

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



**KEMİK DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİNDE HYALÜRONİK
ASİT VE/VEYA KEMİK GREFTLERİNİN ETKİNLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dt. Cansu Gül EFEOĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurgül KÖMERİK

Tez No: 123

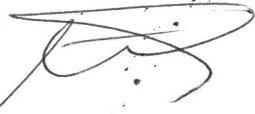


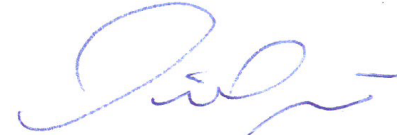

ISPARTA, 2015

KABUL VE ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans/Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15 /06 /2015

- Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nurgül KÖMERİK
İstanbul Aydın Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD. 
- Üye : Prof. Dr. Zuhâl KIRZIOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti AD. 
- Üye : Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji AD. 
- Üye : Doç. Dr. Gülperi KOÇER
Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD. 
- Üye : Yrd. Doç. Dr. M. Fatih ŞENTÜRK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD. 

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nejdît ADANIR
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

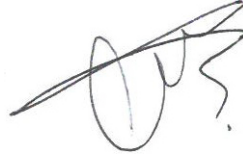
Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

“Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Hyalüronik Asit Ve/Veya Kemik Greftlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Dt. Cansu Gül EFEOĞLU

İmza



Danışman

Prof. Dr. Nurgül KÖMERİK

İmza



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yakın ilgi ve desteğini hissettiğim, doktora tezimin her aşamasında bilgisini ve emeğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Nurgül Kömerik'e

Araştırmalarımıza bilgi ve tecrübeleri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Zuhâl Kırcıoğlu, Doç. Dr. Gülperi Koçer ve Yrd. Doç. Dr. M. Fatih Şentürk'e

Araştırma verilerimin histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmesini planlayan ve gerçekleştiren Prof. Dr. Özlem Özmen'e

Araştırma verilerimin mikrobilgisayarlı tomografi ile değerlendirmesini planlayan ve gerçekleştiren Prof. Dr. H. Hakan Çelik'e;

Araştırmamın istatistiksel değerlendirmesini yapan Yrd. Doç. Dr. Özgür Koşkan'a;

Doktora eğitimim boyunca desteklerini hissettiğim asistan arkadaşlarıma,

Doktora tezimi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine;

Tezimin deneysel kısmının gerçekleştirildiği SDÜ Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı ve personeline;

Eğitim sürecim boyunca ve hayatımın her aşamasında bana her bakımdan destek olan sevgili aileme;

Tez sürecinde bana manevi desteğiyle katkıda bulunan Hamdi Çağrı Koca'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Dokusu.....	3
2.1.1. Kemik Dokusu Hücreleri.....	3
2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler.....	3
2.1.1.2. Osteoblastlar.....	3
2.1.1.3. Osteositler	4
2.1.1.4. Osteoklastlar.....	4
2.1.2. Kemik Matriksi	7
2.1.3. Kemiği Saran Yapılar	9
2.1.3.1. Periosteum.....	9
2.1.3.2. Endosteum.....	10
2.1.4. Kemik Histogenezi	10
2.1.4.1. İntramembranöz Kemikleşme	10
2.1.4.2. Kondral Kemikleşme	11
2.1.4.2.1. Perikondral Kemikleşme	11
2.1.4.2.2. Enkondral Kemikleşme	11
2.1.5. Kemik İyileşmesi	12
2.1.5.1. Enflamasyon (Yangı) Evresi	12
2.1.5.2. Reperasyon (Onarım) Evresi.....	14
2.1.5.3. Remodelasyon (Yeniden Şekillenme) Evresi.....	14
2.1.6. Kemik Organizasyonu	15

2.1.6.1 Süngerimsi Kemik	15
2.1.6.2. Kompakt Kemik	16
2.2. Kemik Greftleri	16
2.2.1. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması.....	16
2.2.1.1. Otojen Greftler	16
2.2.1.2. Allogreftler	17
2.2.1.3. Xenogreftler	18
2.2.1.4. Alloplastlar	18
2.2.1.4.1. Seramikler.....	19
2.2.1.4.1.1. Ha.....	19
2.2.1.4.1.2. TKF.....	19
2.2.1.4.1.3. Biyoaktif Camlar	20
2.2.1.4.2. Kalsiyum Karbonat.....	20
2.2.1.4.3. Kompozit Kopolimer.....	20
2.2.1.4.4. Kalsiyum Sülfat.....	21
2.2.2. Kemik Greftlerinin Kabulü.....	21
2.3. HA	22
2.3.1. Tanım.....	22
2.3.2. Bulunduğu Doku ve Organlar.....	24
2.3.3. Sentezi.....	25
2.3.4. Metabolizması.....	25
2.3.5. Fonksiyonu	26
2.3.6. Kemik Metabolizması Üzerine Etkisi.....	29
2.3.7. Biyomedikal Preparatları ve Tıbbi Kullanımları	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	34
3.1. Deney Hayvanları.....	34
3.2. Uygulanan Biyomateryaller	34
3.3. Cerrahi Yöntem	35
3.3.1. Kemik Defekti Oluşturulması.....	35
3.3.2. Biyomateryal Uygulaması	38
3.4. Operasyon Sonrası Takip	41
3.5. Örneklerin Elde Edilmesi	42
3.6. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme	42
3.6.1. Histopatolojik İnceleme.....	43

3.6.2. İmmünohistokimyasal İnceleme	44
3.7. MBT ile Değerlendirme	45
3.8. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Örneklerin Gruplara Göre Dağılımı	47
4.2. Makroskobik Kemik İyileşmesi	47
4.3. Histopatolojik Kemik İyileşmesi.....	47
4.4. Kemik-Yapım Belirteçlerinin Aktivitesi	50
4.5. Kemik Yoğunluğu	57
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	80
ÖZET	82
ABSTRACT	83
KAYNAKLAR	84
EKLER.....	92
ÖZGEÇMİŞ.....	97

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen fosfataz
BT	: Bilgisayarlı tomografi
DK	: Dondurulmuş kemik
DDKK	: Demineralize dondurulmuş-kurutulmuş kemik
DKK	: Dondurulmuş-kurutulmuş kemik
DMA	: Düşük molekül ağırlıklı
ESM	: Ekstrasellüler matriks
HA	: Hyalüronik asit
Ha	: Hidroksiapatit kristalleri
HAS	: Hyalüronan sentaz
HYAL	: Hyalüronidaz
IL	: İnterlökin
KBD	: Kritik boyut defekt
kDa	: Kilodalton
KMP	: Kemik morfojenik proteini
MBT	: Mikrobilgisayarlı tomografi
M-CSF	: Makrofaj koloni stimulan faktör
MMP	: Matriks metalloproteinaz
OCP	: Oktakalsiyum fosfat
OPG	: Osteoprotegerin
OPN	: Osteopontin
OSX	: Osteriks
PBS	: Phosphate-Buffer Saline
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PNL	: Polimorf nüveli lökosit
PTH	: Paratiroid hormon
PZP	: Plateletten zengin plazma
RANK	: Reseptör aktivatör nükleer kappa
RANKL	: Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand
ROI	: Region of interest
TNF	: Tümör nekrotizan faktör
TRAP	: Tartarat dirençli asit fosfataz

TKF : Trikalsiyum fosfat
VEBF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
YMA : Yüksek molekül ağırlıklı
µm : Mikrometre

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışma gruplarının dağılımı.....	38
Tablo 2. Emery histopatolojik kemik iyileşme skalası.....	43
Tablo 3. İmmünohistokimyasal belirteçlerin yoğunluğunun ölçümlendirilmesi.	44
Tablo 4. Her bir grupta değerlendirmeye katılan örnek sayısı.	47
Tablo 5. Çalışma gruplarına ait örneklerde kemik iyileşmesi değerleri.....	50
Tablo 6. Çalışma gruplarına ait örneklerde saptanan ALP belirteci aktivitesi.....	57
Tablo 7. Çalışma gruplarına ait örneklerde saptanan OPN belirteci aktivitesi.	57
Tablo 8. Çalışma gruplarına ait örneklerde saptanan OSX belirteci aktivitesi.	57
Tablo 9. Çalışma gruplarına ait örneklerde ölçülen DGA değerleri.	58
Tablo 10. Çalışma gruplarına ait örneklerde ölçülen YGA değerleri.	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1a. Osteoklastik diferansiyasyon yolakları.....	6
Şekil 1b. OPG mediatörünün yalancı reseptör görevi görerek osteoklastik akviteyi baskılaması.....	6
Şekil 2. Kemiğin histolojik yapısı.....	9
Şekil 3. Kırık iyileşme evrelerinin zamana dağılımı.	12
Şekil 4. ESM yapısı.	22
Şekil 5a. Hyalüronan moleküler yapısı.....	23
Şekil 5b. Dağınık halde bulunan hyalüronan.....	24
Şekil 6. Hyalüronan sentezi.	25

