYLISS L, MAHONEY D. J.** Normal Bone Physiology, Remodeling and Its Hormonal Regulation. *Surgery*. 30(2), 47-53. (2012).
15. **BOYCE B. F., XING L.** Functions of RANKL/RANK/ OPG in Bone Modeling and Remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 473.139-146 (2008).
16. **WATTS N. B.** Clinical Utility of Biochemical Markers of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry*. 45(8). 1359-1368. (1999).
17. **RAISZ L. G.** Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry*. 45(8). 1353-1358 (1999).
18. **HENRIKSEN K, NEUTZSKY-WULFF A. A. V.** Local Communication on and within Bone Controls Bone Remodeling. *Bone*. 44. 1026-33 (2009).
19. **POWELL W. F., BARRY K. J.** Targeted Ablation of the PTH/PTHrP Receptor in Osteocytes Impairs Bone Structure and Homeostatic Calcemic Responses. *Journal of Endocrinology*. 209:21-32 (2011)
20. **TRIPPEL S. B.** Growth Factors as Therapeutic Agents. *Instructional Course Lectures*. 46:473-6 (1997).

21. **LACEY D. L., TIMMS E.** Osteoprotegerin Ligand is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*. 93:165–176 (1998).
22. **UDAGAWA N., TAKAHASHI N.** Osteoprotegerin Produced by Osteoblasts is an Important Regulator in Osteoclast Development and Function. *Endocrinology* 141(9): 3478-84 (2000)
23. **ALTURFAN A. K.** Ortopedik Travmatoloji. Bölüm 1 Genel Bilgiler. 1-17. *Nobel Tıp Kitabevi*. (2002)
24. **WÖLKER V.** Growth Hormone (GH) Modulation of Epidermal Growth Factor (EGF) Signalling in Human Mammary Epithelial Cells. *Journal of Science, Humanities and Arts*. 2-3. (2015)
25. **EINHORN T. A., O'KEEFE R. J.** Orthopaedics Basic Science. Foundations of Clinical Practice. Third Edition. Section 1 . *AAOS* (2007)
26. **ORYAN A., MONAZZAH S.** Bone Injury and Fracture Healing Biology. *Biomedical Environmental Science*. 28(1): 57-71 (2015)
27. **COURT-BROWN C. M., HECKMAN J. D.,** Rockwood and Green's Fractures in Adults. Eighth Edition. Volume 1 Chapter 4. 109-127. *Wolters Kluwer* (2015).
28. **CHO-CHUNG Y. S.** Autoantibody Biomarkers in the Detection of Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1762, 587-91 (2006).
29. **GERSTENFELD L. C., CULLINANE D. M.** Fracture Healing as a Post-natal Developmental Process. Molecular, Spatial, and Temporal Aspects of its Regulation. *Journal of Cell Biochemistry* 88(5):873–84 (2003).
30. **PILITSIS J. G., LUCAS D. R.** Bone Healing and Spinal Fusion. *Neurosurgical Focus*. 13, 1-6 (2002)
31. **GERIS L., GERISCH A.** Angiogenesis in Bone Fracture Healing: A Bioregulatory Model. *Journal of Theoretical Biology*. 251, 137-58 (2008).
32. **KANCZLER J. M., OREFFO R. O.** Osteogenesis and Angiogenesis: The Potential for Engineering Bone. *European Cell Material* 15:100–14 (2008)
33. **EINHORN T. A.** The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clinical Orthopaedics Related Research* (355 Suppl):S7–21 (1998).
34. **SCHINDELER A, MCDONALD M. M.** Bone Remodeling During Fracture Repair: The Cellular Picture. *Semin Cell Developmental Biology*. 19, 459-66 (2008).
35. **MOUNTZIARIS P. M., MIKOS A. G.** Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 14, 179-86 (2008).
36. **LUGINBUEHL V., MEINEL L.** Localized Delivery of Growth Factors for Bone Repair. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58, 197-208. (2004).
37. **KAYAALP O.** Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 2. Bölüm 10. 1327-1340. *Pelikan Yayınları*. (2019)
38. **KHAN S. N., BOSTROM M. P.** Bone Growth Factors. *Orthopaedic Clinics of North America*. 31(3):375-88 (2000).
39. **LIEBERMAN J. R., DALUISKI A.** Role of Growth Factors in the Repair of Bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 84(6):1032-44 (2002).