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. İşlem sahası tıraşlanmış sıçanların köpük blok üzerinde sabitlenmesi.	36
Resim 2. Sıçan mandibulasında cilt insizyonu.	36
Resim 3. Yumuşak dokuların ekartasyonu ile cerrahi sahanın ortaya çıkarılması.	37
Resim 4. Trefin frez ile 5 mm çapında oluşturulan defekt.	37
Resim 5. Defekt oluşturularak çıkarılan bikortikal kemik.	38
Resim 6. Defekt sahasına yerleştirilmiş partikül kemik.	39
Resim 7. Defekt sahasına yerleştirilmiş HA.	39
Resim 8. Her kutuda iki adet demet halinde temin edilen lifsi yapıya sahip HA.	40
Resim 9. Kas dokusunun devamlı kilitli suture tekniğiyle suture edilmesi.	40
Resim 10. Cildin devamlı kilitli suture tekniğiyle suture edilmesi.	41
Resim 11. Kontrol grubuna ait bir denekten elde edilen örnekte, çevreleyen yumuşak dokularından arındırılmış mandibula bir yarısı.	42
Resim 12. Kemik yoğunluğunun tayini için kullanılan MBT cihazı.	45
Resim 13. Grup 1'e ait kemik iyileşmesine dair bir örnek.	48
Resim 14. Grup 2'ye ait kemik iyileşmesine dair bir örnek.	48
Resim 15. Grup 3'e ait kemik iyileşmesine dair bir örnek.	49
Resim 16. Grup 4'e ait kemik iyileşmesine dair bir örnek.	49
Resim 17. Grup 1'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki ALP immünoreaksiyonu.	51
Resim 18. Grup 2'ye ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki ALP immünoreaksiyonu.	51
Resim 19. Grup 3'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki ALP immünoreaksiyonu.	52
Resim 20. Grup 4'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki ALP immünoreaksiyonu.	52
Resim 21. Grup 1'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OSX immünoreaksiyonu.	53
Resim 22. Grup 2'ye ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OSX immünoreaksiyonu.	53
Resim 23. Grup 3'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OSX immünoreaksiyonu.	54
Resim 24. Grup 4'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OSX immünoreaksiyonu.	54
Resim 25. Grup 1'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OPN immünoreaksiyonu.	55

Resim 26. Grup 2'ye ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OPN immünoreaksiyon.....	55
Resim 27. Grup 3'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OPN immünoreaksiyonu.....	56
Resim 28. Grup 4'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OPN immünoreaksiyonu.....	56
Resim 29. Grup 1'e ait defekt sahasının görüntüsü.....	59
Resim 30. Grup 2'ye ait defekt sahasının görüntüsü.....	60
Resim 31. Grup 3'e ait defekt sahasının görüntüsü.....	60
Resim 32. Grup 4'e ait defekt sahasının görüntüsü.....	61

1. GİRİŞ

Kemik dokusu; iyi organize olmuş ve yapısındaki kalsiyum sebebi ile sertleşmiş özel bir dokudur (1). Yaşam boyu remodelasyon ile kendini yenileyen ve kendi kendini tamir edebilen kemik dokusu, skar oluşturmadan iyileşebilen tek dokudur (2). Bununla beraber belli bir boyutun üzerindeki defektlerde, kritik boyut defekt (KBD), kemik dokusu defekti kendi kendini tamamen iyileştirmekte yetersiz kalır. Böyle defektlerin rekonstrüksiyonunda çeşitli biyomateryaller ve kemik greftleri kullanılmaktadır (3). Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan kemik grefti/biyomateryallerin esas görevi defektlerin olabilecek en kısa sürede anatomik forma en uygun şekilde iyileşmesini sağlamak ve yeni oluşacak dokulara rehberlik etmektir. İdeal bir kemik grefti/biyomateryal; cerrahi sahadaki mekanik kuvvetlere karşı dirençli olmalı, yeterli miktarda temin edilebilmeli, maliyeti uygun olmalı, ikinci bir operasyona ihtiyaç duymamalı, istenilen forma kolayca getirilebilmeli, defekt bölgesi içerisinde stabilizasyonunu ve şeklini muhafaza edebilmeli, uygulanması kolay olmalı, uzun süre saklanabilmeli ve antijenik özellik taşınamalıdır (4). Günümüzde kullandığımız greft materyalleri bu özelliklerin sadece bir kısmını karşılayabilmektedir. İdeal materyali oluşturmak için yapılan çalışmalarda, kemik greflerinin yanı sıra kemik morfojenik proteinleri (KMP) gibi kemik yapımında görev alan pek çok faktör kemik yapımını uyarıcı biyomateryal olarak kullanılmaya başlanmıştır (5,6).

Hyalüronik asit (HA), vücutta hemen hemen bütün hücreler tarafından sentezlenmektedir (7). Glikozaminoglikan ailesinin bir üyesi olan bu molekül ekstraselüler matriksin (ESM) önemli bileşenlerindedir (8). Yüksek su bağlama kapasitesi olan HA'nın, ESM'nin yapısal bütünlüğünü korumasının ve desteklemesinin yanında hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimini sağlaması, osmotik basıncı dengelemesi, atıkların uzaklaştırılması, yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin dağılımını dengelemesi temel görevleri arasındadır (9). Ayrıca bakteriostatik özelliği de mevcuttur. Temel özellikleri ile beraber bulunduğu doku ve salgılandığı hücre tipine göre farklı görevler üstelenebilmektedir (10).

Kemik dokusunda da diğer dokularda olduğu gibi önemli görevleri vardır. HA, kemik metabolizmasında rol alan hücreler (monosit, fibroblast, osteoblast,

osteoklast, osteosit) ile olduğu kadar proteinlerle (büyüme faktörleri, kollajen tip I, kollajen tip V, fibronektin, kalsitonin gibi) de etkileşim içerisindedir. Kemik formasyonunda rol alan osteoblast, osteosit ve osteoklast hücrelerinin migrasyon, diferansiyasyon, proliferasyon gibi fonksiyonlarını yerine getirmelerinde yardımcı olur (11, 12).

Yukarıda sıralanan multifonksiyonel yapısından dolayı oftalmoloji, ortopedi ve dermatoloji alanlarında sıkça tercih edilen bu biyomateryalin oral ve maksillofasial cerrahi alanında uygulanması üzerine oldukça kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur (7, 9, 13, 14).

Çalışmamızda sıçan mandibula modellerinde oluşturulan defektlerde; HA ve kemik greftinin tek başlarına ve kombine uygulamalarında kemik iyileşmesi üzerine olan etkileri karşılaştırılmıştır. Defektlerde oluşan kemik iyileşmesi histopatolojik olarak incelenirken kemik metabolizması belirteçlerinin aktivitesi immünohistokimyasal olarak ölçümlendirilmiştir. Ayrıca defektlerde yeni oluşan kemik dokusunun mineralizasyonu mikrobilgisayarlı tomografi (MBT) ile değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik dokusu; hücreler, lifler ve ara maddeden oluşan ve yapısındaki kalsiyum ile sertleşmiş özel bir bağ dokusudur (15). Kemik dokusu dişte bulunan mine dokusundan sonra en sert ve kırıldak dokudan sonra strese karşı en dayanıklı dokudur (16, 17). Kemik, iskelet sisteminin en önemli yapıtaşını oluşturur (15). Diğer önemli görevleri ise kaslarla beraber vücut hareketini sağlaması, kranium ve toraks boşluğunda bulunan organları çevreleyerek koruması, vücuttaki en küçük kemikler olan çekiç, örs ve üzengi ile ses iletimini sağlaması, içerdiği hematopoetik yapı ile kan hücrelerini üretmesi ve kalsiyum-fosfor deposu olmasıdır (15, 18). Yaşam boyu remodelasyonu devam eden kemik metabolik, endokrin ve mekanik değişimlere karşı duyarlı olan aktif bir dokudur (19). Kendi kendini tamir edebilme özelliği olan bu doku skar oluşturmadan iyileşebilen tek dokudur (2).

2.1.1. Kemik Dokusu Hücreleri

2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler

Mezenşimden köken alan osteoprogenitör (osteojenik) hücreler kemiğin ana hücreleridir (15, 18). Asidofilik sitoplazma ve soluk boyanan çekirdeğe sahiptirler. Endosteumda, periosteumun iç tabakasında, Havers ve Volkmann kanallarının yüzeylerinde ve uzun kemiklerin metafizindeki kırıldak matrikste bulunurlar (15, 18). Büyüme sürecinde sürekli aktif olan bu hücreler erişkinlerde sadece kırık tamiri gibi durumlarda aktif hale geçer (15, 18).

2.1.1.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar, osteojenik hücrelerin diferansiyasyonu ile oluşan hücrelerdir. Osteoblastların diferansiyasyonunda Runt Related Transcription Factor 2 (RUNX 2) ve osteriks (OSX) en önemli iki faktördür (20, 21). Kübik veya prizmatik şekilde

olan bu hücrelerin çekirdekleri iri, sitoplazmaları bazofiliktir. İyi gelişmiş endoplazmik retikulum, mitokondri ve golgi cisimciğine sahiptirler.

Kemik matriksinin oluşmasında ve osteoklast hücrelerinin diferansiyasyonunda rol alan bu hücreler yüksek seviyede alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi gösterirler (15, 20). Kemik oluşumunun aktif olduğu bölgelerde periosteumun altında diziler halinde düzenli olarak sıralanırlar (18). Osteoblastlar sentezledikleri osteoidin etrafında kümeleşirler. Osteoblast maturasyonu denilen bu dönem yaklaşık 10 gün sürer (17). Osteoblastların matriks sentezi, önceden sentezlenmiş olan matrikse temas eden yüzeyde gerçekleşir. Böylece yeni oluşan ve henüz kalsifiye olmamış matriks, osteoblast hücreleri ile önceden sentezlenmiş olan matriks arasında yer alır. Bu olaya kemik apozisyonu denir. Zamanla kalsiyum tuzlarının bölgeye bir takım glikoproteinler aracılığı ile çökmesi sonucu kalsifikasyon tamamlanır (16, 20, 21).

2.1.1.3. Osteositler

Kemik dokusunun esas hücreleridir. Laküna adı verilen boşluklarda hapsolan osteoblastlar zamanla osteositlere dönüşürler. Osteositler tamamen olgunlaşmış hücrelerdir. Gelişimlerini tamamlamış oldukları için sentez yapamazlar. Bu nedenle endoplazmik retikulum ve golgi cisimciklerinde azalma meydana gelir. Sitoplazmaları bazofilik özelliklerini kaybetmişlerdir. Hücreler yassılaşıyor ve ince sitoplazmik uzantılar yaparlar. Bu uzantılar ile kanaliküller içinde diğer hücreler ile temas kurarlar (18). Osteositler, kemik matriksinin devamlılığını sağlayan hücrelerdir (16). Kemik dokusunun kimyasal veya mekanik değişikliklere karşı çok hızlı yanıt vermesini sağlayarak dokunun adaptasyonuna yardımcı olurlar (17). Kemik yıkımı olduğu zaman hapsedikleri lakünalardan çıkıp osteojenik hücrelere dönüşebilirler (18). Kalsiyumun kemik dokusundan dolaşıma geçmesinde rol alırlar. Bu hücrelerin ölmesi halinde matrikste rezorbsiyon başlar.

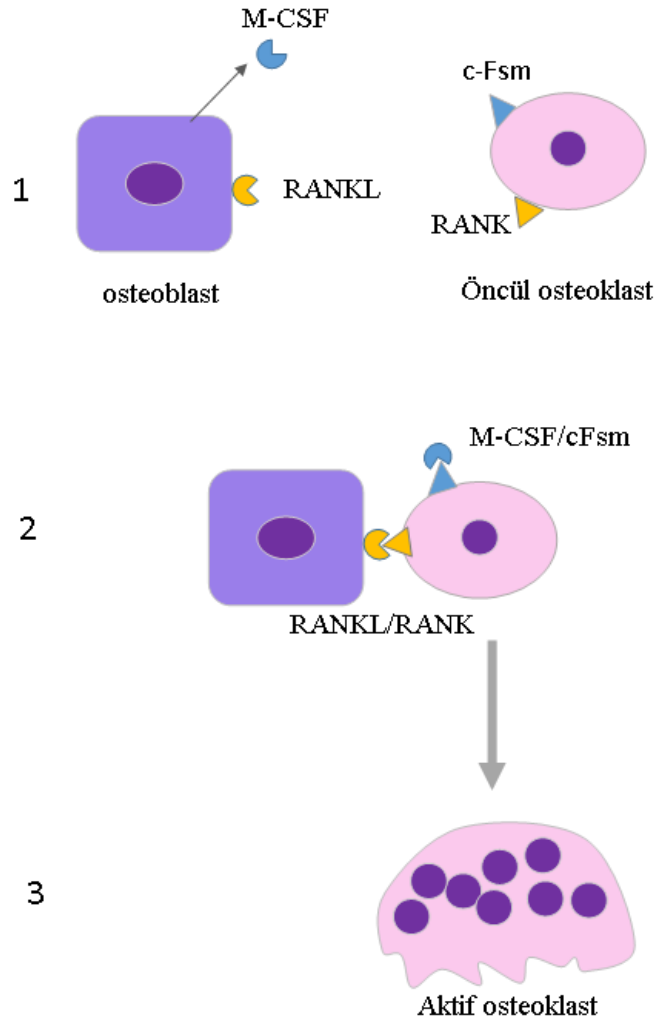
2.1.1.4. Osteoklastlar

Çok çekirdekli olan bu hücrelerin çapları 20-100 µm arasında değişir. Sitoplazmaları asidofilik özellik taşır. Gelişmiş golgi cisimcikleri vardır ve çok

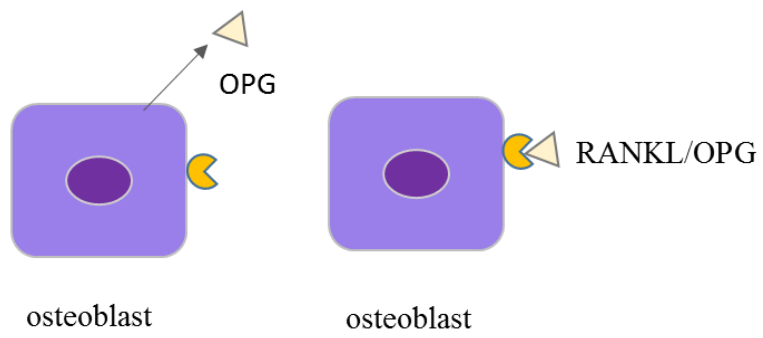
sayıda mitokondri ve lizozom içerir (16). Kemik dokusunda Howship lakünası adı verilen alanlarda bulunurlar. Hücre yapısında belirgin bir kutuplaşma göze çarpar. Çekirdekler hücrenin dış yüzeyinde yani daha düzgün sınırlı bölümünde yer alır. Kemğin rezorbsiyonundan sorumlu olan bölüm ise daha girintili çıkıntılı sınırlara sahiptir. Bu alana dantel kenar adı verilir (18). Bu yapı osteoklastların tipik görüntüsünü oluşturur. Kemik dokusunun rezorbsiyonunu içerdikleri kollajenaz ve proteolitik enzimler ile gerçekleştirir. Rezorbe olan kemik dokusunu, dantel kenarda yaptıkları basit hareketler ile hücre içine alırlar.

Osteoklastlar, hematopoetik kökenli monosit hücrelerinin birleşmesi ile meydana gelir (18). Osteoklast öncül hücrelerinin osteoklastlara dönüşebilmesi için temel 2 yolak vardır. Bunlar Makrofaj Koloni Stimulan Faktör (M-CSF) ve Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B (RANK)-Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandı (RANKL) yolaklarıdır. Bu yolaklar, osteoklastik diferansiyasyonu sağlamalarının yanı sıra, osteoklastların fonksiyonel özelliklerini kazanmaları ve yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmeleri için gereken faktörlerdir. Bu nedenle her iki yolağın da aktif halde olması gerekmektedir (Şekil 1a).

Osteoblast ve osteoklastların beraber fonksiyon görmesi kemik yapım-yıkım döngüsünü etkileyen önemli faktörlerden biridir (22, 23). Kemik rezorpsiyonunu stimüle edici faktörlerin (hormonlar, sitokinler gibi) osteoblastlar üzerine etkisiyle beraber osteoblastların hücre membranında RANKL sentezlenir. Osteoblastik hücreler ayrıca M-CSF'nin sentezini gerçekleştirir. RANKL ve M-CSF varlığında osteoklast öncül hücreleri membranlarında RANK ve c-Fms ifade ederler. Bu reseptörlerin etkileşimi ile (RANK/RANKL ve M-CSF/c-Fms) preosteoklastlar matür osteoklastlara diferansiye olurlar ve kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirirler (24). Öte yandan yine osteoblastlar tarafından sentezlenen osteoprotegerin (OPG), RANKL için yalancı reseptör görevi görerek RANK/RANKL bağlanmasını engeller ve böylece osteoklastik aktiviteyi inhibe etmiş olur (Şekil 1a ve b). Yapılan çalışmalar sonucunda OPG/RANKL oranının kemik kütleini belirleyen esas faktör olduğu görülmüştür (24, 25).



Şekil 1a. Osteoklastik diferansiyasyon yolları.



Şekil 1b. OPG mediatörünün yalancı reseptör görevi görerek osteoklastik aktiviteyi baskılaması.

2.1.2. Kemik Matriksi

Kemik matriksi organik (%35) ve inorganik (%65) olmak üzere 2 bileşenden oluşmaktadır (18). Organik kısım; kollajen lifler (tip I ve tip V), glikozaminoglikanlar (kondroitin/keratan sülfat ve HA) ve glikoproteinlerden (osteonektin, osteokalsin) oluşmaktadır (18). Organik matriks kemiğe elastikiyet kazandırır. Gelişmiş bir kemik dokusunda kollajen lifler ara madde içinde birbirine paralel ve aralarında porlar olacak şekilde sıralı halde bulunurlar.

Kemik matriksinin inorganik kısmını ise başta kalsiyum fosfat (%85) olmak üzere kalsiyum karbonat, kalsiyum florit, magnezyum florit, magnezyum hidroksit, magnezyum sülfat bileşikleri ile sitrat ve karbonat iyonları oluşturur (18). Kalsiyum ve fosfat mineralleri hidroksiapatit (Ha) kristallerini oluşturur. Bu kristaller kollajen fibriller üzerinde küçük tabakalar veya çubukçuklar halinde birikir. Ha kristalleri ile kollajen fibrillerin bu şekilde organize olması kemiğe sertlik özelliğinin yanısıra dayanıklılık özelliğini de kazandırır. Ha kristallerinin yüzeyi hidrate olmuş bir tabakaya sahiptir (17). Bu tabakaya hidrasyon tabakası adı verilir. Vücut sıvıları ile matriks arasındaki iyon değişimi bu tabaka ile sağlanır. Kalsiyum fosfatın kemik matriksi üzerine çöküp Ha kristallerinin oluşum mekanizmasını açıklayabilen ortak bir görüş yoktur. Kalsifikasyonun, kalsiyum tuzlarının kollajen fibriller üzerinde birikmesi ile başladığı bilinmektedir. Bunu proteoglikanlar ve kalsiyum bağlamada yüksek affinitesi olan osteopontin (OPN) gibi glikoproteinler başlatır (16, 22, 23). Biriken kalsiyum tuzları osteoblastik aktivite ile ESM'de yoğunlaşır. Osteoblastlar tarafından üretilen ALP'nin de bu işlemi hızlandırdığı düşünülmektedir (16).