40. **KERAMARIS N. C., CALORI G. M.** Fracture Vascularity and Bone Healing: A Systematic Review of the Role of VEGF. *Injury, International Journal of Care Injured* 39S2, S45-57 (2008).
41. **CHIM S. M., TICKNER J.** Angiogenic Factors in Bone Local Environment. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 24(3): 297-310. (2013).
42. **BOYER M. I.** AAOS Comprehensive Orthopaedic Review. Volume 1 Chapter 1. *AAOS* 73-81. (2014).
43. **ASLAN M., ŞİMŞEK G.** The Effect of Hyaluronic Acid-supplemented Bone Graft in Bone Healing: Experimental Study in Rabbits. *Journal of Biomaterials Applications*. 20(3):209-20. (2006).
44. **AKYILDIZ S. SOLUK-TEKKESIN M.** Acceleration of Fracture Healing in Experimental Model: Platelet-Rich Fibrin or Hyaluronic Acid? *Journal of Craniofacial Surgery* 29:1794-1798 (2018).
45. **AYANOĞLU S. ESENYEL C. Z.** Effects of Hyaluronic Acid (Hyalonect) on Callus Formation in Rabbits. *Acta Orthopædica Traumatologica Turcica*. 49(3): 319-325. (2015).
46. **BHAKTA G., LIM Z. X.** The Influence of Collagen and Hyaluronan Matrices on the Delivery and Bioactivity of Bone Morphogenetic Protein-2 and Ectopic Bone Formation. *Acta Biomaterialia*. 9(11): 9098-106. (2013).
47. **OH E. J., PARK K.** Target Specific and Long-acting Delivery of Protein, Peptide, and Nucleotide Therapeutics Using Hyaluronic Acid Derivatives. *Journal of Controlled Release* 141: 2-12. (2010)
48. **TRIPODO G., TRAPANI A.** Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Drug Delivery and Imaging: Recent Advances and Challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 97: 400-416. (2015).
49. **GIANNINI S., BUDA R.** One-step Bone Marrow-Derived Cell Transplantation in Talar Osteochondral Lesions. *Clinical Orthopaedics Related Research*. 467: 3307-3320 (2009).
50. **KIM K. D., WRIGHT N. M.** Polyethylene Glycol Hydrogel Spinal Sealant (DuraSeal Spinal Sealant) as an Adjunct to Sutured Dural Repair in the Spine *Spine* 36: 1906–1912 (2011).
51. **GIANNOUDIS P. V., FAOUR O.** Masquelet Technique for the Treatment of Bone Defects: Tips, Tricks and Future Directions. *Injury* 42: 591–598 (2011).
52. **TERBOO G. J. A., SCHMID T.** Local Application of a Gentamicin-Loaded Thermoresponsive Hydrogel Allows for Fracture Healing upon Clearance of a High Staphylococcus Aureus Load in a Rabbit Model. *European Cells and Materials* 2;35:151-164. (2018)
53. **TEKİN A. Ç., ESENYEL C. Z.** Hyalonect'in psödoartroz tedavisinde kullanımı. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 47(6):379-386 (2013).
54. **MERMERKAYA M. U., DORAL M. N.,** Scintigraphic Evaluation of the Osteoblastic Activity of Rabbit Tibial Defects After HYAFF11 Membrane Application. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 11:57 (2016).
55. **HORIZON SCANNING RESEARCH & INTELLIGENCE CENTRE.** HyaloFast® for Chondral and Osteochondral Lesion Repair. *National Institute for Health Research*. (2016).

56. **ROEPSTORFF K., GRANDAL M. V.** Differential Effects of EGFR Ligands on Endocytic Sorting of the Receptor. *Traffic*. 10(8):1115–27. (2009)
57. **ZHANG X., SICLARI V. A.,** The Critical Role of the Epidermal Growth Factor Receptor in Endochondral Ossification. *Journal of Bone and Mineral Research*. 26(11):2622-33 (2011).
58. **YARRAM S. J., TASMAN C.** Epidermal Growth Factor and Calcitriol Synergistically Induce Osteoblast Maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 31;220 (1-2): 9-20 (2004).
59. **CHANDRA A., LAN S.** Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Promotes Proliferation and Survival in Osteoprogenitors by Increasing Early Growth Response 2 (EGR2) Expression. *Journal of Biological Chemistry*. 12;288(28):20488-98 (2013).
60. **GREEN M. R., BASKETTER D. A.** Distribution and Number of Epidermal Growth Factor Receptors in Skin is Related to Epithelial Cell Growth. *Developmental Biology*; 100(2):506-12 (1983).