Kemik dokusunun organik bölümü arındırılırsa kırılgan bir hale gelir; inorganik kısmı çıkarıldığı zaman ise minerallerinden yoksun olan kemik sertliğini yitirir çabuk şekil değiştirebilen bir hal alır. Kemiğin işlevini görebilmesi için inorganik ve organik kısımların oranlarını koruyacak şekilde devamlılığının sağlanması gerekmektedir.

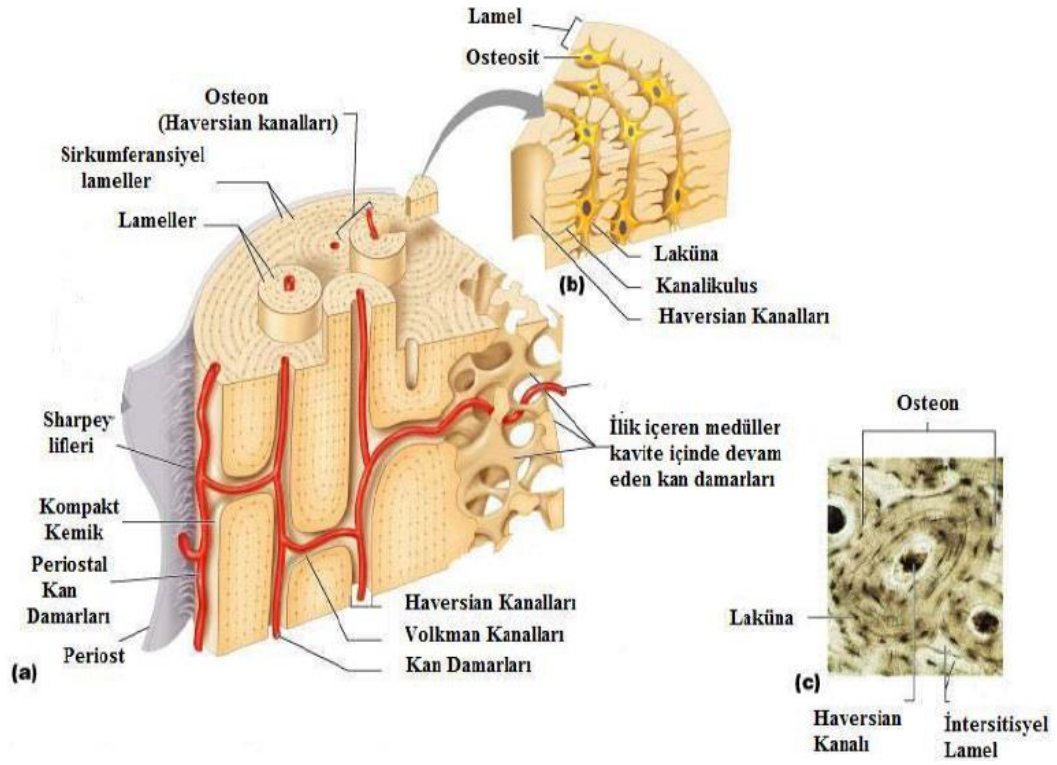
Kemik dokusunun matriksi sert olduğu için diffüzyona izin vermez; beslenme kanalları aracılığı ile olmaktadır. Kompakt kemikte enine alınan kesitlerde bu kanal sisteminin düzenli olarak yerleşmiş halkalar şeklinde olduğu görülmektedir. Bu halkalar 3-7 µm kalınlığında ve genelde kemik kanalı (Havers kanalı) etrafında

olacak şekilde düzenli dairesel bir yapı oluşturur. Bu dairesel yapılar; Havers lamelleri, periost altındaki dış esas lameller (dış lameller), endosteum etrafındaki iç esas lameller (iç lameller) ve ara lamellerdir (intersitisyel lameller). Kemik dokusunun en iç tabakasından en dış tabakasına kadar besin aktarımının sağlanması bu lameller ile olmaktadır (16).

Havers lamelleri; 20-100 µm çapında olan ve vasküler yapı içeren Havers kanalı etrafında iç içe geçmiş dairesel yapılardan oluşur. Vasküler yapı genelde kapiller, postkapiller venül veya nadiren arteriol olabilir. Etrafında lameller, hücreler ve matriks bulunur. Osteositlerin kanaliküller içinde yapmış olduğu uzantılar sayesinde Havers sisteminin en iç lameli ile en dış lameli arasında bağlantı kurulur. Lamellerin sayısı 4 ile 20 arasında değişmektedir. Bir Havers kanalı ile etrafındaki lamellerin tümüne osteon adı verilir. Havers kanalları kompakt kemikte kemiğin uzun eksenine paralel bulunur. Volkmann kanalları ise kemiğin uzun eksenine dik olan kanallardır. Kemik iliği ile periosteum arasındaki iletişim Volkmann kanalları sayesinde sağlanır (15, 18).

Havers sistemleri arasında farklı büyüklükte ve düzensiz şekilli lameller bulunmaktadır (18). Bu sisteme intersitisyel lamel sistemi denilmektedir. Bu iki sistem yapıştırıcı çizgi denilen keskin bir hat ile birbirinden ayrılır. Kompakt kemikler en dış tabakadan en iç tabakaya kadar dış ve iç lameller ile çevrilmiştir (18).

Kemik dokusunun beslenmesini gerçekleştiren bu kanal sistemi kemik dokularında farklı düzenlerde görülmektedir (Şekil 2).



Kaya (2013)'den izin alınarak kullanılmıştır (4).

Şekil 2. Kemiğin histolojik yapısı.

2.1.3. Kemiği Saran Yapılar

2.1.3.1. Periosteum

Eklem yüzeyleri hariç bütün kemikleri dıştan çevreleyen bağ dokusudur. Yapısında bol miktarda fibroblast, kan ve lenf damarları, duyu sinirleri, elastik ve kollajen lifler bulunmaktadır (16, 18). Sharpey lifleri ile dış esas lameller ve ara lamellere kadar dikey ve yatay şekilde uzanarak kemiğe bağlanırlar (18). Periost, dış ve iç olmak üzere 2 tabakadan oluşmaktadır. Dış tabaka daha çok bağ dokusu yapısındadır. İçerdiği kan ve lenf damarları ile kemiğin beslenmesini ve gelişimini sağlamaktadır. Kan damarları kemik kanallarında devam ederek kemik dokusunun tüm alanlarına ulaşır. Duyu sinirleri de kan damarları ile beraber seyrederek endosteum, kemik iliği boşluğu ve epifiz bölgelerinde sonlanır (17). İç tabaka ise hücre bakımından zengindir. Yapısında bulunan hücreler kemik tamiri gibi durumlarda osteoblastlara dönüşerek fonksiyon görürler; ancak bunun dışında aktif değildirler (15).

2.1.3.2. Endosteum

Bu tabaka kemik iliği kavitesi ve kompakt kemiklerdeki kanal sistemini çevrelemektedir. Kemik iliği dokusunun devamı olup retiküler bağ dokusundan oluşmuştur (18). Hem hematopoetik hücreleri hem de kemik doku hücrelerini üretebilmektedir (15).

2.1.4. Kemik Histogenezi

Embriyogenik olarak intramembranöz ve kondral olmak üzere iki tür kemikleşme vardır. Kemik dokusu aktif bir doku olduğu için yapımı ve yıkımı sadece büyüme gelişme evresindeki bireylerde değil yetişkin bireylerde de hızını azaltarak hayat boyu devam eder.

2.1.4.1. İnamembranöz Kemikleşme

Mezenşimal doku içinde oluşan kemikleşmeye denilmektedir. Frontal, temporal, oksipital ve parietal kemikler ile mandibulanın koronoid proçes ve simfiz dışındaki bölgeleri ve maksillanın bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile oluşur. Vücuttaki kısa kemiklerin büyümesi uzun kemiklerin ise kalınlaşması yine bu kemikleşme ile gerçekleşir (16, 26).

Kemikleşme mezenşimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşması ile başlar. Yeni kemik matriksinin oluşup kalsifikasyonun tamamlanmasından sonra osteoblastların bir kısmı osteositlere dönüşür. Mezenşimal doku yoğunlaşmaları ile kemikleşmenin başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denir (16). Gelişmekte olan bu kemik adacıklarına spikül adı verilir (16). Spiküller içlerinde kapillerler, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreler bulunduran kaviteler ile birleşerek spongioz kemik yapısını oluşturur (16). Birden fazla kemikleşme merkezi bu şekilde birleşerek spongioz kemiği meydana getirirler. Çeşitli kemikleşme merkezleri radial alanda büyüyerek başlangıçtaki bağ dokusunun yerini alır (16). Bebeklerdeki bingıldak diye bilinen kafatasındaki yumuşak bölge bunun tipik örneğidir. Spongioz kemiğin bulunacağı bölgelerde trabeküller yapı daha fazla devam etmez ve damarlı bağ dokusu da yavaş yavaş yerini hematopoetik dokuya

bırakır. Kalsifikasyona katılmayan çevre mezenşimal doku ise periosteum ve endosteuma dönüşür (18).

2.1.4.2. Kondral Kemikleşme

Kısa ve uzun kemikler kondral kemikleşme ile şekillenir. Perikondral ve enkondral olmak üzere birbirini tamamlayan iki tipi vardır (15).

2.1.4.2.1. Perikondral Kemikleşme

Bu tür kemikleşme kıkırdağı saran mezenşim kaynaklı hücrelerin osteoblastlara dönüşümü ile başlar. Osteoblastlar ara maddeyi salgılayarak osteositlere dönüşürler. Ara maddenin sentezinden sonra kalsifikasyon başlar. Uzun kemiklerde diafizden ortasından başlayarak uçlara doğru gelişen kıkırdağı çevreleyen bir perikondral kemik dokusu oluşur. Bu yolla kemiğin enine büyümesi gerçekleşir (15).

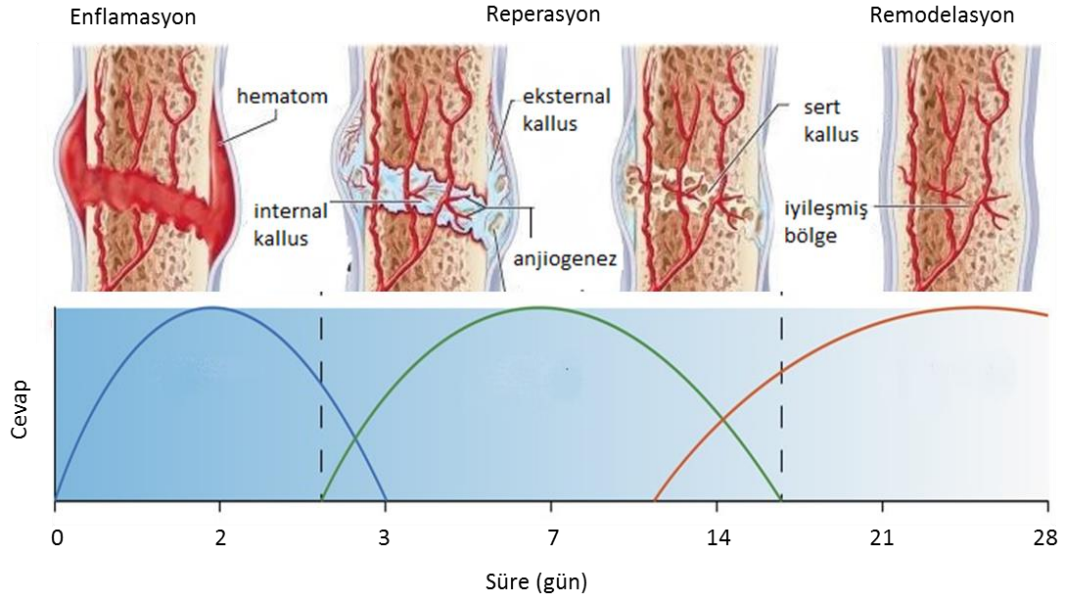
2.1.4.2.2. Enkondral Kemikleşme

Enkondral kemikleşme; kemiğin hyalin kıkırdaktan oluşmuş küçük bir model etrafında oluşmasıdır. Kısa ve uzun kemiklerin şekillenmesi enkondral kemikleşme ile gerçekleşmektedir. Kıkırdak hücrelerinde görülen farklılaşmalar sonucunda doku zonlara ayrılmaktadır. Dinlenme zonu; morfolojik değişim göstermeyen kıkırdak hücrelerinin bulunduğu zondur. Büyümüş ve sitoplazmalarında glikojen birikmiş olan kıkırdak hücrelerinin bulunduğu zon ise hipertrofi zonedir. Hücrelerin artık yavaş yavaş dejenere olmaya başlayarak ortama kalsiyum iyonlarının çöktüğü zon ise kalsifikasyon zonu olarak adlandırılır (15). Periosttan gelen osteoprogenitör hücreler ve kan kapillerinden oluşan osteojenik tomurcuk, dejenere olmuş kondrositlerden kalan boş lakünelara yerleşir. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşür ve kıkırdak yapıdaki septumları matriks için destek yapı olarak kullanır (16).

2.1.5. Kemik İyileşmesi

Kemik dokusunun anatomik bütünlüğünün bozulması sonucunda elektriksel, kimyasal ve mekanik bir dizi karmaşık mekanizma ile kemik iyileşmesi gerçekleşir. Gerekli mekanizma aktivasyonu muhtemelen elektriksel akım ile başlar ve bu akım kemik bütünlüğü bozulduğu ilk zamanlar çok yüksek olup 2-3 hafta içinde yavaş yavaş azalır (16).

Kemik iyileşmesi 3 evreden oluşmaktadır (Şekil 3). Her evrede hücrelerin görevleri, ESM bileşenlerinin oranı ve pH farklıdır. Histolojik olarak iyileşme evrelerinin birbirinden kesin sınırlarla ayrılması mümkün değildir (27). Aşağıda kemik iyileşmesi evreleri kırık iyileşmesi örneğiyle sunulmuştur.



Şekil 3. Kırık iyileşme evrelerinin zamana dağılımı.

2.1.5.1. Enflamasyon (Yangı) Evresi

Yumuşak doku yaralanmalarında olduğu gibi kemik dokusunda da iyileşme enflamasyon evresi ile başlar. Bu evre yaklaşık 3-4 günlük süreyi kapsar. Bölgede oluşan yaralanmanın şiddetine bağlı olarak; çevre yumuşak dokular, periost, kan ve lenf damarları yaralanabilir. Kırık oluşuktan sonra damarlarda kısa süreliğine vazokonstriksiyon ve ardından mast hücrelerinin histamin salgılaması sonucu vazodilatasyon gelişir. Kırık uçları arasında kan ve lenf sıvısı birikir ve hematoma

oluşur (16). Vasküler endotelial hasarın oluşması bölgede platelet agregasyonuna ve vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEBF) salgılanmasına neden olur (5). Bölgede oluşan hematoma iyileşme için önemli bir faktördür. Yapmış olduğu basınç ile kırık uçlarının stabilizasyonunda rol alırken trombosit ve makrofajları yapısında bulundurur. Bu hücreler bir takım mediatörleri salgılayarak iyileşme için gereken mekanizmayı başlatmış olur (16). Hematom 48 saat sonra organize olur. Fibrinojen; gama globulin, albumin, lizin ve fenilalanin ile fibrin ağına dönüşür. Oluşan fibrin ağı içerdiği periosteum ve endosteum kaynaklı öncül hücreler ve oluşturduğu çatı sayesinde iyileşme için önemli bir faktördür (28). Monosit ve makrofajlar için kemotaktik ajan görevi gören faktörlerden birisi de ESM'dir. İyileşmenin erken safhalarında yara bölgesinin oksijenizasyonu azdır ve ortam asidiktir. Bu ortam polimorf nüveli lökositlerin (PNL) ve makrofajların fonksiyon görmesi için gayet uygundur. Evreler ilerledikçe pH ve diğer özellikler de değişecektir (5, 29). Makrofajlar sadece bakteriel fagositoz yapmaz, ilerleyen evrelerde, interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrotizan faktör (TNF) gibi mediatörlerin salgılanmasını ve kallusun oluşumunu sağlar (30). Bu mediatörler akut faz proteinlerinin salgılanmasını, lökosit göçünü ve fibroblastların kollajen sentezini artırır.

Kırık uçları arasında anastomoz bozulduğu için bu bölgede dolaşım bozulur ve nekrotik alanlar oluşur. Osteositler bölgede lizise uğrar. Hem kırık uçlarında görülen nekrotik alanlar hem de bölgeye salınan prostoglandin, enflamatuar yanıtın başlamasında önemli rol oynar. Yeni oluşan vasküler sistem, VEBF ile geçici bağlantılar kurar ve bu yönden periosteum kaynaklı arterlerden farklıdır. Proteinlerin, granülositlerin, mast hücrelerinin ve lenfositlerin ekstravasküler boşluğa geçişine izin verecek yapıdadır. Bu kapiller fibroblastların beslenerek ara maddeyi ve kollajeni oluşturmasına yardımcı olur. Kemik yapımı devam ederken diğer yandan da osteoklastlar nekrotik kemiği rezorbe eder. İyileşmenin 2. ve 3. günlerinde endosteum ve periosteumdan gelen osteoblastların ve kondroblastların sayısında ani bir artış olur ve sonraki evrelerde osteogenezis başlar (16).

2.1.5.2. Reperasyon (Onarım) Evresi

Reperasyon evresi kemik iyileşme evresinin en önemli aşamasıdır. Kırık oluştuktan sonraki saatlerde başlasa da kendini 7-12 gün sonra belli eder (16). Kırık iyileşmesinde periosteal damarlar kılcal damarların tomurcuklanmasına yardımcı olur. Ancak hücrelerin çoğalması ile kan damarlarının proliferasyonu aynı hızda gerçekleşmez. Kırık uçlarına yakın olan bölgelerde kan damarları ve osteojenik hücreler yoğun olarak bulunur. Kırık uçlarından uzaklaştıkça vaskülerizasyon azalır ve kondroblastlar görülmeye başlar. Granülasyon dokusu, kırığı takiben devam eden 3-5 gün içinde oluşur. Kollajenler; dönüştürücü büyüme faktörü ve KMP gibi faktörlerin alt tabakada muhafaza olmasını sağlayarak bu faktörlerin hücre diferansiyasyonunda görev almasına yardımcı olurlar. Hücrelerin dereceli olarak diferansiyasyonu, salgıladıkları maddelerin birikimi ve ESM oluşumu ile kallus formasyonu başlar. Kallusun görevi kırık bölgesinin stabilizasyonunu sağlamaktır. Kallus önce yumuşaktır ve radyografide görülmez. Ancak daha sonra osteoid üretimi ve mineralizasyonun başlaması ile sert kallusa dönüşür (27). Damar endoteli ve kırık dokusu negatif yüklüdür. Bu durum anjiogenezisi engeller. Kalsiyum iyonu ise bölgenin yükünü değiştirerek anjiogenezisi başlatır. Sert kallus için vaskülerizasyon; vaskülerizasyon için ise osteoidin mineralizasyonu şarttır (28).