61. **SCHULTZ G., ROTATORI D. S.** EGF and TGF- α in Wound Healing and Repair. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol. 45, No. 4, 346–352. (1991).
62. **SU Z., MA H.** Enhancement of Skin Wound Healing with Decellularized Scaffolds Loaded with Hyaluronic Acid and Epidermal Growth Factor. *Material Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*. 44: 440-8 (2014).
63. **GOSPODAROWICZ D., GREENBURG G.** The Effects of Epidermal and Fibroblast Growth Factors on the Repair of Corneal Endothelial Wounds in Bovine Corneas Maintained in Organ Culture. *Experimental Eye Research*. 28(2):147-157 (1979)
64. **TAMAMA K., KAWASAKI H.** Epidermal Growth Factor (EGF) Treatment on Multipotential Stromal Cells (MSCs). Possible Enhancement of Therapeutic Potential of MSC. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. (1110-7243):795385. (2010).
65. **LINDER M., HECKING M.** EGFR Controls Bone Development by Negatively Regulating mTOR Signaling During Osteoblast Differentiation. *Cell Death and Differentiation*. 25(6):1094-1106. (2018).
66. **JANN H. W., STEIN L. E.** In Vitro Effects of Epidermal Growth Factor or Insulin-like Growth Factor on Tenoblast Migration on Absorbable Suture Material. *Veterinary Surgery*. 28:268–278. (1999)
67. **TSUBONE T., MORAN S. L.** Expression of Growth Factors in Canine Flexor Tendon After Laceration In-vivo. *Annals of Plastic Surgery*.53(4):393-7. (2004).
68. **CHAN S-Y., WONG R. W-C.** Expression of Epidermal Growth Factor in Transgenic Mice Causes Growth Retardation. *Journal of Biochemical Chemistry*. 8;275(49):38693-8 (2000).
69. **LUO W., SHAO C.** Expression of Epidermal Growth Factor-Like Domain 7 Correlates with Clinicopathological Features of Osteosarcoma. *American Journal of Translational Research*. 15;7(7):1236-45. (2015).

70. **WANG X, CHEN W.** Function and Mechanism of Mesoporous Bioactive Glass Adsorbed Epidermal Growth Factor for Accelerating Bone Tissue Regeneration. *Biomedical Materials*. 28;12(2):025020. (2017).
71. **JIMENO A., HIDALGO M.** Pharmacogenomics of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1766(2):217-29. (2006).
72. **MURPHY L. O., BLENIS J.** MAPK Signal Specificity: The Right Place at the Right Time. *Trends in Biochemical Sciences*. 31(5):268-75. (2006).
73. **BALLA P., MOSKOVSZKY L.** Epidermal Growth Factor Receptor Signalling Contributes to Osteoblastic Stromal Cell Proliferation, Osteoclastogenesis and Disease Progression in Giant Cell Tumour of Bone. *Histopathology*. 59(3):376-89. (2011).
74. **QIN L., PARTRIDGE N.C.** Stimulation of Amphiregulin Expression in Osteoblastic Cells by Parathyroid Hormone Requires the Protein Kinase A and cAMP Response Element-Binding Protein Signaling Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 96(3):632-40 (2005).
75. **FOLEY J., NICKERSON N.** At the Crossroads: EGFR and PTHrP Signaling in Cancer-Mediated Diseases of Bone. *Odontology*. 100(2):109-29. (2012).
76. **WANG K., YAMAMOTO H.** Epidermal Growth Factor Receptor-Deficient Mice Have Delayed Primary Endochondral Ossification Because of Defective Osteoclast Recruitment. *Journal of Biochemical Chemistry*. 279:53848-56 (2004).
77. **NEAGU T. P., TIGLIS M.** Histological Assessment of Fracture healing After Reduction of the Rat Femur Using Two Different Osteosynthesis Methods. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 57(3):1051-1056 (2016).
78. **CLAES L. BLAKYTTY R.** Early Dynamization by Reduced Fixation Stiffness Does Not Improve Fracture Healing in a Rat Femoral Osteotomy Model. *Journal of Orthopaedic Research*. 27(1):22-7. (2009).
79. **LANE J. M., SANDHU H. S.** Current Approaches to Experimental Bone Grafting. *The Orthopaedic Clinics of North America*. 18(2):213-25 (1987).