Kırık dokunun olduğu bölgelerdeki kondrositler hipertrofik kondrositlere dönüşür ve kırık dokusu salgılanması başlar. Kırık dokusu kalsifiye olduğu zaman kondrositler beslenemezler ve ölürlür. Boş kalan lakünalar içinde vasküler gelişim başlar. Kalsifikasyon olmadan vaskülerizasyon olmaz. Kemik hücreleri vaskülerizasyon ile beraber bölgeye göç etmeye başlar. İç ve dış kallus oluşumu ile kemik uçları çok daha stabil bir hal alır. Sert kallus oluşması, kırık bölgesinde iyileşmenin büyük oranda gerçekleştiği anlamına gelir (16).

2.1.5.3. Remodelasyon (Yeniden Şekillenme) Evresi

Remodelasyon evresi kemik iyileşmesinin en uzun evresidir. Onarım evresinin ortalarında başlayıp 4-16 hafta kadar sürmekle beraber kimi zaman yıllarca devam edebilir. Kemik dokunun yeniden şekillenmesi Wolff kanununa göredir;

kemiğin işlevsel (mekanik) durumundaki değişikler yapısal değişikliklere yol açar. Kallus, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşan lameller kemik ile yer değiştirir. Bu değişimler ile güçlü ama düzensiz olan kallus yerini düzenli lameller kemiğe bırakır. Kırık çevresinde gelişen fazla kemik doku rezorbe olur ve medullar kanallar açılır. Mekanik strese maruz kalan kısımda osteoklastik aktivite, diğer tarafta osteoblastik aktivite baskındır (16).

2.1.6. Kemik Organizasyonu

Birincil kemik dokusu (olgunlaşmamış kemik dokusu, ağsı kemik), embriyojenik gelişim sürecinde ve kemik tamiri aşamasında (kemikleşme türü ne olursa olsun) oluşan kemik türüdür. Kollajen fibriller matriks içinde dağılarak ağsı bir görünüm oluşturur. İkincil kemik dokusuna göre mineral oranı daha düşüktür, osteosit hücrelerinin ve glikozaminoglikanların yoğunluğu daha fazladır (17, 18). Yetişkinlerde yassı kemiklerin eklem bölgeleri, alveoler kemik ve tendonların kemik ile bağlandığı yerler dışında yerini zamanla ikincil kemik dokusuna bırakmaktadır (18).

İkincil kemik dokusu (olgun kemik dokusu), birincil kemik dokusu oluştuktan sonra zamanla bu dokunun yerini alır. İkincil kemik dokusundaki kollajen lifler, birincil kemik dokusunun aksine birbirine paralel ve vasküler bir kanal etrafında dairesel halde dizilerek kendine özgü lameller sistemini oluşturur (17). Bu kemik dokusunda, Havers ve Volkmann kanallarından oluşan düzenli lamel sistemi görülür. Bununla beraber daha az sayıda hücre lameller sistemi üzerinde yer alır. Uzun, kısa, yassı ve düzensiz şekillerde olabilen ikincil kemikler, süngerimsi ve kompakt olmak üzere iki tür kemik dokusu içermektedir (18).

2.1.6.1 Süngerimsi Kemik

Süngerimsi kemik (spongios kemik), kısa ve uzun kemiklerin epifiz ve metafizi ile yassı kemiklerin iç kısımlarında yer almaktadır. Birbiri ile bağlantılı olan trabeküller ve bu trabeküllerin arasındaki düzensiz boşluklar ile peteksi bir görünüme sahiptir. Trabeküller içinde yer alan kemik lamelleri birbirine paralel yerleşmişlerdir. Boşluklarda ise kemik iliği bulunmaktadır. Bu kemik türünde, Havers ve Volkmann

kanalları olmadığı için beslenme kemik iliğindeki damarların kanaliküllerle yaptığı bağlantı ile gerçekleşmektedir (18).

2.1.6.2. Kompakt Kemik

Vücuttaki bütün kemiklerin dış yüzeyleri, uzun kemiklerin diafizi kompakt kemik ile kaplıdır. Bu kemik türü her zaman olgun kemik yapısındadır. Makroskobik görüntüsü homojen ve dolgun olan bu kemik türünün mikroskobik olarak da düzenli lamel ve kanal sistemine sahip olduğu görülmektedir. Havers sistemi kompakt kemiğin karakteristik yapısını oluşturur ve bu sistem sayesinde metabolik fonksiyonlar devam eder (18).

2.2. Kemik Greftleri

Kemik greftleri, doku ve organların kazanılmış veya konjenital deformitelerinin rekonstrüksiyonunda yer tutucu özelliği olan ve kemik yapımını uyarıcı materyallerdir (31). Greft materyalleri otogreft, allogreft, xenogreft ve alloplastlar olmak üzere immünojenik orijinlerine göre sınıflandırılırlar (32). Kemik greftleri çene cerrahisinde travma ve enfeksiyon sonucu gelişen kist, tümör gibi patolojilerin cerrahi olarak çıkarılması sonucu oluşan defektlerin tamiri, konjenital anomalilerin rekonstrüksiyonu, preprotetik cerrahi gibi alanları kapsayan geniş bir yelpazede kullanılır (33).

2.2.1. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması

2.2.1.1. Otojen Greftler

Aynı bireyde bir yerden başka bir yere nakledilen greft tipidir. Otolog veya otogreft olarak da adlandırılır. Kortikal, kansellöz ve kortikokansellöz, olmak üzere 3 şekilde elde edilebilir (34). Kortikal greftler mekanik olarak dayanıklıdır ve bu nedenle yükün geldiği alanlarda daha çok tercih edilir (35). Kansellöz greftler ise kortikal greftlere göre daha çabuk vaskülarize olur ancak kortikal greftler kadar mekanik olarak dayanıklı değildir (36, 37). Kortikokansellöz greftler ise hem kortikal

hem kansellöz greftlerin özelliklerini tamamen olmasa da belirli oranlarda taşımaktadır (33). Otojen greftler intraoral olarak simfiz, ramusun ön kenarı, maksiller tüber bölgesi, korpus, koronoid çıkıntı, alveolar kret, zigomatik kemik ve toruslardan; ekstraoral olarak da iliak kret, kosta, tibia, femur ve kalvaryumdan elde edilebilmektedir. Osteojenik etkiye sahip olan tek greft materyali olması ve immünojenik yanıt göstermemesi otojen greftleri altın standart yapmaktadır ancak postoperatif dönemde ağrı, donör sahanın bulunduğu yere göre gelişebilen çeşitli komplikasyonlar, ikinci bir cerrahi saha oluşması ve sınırlı miktarda elde edilmesi otojen greftlerin dezavantajlarıdır (38).

2.2.1.2. Allogreftler

Allogreftler aynı türden ancak genetik olarak farklı bireyler arasında uygulanan greft materyalleridir. Tek yumurta ikizlerinden elde edilen greftlere ise izogreft denilmektedir. Allogreft yaşayan insanlardan veya kadavralardan elde edilir (39). Allogreftlerin hazırlanması ve sterilizasyonu ile immünojenik yanıt riski azalırken greftin osteoindüktif, osteokondüktif ve mekanik özellikleri de etkilenir (40). Hazırlanma yöntemlerine göre dondurulmuş kemik (DK), dondurulmuş-kurutulmuş kemik (DKK) ve demineralize dondurulmuş-kurutulmuş kemik (DDKK) olmak üzere 3 gruba ayrılır.

DK, antibiyotik içeren solüsyonlarla yıkandıktan sonra -70°C'de dondurularak elde edilir. Bu işlemler ile immünojenik etkileri azalır ancak tamamen ortadan kalkmaz (41). Osteoindüktif proteinler büyük oranda korunduğu için osteoindüksiyon özellik gösterir ancak hastalık riski taşıdığı ve antijenik özelliklerinin eliminasyonu tam olmadığı için nadiren kullanılır (39-41).

DKK, antibiyotik içeren solüsyonlarla yıkanarak -70°C de dondurulmuş olan kemiğe liyofilizasyon işleminin uygulanması ile oluşur. Bu işlemler sonucunda greftin immünojenik yanıt oluşturma ihtimali çok aza indirilir ancak osteoindüktif proteinler harap olduğu için greft osteoindüksiyon özelliği göstermez sadece osteokondüktif olarak etki gösterir ayrıca su miktarı büyük oranda azaldığı için mekanik dayanıklılığı azalır (41).