80. **DONMEZ B. O., OZDEMIR S.** Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker on Osteoporotic Rat Femurs. *Pharmacological Reports*. 64, 878-888 (2012).
81. **LEPPANEN O., SIEVANEN H.** Three-Point Bending of Rat Femur in the Mediolateral Direction: Introduction and Validation of a Novel Biomechanical Testing Protocol. *Journal of Bone and Mineral Research*. 21(8):1231-7 (2006).
82. **SILVA M. J.** Bone Mechanical Testing by Three-Point Bending. *Washington University Musculoskeletal Structure and Strength Core* (2016).
83. **TURNER C. H., BURR D. B.** Basic Biomechanical Measurements of Bone: A Tutorial. *Bone*. 14, 595-608. (1993).
84. **CHEN L., TAO Z. S.** Combined Treatment with Alendronate and Drynaria Rhizome Extracts. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*. 51(8):875-881 (2018).
85. **HUO M. H., NANCY W.** The Influence of Ibuprofen on Fracture Repair: Biomechanical, Biochemical, Histologic, and Histomorphometric Parameters in Rats. *Journal of Orthopaedic Research*. 9:383-390 (1991)

86. JACKSON R. W., REED C. A. Production of a Standard Experimental Fracture. *Canadian Journal of Surgery*. 13(4):415-20. (1970).
87. BONNARENS F., EINHORN T. Production of a Standard Closed Fracture in Laboratory Animal Bone. *Journal of Orthopaedic Research* 2:97–101 (1984).
88. HANDOOL K. O., IBRAHIM S. M. Optimization of a Closed Rat Tibial Fracture Model. *Journal of Experimental Orthopaedics* 5:13. (2018).
89. MARSELL R., EINHORN T. A. The Biology of Fracture Healing. *National Institutes of Health*. 42(6): 551-555. (2011).
90. GIANNOUDIS P., TZIOUPIS C. Fracture Healing in Osteoporotic Fractures: Is it Really Different? A Basic Science Perspective. *Injury* 38, 90-9. (2007)
91. ARVIDSON K., ABDALLAH B. M. Bone Regeneration and Stem Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15, 718-46. (2011).
92. TSIRIDIS E., UPADHYAY N. Molecular Aspects of Fracture Healing: Which are the Important Molecules? *Injury*. 38, 11-25. (2007).
93. SCHNEIDER M.R., SIBILIA M. The EGFR Network in Bone Biology and pathology. *Cell Press*. 20-10 517-524 (2009)
94. POWER R. A., IWANIEC U. T. Basic Fibroblast Growth Factor has Rapid Bone Anabolic Effects in Ovariectomized Rats. *Osteoporosis International* 15:716–723 (2004).
95. KAWAGUCHI H, NAKAMURA K. Acceleration of Fracture Healing in Nonhuman Primates by Fibroblast Growth Factor-2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86:875–880 (2001).
96. STREET J., WINTER D. Is Human Fracture Hematoma Inherently Angiogenic? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 224–237. (2000).
97. ANCELIN M., CHOLLET-MARTIN S. Vascular Endothelial Growth Factor VEGF189 Induces Human Neutrophil Chemotaxis in Extravascular Tissue via an Autocrine Amplification Mechanism. *Laboratory Investigation*. 84:502–512. (2004)
98. LIM S. R., ZHANG Y. VEGFR2-Mediated Vascular Dilation as a Mechanism of VEGF Induced Anemia and Bone Marrow Cell Mobilization. *Cell Reports*. 9:569–580. (2014).
99. STREET J., BAO M. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Bone Repair by Promoting Angiogenesis and Bone Turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:9656–9661. (2002).
100. KODAMA H., YAMASAKI A. Congenital Osteoclast Deficiency in Osteopetrotic (Op/Op) Mice Is Cured by Injections of Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Journal of Experimental Medicine*. 173:269–272. (1991).
101. NIIDA S., KAKU M. Vascular Endothelial Growth Factor can Substitute for Macrophage Colony Stimulating Factor in the Support of Osteoclastic Bone Resorption. *Journal of Experimental Medicine*. 190:293–298. (1999).
102. KAIGLER D., SILVA E. A. Guided Bone Regeneration Using Injectable Vascular Endothelial Growth Factor Delivery Gel. *Journal of Periodontology*. 84:230–238. (2013).
103. CANALIS E., MCCARTHY T. L. Effects of Platelet-Derived Growth Factor on Bone Formation In Vitro. *Journal of Cellular Physiology*. 140:530-7 (1989).