DDKK, demineralize kemik matriksi olarak da bilinir ve standardize edilmiş bir dizi işlemle geçerek kullanılabilir hale gelir. Hidroklorik asit içinde 3 saat boyunca demineralize edilip daha sonra sırayla ısı, yağdan arındırıcı ajan, gama ışınları ve etilen oksite tabii tutularak sterilizasyon işlemi tamamlanır. DDKK'nın bazı yayınlarda sadece osteokondüktif özelliğinin olduğu belirtilse de günümüzde geçerli olan fikir kollajen, nonkollajen protein ve az miktarda büyüme faktörlerini içerdiği için osteoindüktif etkisinin de olduğudur (41, 42).

Allogreftlerin ikinci bir cerrahi alan ihtiyacını azaltması, istendiği formlarda (partikül greft veya blok greft) ve miktarda elde edilmesi gibi avantajları varken, maliyetli olması ve osteoindüksiyon etkisinin otojen grefte göre çok daha az olması da dezavantajları olarak gösterilebilir (29).

2.2.1.3. Xenogreftler

Farklı türden canlılar arasında nakledilen greft materyallerine verilen isimdir. Heterojen greftler olarak da bilinen bu greftler memeli kemiklerinden veya mercan dış iskeletinden elde edilebilmektedir. Bu grupta en çok tercih edilen greft materyali sığır kaynaklı greft materyalidir. Yapılan bir seri işlemle sığır kemiklerinin organik kısmı kaldırılıp sadece inorganik kısmı bırakılır. Kemiğin inorganik komponentinin oluşturduğu poröz yapı sadece osteokondüktif özellik gösterir (43).

Mercan kaynaklı greftler ise mercanın kalsiyum karbonattan oluşan dış kabuğunun gamma radyasyon ile steril edilmesi sonucu kullanılabilir hale gelir. Yapısında kalsiyum, fosfor ve karbonat bulundurulur. Porlu bir yapıya sahip olan bu greft türü osteokondüktif özellik gösterir (43). Rezorpsiyonunun 1-2 yıl sürmesi greftin dezavantajıdır.

2.2.1.4. Alloplastlar

Tamamen sentetik olarak üretilen ve kemik rekonstrüksiyonunda diğer greft materyallerine alternatif olarak kullanılan bu materyallerin biyouyumlu olma, mekanik sağlamlığa ve esnekliğe sahip olma, işlem sırasında kolay şekillendirilebilme, bozulmayan ve reaktif olmayan yüzeye sahip olma gibi

özellikleri bulunmalıdır (33). Günümüzde kullanılan ve bu özelliklerin birçoğuna sahip olan bu materyaller oluşturuldukları bileşenlere göre sınıflandırılır.

2.2.1.4.1. Seramikler

2.2.1.4.1.1. Ha

Bir kalsiyum fosfat birleşeni olan bu greft materyali, çeşitli kıvam ve şekilde üretilmektedir (39, 44). Mercanın, kalsiyum karbonat içeren dış iskeletin ısı ile kalsiyum hidroksiapatite dönüşümü sonucu elde edilir. Mercan kaynaklı xenogreft ile içerik olarak benzerlik göstermekle beraber kalsiyum ve fosfat bileşenlerinin oranları farklıdır (33). İnternal gözenek çapı ve uygulanacağı alan kullanılacak Ha için değerlendirilen ana kriterlerdir (35). Yapılan çalışmalar Ha'nın kansellöz otogreftte göre mekanik olarak 2 kat daha dayanıklı olduğunu göstermiştir (35, 44). Ha'nın osteokondüktif özelliğinin yanısıra KMP'e bağlanma kapasitesinin yüksek olması yapılan çalışmalarla desteklemiştir (44). Yüksek derecede kristalize Ha (mercan kaynaklı) in vivo olarak stabildir ve yılda %5-10 oranında rezorbe olur. Rezorbsiyonunun çok uzun süre alması sebebiyle trikalsiyum fosfat (TKF) ile karışımı olan birleşimleri kullanılmaya başlanmıştır.

2.2.1.4.1.2. TKF

TKF bir kalsiyum fosfat formudur ve daha çok β -TKF şeklinde kullanılır. Partikül halinde olan TKF, basınç altında sıkıştırılarak elde edilir ve bu sebeple hızlı rezorbe olur. Macun, partikül, blok ve enjekte edilebilen formları mevcuttur (35, 44). Enjekte edilebilen çimento formları kısa zamanda sertleşmesine rağmen ısı açığa çıkarmaz. Bu materyaller yük taşımayan defektlerde tercih edilir (44). TKF, kortikospongios kemikle karıştırılarak tümör eksizyonunun ve kemik defektlerinin tamirinde kullanılır. Osteokondüktif özellik gösteren bu materyalin Ha'ya göre nispeten daha küçük grenli olması ve çok hızlı (1-2 ay içinde) rezorbe olması dezavantaj oluşturur (44).

2.2.1.4.1.3. Biyoaktif Camlar

Silikon dioksit, kalsiyum dioksit, disodyum oksit ve pirofosfat bileşiklerinin çeşitli oranlarda birleşimi ile oluşur. Partikül, blok, diş kökü ve çubuk şeklinde formları vardır. Biyoaktif cam rezorbe olan ve olmayan şekillerde bulunabilir. Yapısal destek bakımından Ha'dan daha dayanıklıdır. Kollajen, büyüme faktörleri ve fibrine bağlanarak osteojenik hücrelerin ilerlemesini sağlayan poröz bir matriks oluşturur (45, 46). Hayvan çalışmaları sonucunda bioaktif camın osteokondüktif özelliğinin yanı sıra osteoindüktif özellik de gösterebileceği rapor edilmiştir. Periodontal defektlerde ve diş kaybı sonrası alveol kret korunması amacıyla (özellikle kök formu verilmiş formları) kullanılabilir (44).

2.2.1.4.2. Kalsiyum Karbonat

Mercan kaynaklı olan bu materyalin rezorbsiyonu yavaştır. Kalsiyum karbonat, iyi derecede hemostatik özelliğe sahiptir, ilgili alandan kolay uzaklaşmaz ancak stres altında yapısı değişebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda diğer alloplastik materyallerle kıyaslandığında kemik yapımının bu materyallerde daha fazla olduğu belirtilmiştir (35).

2.2.1.4.3. Kompozit Kopolimer

Polimerler doğaları gereği sayısız konfigürasyonda şekillendirilebilirler. Partikül, jel, kök ve enjekte edilebilen formları vardır. Rezorbe olan (poliglikolik asit ve polilaktik asit) ve olmayan (polimetil metakrilat ve polihidroksietil metakrilat) türleri vardır. Rezorbe olabilen türleri, suture ve fiksasyon materyallerinin üretiminde de kullanılmaktadır (35, 36). Poliglikolik asit ve polilaktik asit birleşiminden oluşan bu greft materyallerinin yüksek ve düşük molekül ağırlıklı formları bulunmaktadır. molekül ağırlığı yüksek olan polimerlerin degradasyonu 3 yıl sürebilirken, bu değer molekül ağırlığı düşük olan polimerlerde yaklaşık 4-5 ay olabilmektedir. Polimerlerin degradasyonu hastanın yaşından, sistemik durumundan, defektin lokasyonundan etkilenebilmektedir (35).

2.2.1.4.4. Kalsiyum Sülfat

Paris alçısı veya Gypsum adlarıyla da bilinen kalsiyum sülfat hızlı rezorbe olur (4-12 hafta). Önemli avantajları enfeksiyon varlığında kullanılabilmesi ve ucuz olmasıdır. Biyoabsorbe olabildiği için diğer materyallere kıyasla avantajlıdır. Buna karşın, bu materyalin kullanımına bağlı allerjik reaksiyon ve enflamatuvar cevap bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (47).

Günümüzde kullanılan greft materyalleri çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Greft materyalinin tercihi bahsedilen avantaj ve dezavantajlar dikkate alınarak yapılmalıdır.

2.2.2. Kemik Greftlerinin Kabulü

Kemik greftlerinin kullanımında amaç, hedef bölgede kemik iyileşmesi için yanıt oluşturmaktır. Klinik başarı, oluşan yeni kemiğin çevre kemik dokusu ile yapısal olarak bütünleşmesi ve fonksiyon görmek için yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması ile belirlenir.

Greft materyalleri; osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon olmak üzere 3 farklı mekanizma ile kemik iyileşmesine katkıda bulunurlar.

Ostogenez, greft materyalinde bulunan hücresel elemanların alıcı bölgede kemik oluşturmaya denir (40). Otojen greftler osteojenik özellik gösteren tek greft materyalidir ancak nonvaskülerize otojen greftlerde bu özelliğin 5 gün içinde kaybolduğunu belirten çalışmalar vardır (48). Kansellöz greftler, otojen greftler arasında en çok osteogenetik etkiye sahip olan grefttir (39).