104. NASH T. J., HOWLETT C. R. Effect of Platelet-Derived Growth Factor on Tibial Osteotomies in Rabbits. *Bone*. 5:203-8. (1994).

105. **ASPENBERG P.** Teriparatide for Acceleration of Fracture Repair in Humans: A Prospective, Randomized, Double-Blind Study of 102 Postmenopausal Women with Distal Radial Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*. 24, 404–414 (2010).
106. **PEICHL P., HOLZER, L.** Parathyroid Hormone 1–84 Accelerates Fracture Healing in Pubic Bones of Elderly Osteoporotic Women. *Journal of Bone and Joint Surgery America* 93, 1583–1587 (2011).
107. **ALKHIARY Y. M.** Enhancement of Experimental Fracture-Healing by Systemic Administration of Recombinant Human Parathyroid Hormone (PTH 1–34). *Journal of Bone and Joint Surgery America* 87, 731–741 (2005).
108. **ANDREW J. G., HOYLAND J.** Insulin Like Growth Factor Gene Expression in Human Fracture Callus. *Calcified Tissue International*. 53:97-102 (1993).
109. **BAK B., JORGENSEN P. H.** Dose Response of Growth Hormone on Fracture Healing in the Rat. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 61:54-7 (1990).
110. **CARPENTER J. E., HIPP J. A.** Failure of Growth Hormone to Alter the Biomechanics of Fracture-Healing in a Rabbit Model. *Journal of Bone and Joint Surgery America*. 74:359-67 (1992).
111. **YARIM G. F., KAZAK F.** Epidermal Büyüme Faktörü. *Kocatepe Veterinary Journal*. 9(3):215-225 (2016).
112. **COHEN S.** Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal. *Journal of Biological Chemistry*. 237:1555-1562 (1962).
113. **MIETTINEN P. J., BERGER J. E.** Epithelial Immaturity and Multiorgan Failure in Mice Lacking Epidermal Growth Factor Receptor. *Nature*. 376(6538):337-341 (1995).
114. **SIBILIA M., WAGNER B.,** Mice Humanised for the EGF Receptor Display Hypomorphic Phenotypes in Skin, Bone and Heart. *Development*. 130(19):4515-4525 (2003).
115. **FERRARI G., TOFFANO G.** Epidermal Growth Factor Exerts Neuronotrophic Effects on Dopaminergic and GABAergic CNS neurons: Comparison with Basic Fibroblast Growth Factor. *Journal of Neuroscience Research*. 30:493-497 (1993).
116. **ISHIYAMA J., SAITO H.** Epidermal Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Promote the Generation of Long-term Potentiation in the Dentate Gyrus of Anaesthetized Rats. *Journal of Neuroscience Research*. 12(3):403-411 (1991).
117. **GRITTI A., FROLICHSTHAL-SCHOELLER P.** Epidermal and Fibroblast Growth Factors Behave as Mitogenic Regulators for a Single Multipotent Stem Cell-like Population from the Subventricular Region of the Adult Mouse Forebrain. *Journal of Neuroscience*. 19(9):3287-3297 (1999).
118. **SUN D., BULLOCK M. R.** The Effect of Epidermal Growth Factor in the Injured Brain After Trauma in Rats. *Journal of Neurotrauma*. 27(5):923-938 (2010).
119. **NIETO-SAMPEDRO M., GOMEZ-PINILLA F.** Epidermal Growth Factor Receptor Immunoreactivity in Rat Brain Astrocytes. Response to injury. *Neuroscience Letters*. 91(3):276-282 (1988).
120. **AGUIRRE A., DUPREE J. L.** A Functional Role for EGFR Signaling in Myelination and Remyelination. *National Neuroscience*. 10(8):990-1002 (2007).

121. **LI H., MIAO J.** Different Expression Pattern of Growth Factors in Rat Fetuses With Spina Bifida Aperta After in Utero Mesenchymal Stromal Cell Transplantation. *Cytotherapy*. 0;1-12. (2014).
122. **OOMIZU S., HONDA J.** Transforming Growth Factor-Alpha Stimulates Proliferation of Mammothrophs and Corticotrophs in the Mouse Pituitary. *Journal of Endocrinology*. 165(2):493-501 (2000).
123. **CHILDS G. V., UNABIA G.** Epidermal Growth Factor and Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulate Proliferation of Enriched Population of Gonadotropes. *Endocrinology*. 142(2):847-853 (2001).
124. **ALTSCHULER L. R., PARISI M. N.** Epidermal Growth Factor Stimulates Thyrotropin Secretion in the Rat. *Neuroendocrinology*. 57(1):23-27 (1993).
125. **MURDOCH G. H., POTTER E.** Epidermal Growth Factor Rapidly Stimulates Prolactin Gene Transcription. *Nature*. 300(5888):192-194 (1982).
126. **IKEDA H., MITSUHASHI T.** Epidermal Growth Factor Stimulates Growth Hormone Secretion from Superfused Rat Adenohypophyseal Fragments. *Endocrinology*. 115(2):556-558 (1984).
127. **KHURANA S., NATH S. K.** Brush Border Phosphatidylinositol 3-kinase Mediates Epidermal Growth Factor Stimulation of Intestinal NaCl Absorption and Na⁺/H⁺ exchange. *Journal of Biological Chemistry*. 271(17):9919-9927 (1996).
128. **SAITO K., HORIUCHI K.** Conditional Inactivation of TNF α -Converting Enzyme in Chondrocytes Results in an Elongated Growth Plate and Shorter Long Bones *PLoS ONE* 8(1): e54853 (2013).
129. **YASUDA K., TOMITA F.** The Effect of Growth Factors on Biomechanical Properties of the Bone–Patellar Tendon–Bone Graft After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction A Canine Model Study. *The American Journal of Sports Medicine*. 32-4 870-880 (2004).
130. **SU Z., MA H.** Enhancement of Skin Wound Healing with Decellularized Scaffolds Loaded with Hyaluronic Acid and Epidermal Growth Factor. *material Science and Engineering*. 44:440-448 (2014).
131. **BURLING K., SEGUIN M. A.** Effect of Topical Administration of Epidermal Growth Factor on Healing of Corneal Epithelial Defects in Horses. *American Journal of Veterinary Research*. 61(9):1150-1155 (2000).
132. **FERNANDEZ-MONTEQUIN J. I., VALENZUELA-SILVA C. M.** Intralesional Injections of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Promote Granulation and Healing in Advanced Diabetic Foot Ulcers: Multicenter, Randomised, Placebo-controlled, Doubleblind study. *International Wound Journal*. 6:432-443 (2009)
133. **YERA-ALOS I. B., ALONSO-CARBONELL L.** Active Post-marketing Surveillance of the Intralesional Administration of Human Recombinant Epidermal Growth Factor in Diabetic Foot Ulcers. *BMC Pharmacological Toxicology*. 3:14-44 (2013).
134. **KIM D., KIM S. Y.** Epidermal Growth Factor Improves the Migration and Contractility of Aged Fibroblasts Cultured on 3D Collagen Matrices. *International Journal of Molecular Medicine*. 35(4):1017- 1025 (2015).

135. **HALEVY O.** Epidermal Growth Factor Receptor Gene Expression in Avian Epiphyseal Growth-Plate Cartilage Cells: Effect of Serum, Parathyroid Hormone and Atrial Natriuretic Peptide. *Molecular Cellular Endocrinology*. 75, 229–235 (1991).
136. **DRAKE M. T., BALDASSARE J. J.** Parathyroid Hormone Increases the Expression of Receptors for Epidermal Growth Factor in UMR 106-01 Cells. *Endocrinology* 134:1733–7 (1994).
137. **MONSONEGO E.** Growth Hormone Inhibits Differentiation of Avian Epiphyseal Growth-Plate Chondrocytes. *Molecular Cellular Endocrinology* 114, 35–42 (1995).
138. **KRAMPERA M.** HB-EGF/HER-1 Signaling in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Inducing Cell Expansion and Reversibly Preventing Multilineage Differentiation. *Blood* 106, 59–66 (2005).
139. **KARPEDIJIEVA S. S., KIM D. S.** EGFR Ligands Drive Multipotential Stromal Cells to Produce Multiple Growth Factors and Cytokines via Early Growth Response-1. *Stem Cells and Development* 21,13. 2541-2551 (2012).
140. **SHOJI T., NAKASA T.** Comparison of Fibrin Clots Derived from Peripheral Blood and Bone Marrow. *Connective Tissue Research*. 58(2):208-214 (2017).
141. **LAFLAMME C., CURT S.** Epidermal Growth Factor and Bone Morphogenetic Proteins Upregulate Osteoblast Proliferation and Osteoblastic Markers and Inhibit Bone Nodule Formation. *Archives of Oral Biology*. 55. 689-701 (2010).
142. **WONG G., COHN D. V.** Separation of Parathyroid Hormone and Calcitonin-Sensitive Cells from Non-responsive Bone Cells. *Nature* 252:713–5 (1974).
143. **BASAL O. ATAY T.** Epidermal Growth Factor (EGF) Promotes Bone Healing in Surgically Induced Osteonecrosis of the Femoral head (ONFH). *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 18(4):352-360 (2018).
144. **ZHU J., JIA X.** EGF-like Ligands Stimulate Osteoclastogenesis by Regulating Expression of Osteoclast Regulatory Factors by Osteoblasts: Implications for Osteolytic Bone Metastases. *Journal of Biological Chemistry*. 282(37):26656-64 (2007).
145. **AHMED I.** Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Parathyroid Hormone and Prostaglandin F2 Alpha Stimulated Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Cultured Transgenic Murine Osteoblasts. *Molecular Endocrinology* 17, 1607–1621 (2003).
146. **DEL ANGEL-MOSQUEDA C., GUTIERREZ-PUENTE Y.** Epidermal Growth Factor Enhances Osteogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells In-vitro. *Head Face Medicine*. 11:29. (2015).
147. **LEE H. L., PARK H. J.** Smurf1 Plays a Role in EGF Inhibition of BMP2-Induced Osteogenic Differentiation. *Experimental Cell Research*. 323:276-87 (2014).
148. **WANG A., DING X.** Bone Morphogenetic Protein Receptor in the Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells. *Yonsei Medical Journal*. 51:740-5 (2010).
149. **LEE J. H., JANG S. J.** Synergistic Induction of Early Stage of Bone Formation by Combination of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Epidermal Growth Factor. *Journal Tissue Engineering Regeneration Medicine*. 9:447-59 (2015).

150. **HERNANDEZ-FLORES C., DOMINGUEZ-HERNANDEZ V. M.** Effect of BioOsteo in Combination with Epidermal Growth Factor and Ascorbic Acid in a Rat Tibia Defect. *Cirugia Y Cirujanos* 86:332-337 (2018).
151. **LIUNI F. M., RUGERIO C.** Impaired Healing of Fragility Fractures in Type 2 Diabetes: Clinical and Radiographic Assessments and Serum Cytokine Levels. *Aging Clinical and Experimental Research* 27 (Suppl 1):S37–S44 (2015).
152. **WILLEUMIER J. J., VAN DER HOEVEN N. M. A.** Epidermal Growth Factor Receptor Mutations Should be Considered as a Prognostic Factor for Survival of Patients with Pathological Fractures or Painful Bone Metastases from Non-small Cell Lung Cancer. *The Bone & Joint Journal*. 99-B:516-21 (2017).
153. **SOULTZIS N.** Expression Analysis of Peptide Growth Factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia. *International Journal of Oncology*. 29, 305–314 (2006).
154. **ANGELUCCI A.** Suppression of EGF-R Signaling Reduces the Incidence of Prostate Cancer Metastasis in Nude Mice. *Endocrinology Related Cancer* 13, 197–210 (2006).
155. **KIM S.J.** Simultaneous Blockade of Platelet-Derived Growth Factor-Receptor and Epidermal Growth Factor-Receptor Signaling and Systemic Administration of Paclitaxel as Therapy for Human Prostate Cancer Metastasis in Bone of Nude Mice. *Cancer Research*. 64, 4201–4208 (2004).
156. **WEBER K.L.** Blockade of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Leads to Inhibition of Renal Cell Carcinoma Growth in the Bone of Nude Mice. *Cancer Research*. 63, 2940–2947 (2003).
157. **MESSERSCHMITT P. J., RETTEW A. N.** Specific Tyrosine Kinase Inhibitors Regulate Human Osteosarcoma Cells *In Vitro*. *Clinical Orthopaedic Related Research* 466: 2168 – 2175 (2008).
158. **WEN Y. H., KOEPPEN H.** Epidermal Growth Factor Receptor in Osteosarcoma: Expression and Mutational Analysis. *Human Pathology* 38: 1184 – 1191 (2007).
159. **BASHIR E. S., KWAN A. K. N.** Remarkable Bone Formation Following Gefitinib for Extensive Lytic Bone Metastasis: A Report of Two Cases. *Journal of Orthopaedic Surgery* 24(3):421-3 (2016).
160. **ATES A., KINIKLI G.,** The Efficacy of Viscosupplementation Therapy with Sodium Hyaluronate in Patients with Knee Osteoarthritis. *Turkish Journal of Geriatrics* 7 (1): 21-24 (2004)
161. **NOLAN A., BAILLIE C.,** The Efficacy of Topical Hyaluronic Acid in the Management of Recurrent Aphthous Ulceration. *Journal of Oral Pathology Medicine* -35 (8): 461-5 (2006).
162. **MIGLORE A., GRANATA M.** Intra-Articular Use of Hyaluronic Acid in the Treatment of Osteoarthritis. *Clinical Interventions in Aging*. 3(2) 365-369 (2008).
163. **CAO J. J., SINGLETON P. A.** Hyaluronan Increases RANKL Expression in Bone Marrow Stromal Cells Through CD44. *Journal of Bone Mineral Research*. 20:30-40 (2005).
164. **OHKAWARA Y., TAMURA G.** Activation and Transforming Growth Factor Beta Production in Eosinophils by Hyaluronan. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*. 23:444-51 (2000).

165. **DORAL M. N., BILGE O.** Treatment of Osteochondral Lesions of the Talus with Microfracture Technique and Postoperative Hyaluronan Injection. *European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery, Arthroscopy*. 20(7): 1398-1403. (2012).
166. **HEYBELI N., DORAL M. N.** Intra-articular Sodium Hyaluronate Injections after Arthroscopic Debridement for Osteoarthritis of the Knee: A prospective, Randomized, Controlled Study. *Acta Orthopaedica Traumatologica Turcica*. 42(4): 221-7. (2008).
167. **LAMO-ESPINOSA J. M., MORA G.** Intra-articular Injection of Two Different Doses of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Versus Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis: Multicenter Randomized Controlled Clinical Trial (phase I/II). *Journal of Translational Medicine*. 14:246 (2016).
168. **YÜCEKUL A., ÖZDİL D.** Tri-layered Composite Plug for the Repair of osteochondral defects: In Vivo Study in Sheep. *Journal of Tissue Engineering*. 8: 1-10 (2017).
169. **GOBBI A., SCOTTI C.** One-step Surgery with Multipotent Stem Cells and Hyaluronan-Based Scaffold for the Treatment of Full-Thickness Chondral Defects of the Knee in Patients Older Than 45 Years *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy* 25:2494–2501 (2017).
170. **ABBAS M., ALKAFF M.** Combination of Mesenchymal Stem Cells, Cartilage Pellet and Bioscaffold Supported Cartilage Regeneration of a Full Thickness Articular Surface Defect in Rabbits. *Tissue Engineering and Regeneration Medicine* 15(5):661–671 (2018).
171. **ZACCHI V., SORANZO C.,** In Vitro Engineering of Human Skin-Like Tissue. *Journal of Biomedical Material Research* 40:187-94 (1998).
172. **ATESOK K., DORAL M. N.** Multilayer Scaffolds in Orthopaedic Tissue Engineering. *European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery, Arthroscopy*. 24(7): 2365-73. (2016).
173. **RHODES N. P., HUNT J. A.** In vivo Characterization of Hyalonex, a Novel Biodegradable Surgical Mesh. *Journal of Surgical Research* 168:e31-8 (2011).
174. **BURD D. A., GRECO R. M.** Hyaluronan and Wound Healing: A New Perspective. *British Journal of Plastic Surgery*. 44(8):579–84 (1991).
175. **WIGHT T. N., KINSELLA M. G.** The Role of Proteoglycans in Cell Adhesion, Migration and Proliferation. *Current Opinion in Cell Biology*. 4(5):793–801 (1992).
176. **BRENNER AI., KOSHY J.,** The Bonescan. *Seminars in Nuclear Medicine*. 42(1):11–26 (2012)
177. **PICKE A. N., SALBACH-HIRSCH J.** Sulfated Hyaluronan Improves Bone Regeneration of Diabetic Rats by Binding Sclerostin and Enhancing Osteoblast Function. *Biomaterials* S0142-9612(16)30118-1 (2016).
178. **KONDO S., NIYAMA H.** Evaluation of a Wound Dressing Composed of Hyaluronic Acid and Collagen Sponge Containing Epidermal Growth Factor in Diabetic Mice. *Journal of Biomaterials Science*. 23:1729-1740 (2012).