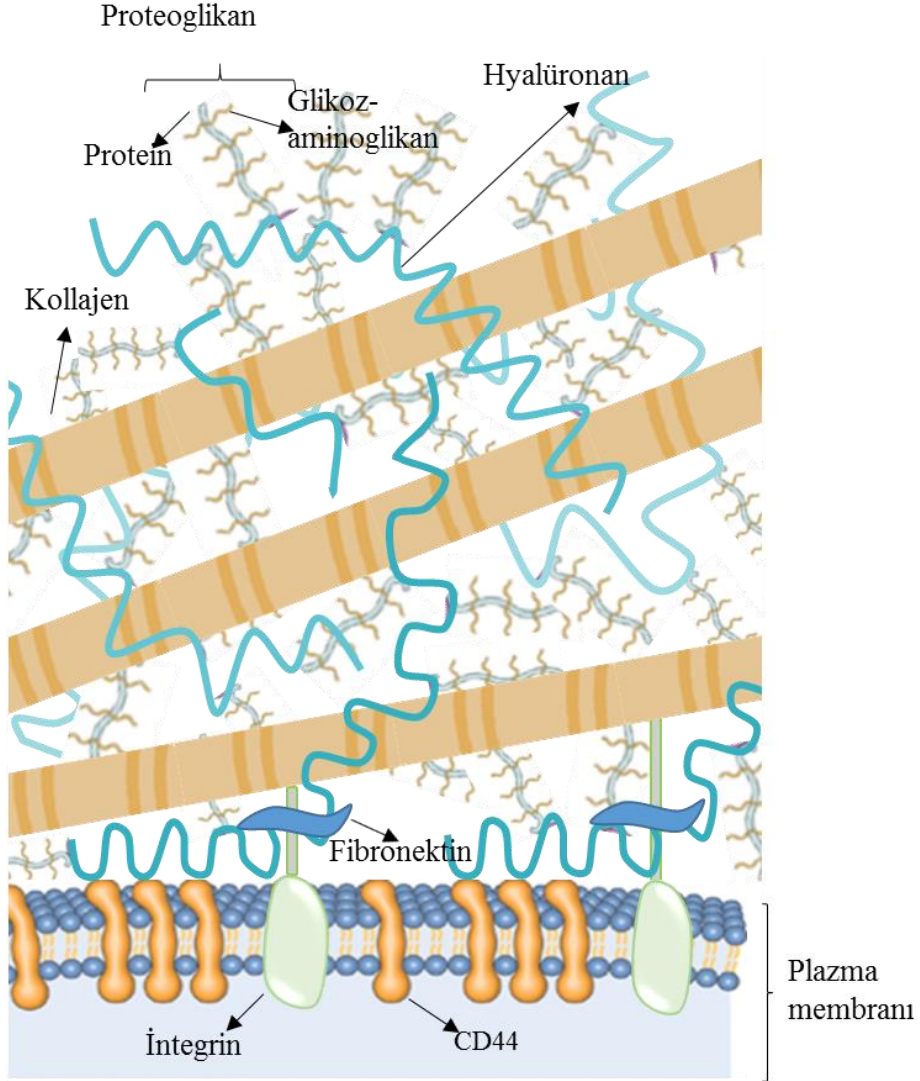
Osteoindüksiyon, greft materyalinde bulunan büyüme faktörlerinin (özellikle KMP-2 ve KMP-7) çevre dokuda pluripotent hücrelerin osteoblast veya kondroblastlara dönüşmelerini uyarmasına denir (39, 40).

Osteokondüksiyon ise alıcı bölgedeki vasküler yapıların greft materyalini iskelet olarak kullanıp içine doğru ilerlemesine denir (40). Materyallerin osteokondüktif etki gösterebilmesi için porlu yapıya sahip olması gerekmektedir (39).

2.3. HA

2.3.1. Tanım

Hücreler arası ortamı dolduran ESM temelde iki ana molekül grubundan oluşur; glikozaminoglikanlar ve kollajen, elastin, fibronektin gibi fibröz proteinler.



Şekil 4. ESM yapısı.

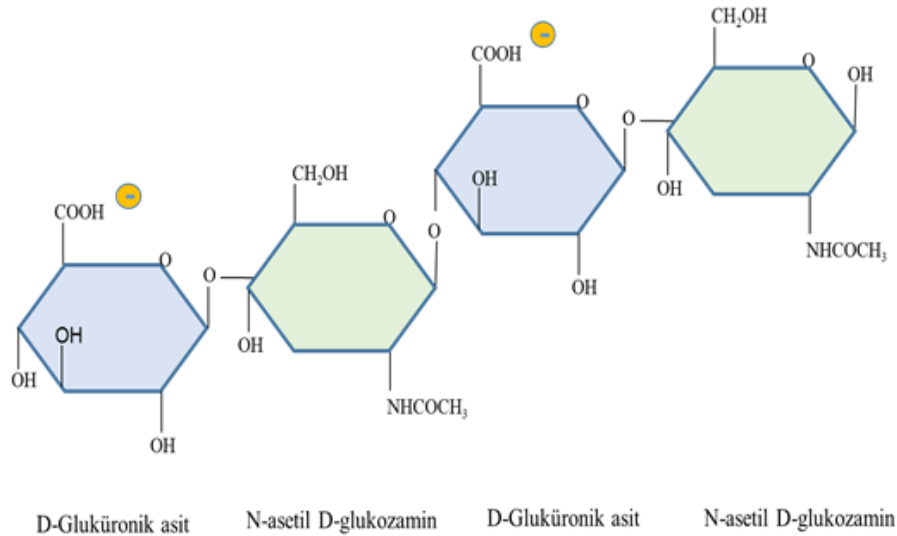
Glikozaminoglikanlar, doğrusal yönde tekrarlayan ve dallanma göstermeyen disakkarit birimlerinden oluşan kompleks polisakkarit zincirleridir. Bu tekrarlayan birimler genel olarak amino şekeri (asetilglukozamin veya asetilgalaktozamin) ile üronik şekere (glukuronik asit veya idüronik asit) veya galaktoz içerir. Her bir şeker molekülü üzerindeki sülfat veya karboksil grupları nedeniyle oldukça negatif

yüklüdürler. Negatif yük ozmotik olarak aktif kanyonları çektiği için oldukça hidrofilik özellik gösterirler.

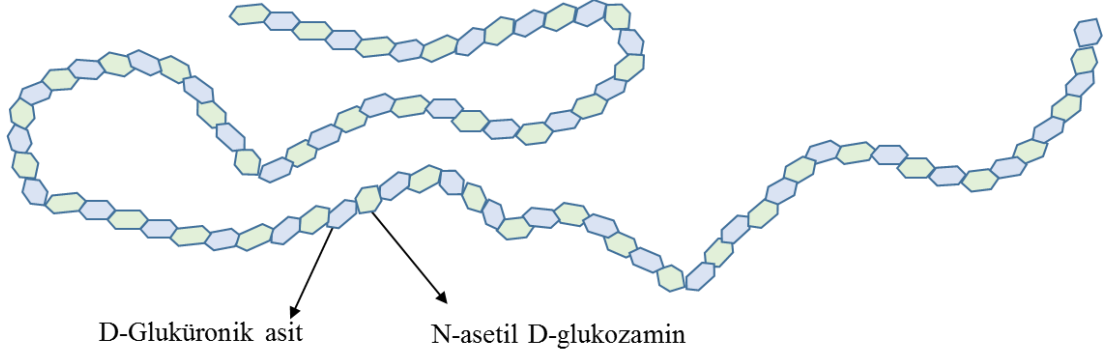
Tekrarlayan disakkaritlerin yapısına bağlı olarak glikozaminoglikan ailesi kondroitin sülfat/dermatan sülfat, heparin/heparan sülfat, keratan sülfat ve hyalüronan olmak üzere 4 gruba ayrılır (49).

Glikozaminoglikan ailesinin bir üyesi olan hyalüronan, birbirine glikozidik bağlarla bağlı olan D-N-asetilglukozamin ve D-glukuronik asit moleküllerinden oluşur (13, 50, 51). Hyalüronanın, diğer üyelerden farkları (52):

- 1) Çok uzun bir zincir yapısına sahiptir. Değişik uzunluklarda olabilen bu polimer, 25,000 kez kadar tekrar edebilen disakkarit birimi ile oldukça büyük boyutlarda bulunabilir. Çok yüksek molekül ağırlığına (10,000 kDa) sahip yapıda olabilmekle beraber dokularda en çok 2000-4000 kDa ağırlığında gözlenir. Vücutta yüksek molekül ağırlıklı (YMA) hyalüronan zinciri devamlı surette metabolize olarak düşük molekül ağırlıklı (DMA) fragmanlara (<1000 kDa) ayrılır (9, 52).
- 2) Bir protein çekirdeğe bağlanma göstermez; diğer glikozaminoglikanlar gibi proteoglikan oluşturmaz.
- 3) Diğer glikozaminoglikanlar gibi sülfat grubu içermez.



Şekil 5a. Hyalüronan moleküler yapısı.



Şekil 5b. Dağınık halde bulunan hyalüronan.

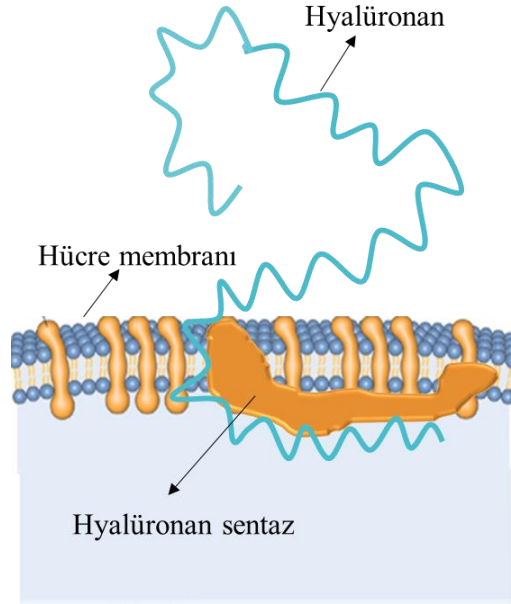
HA ismi; yunanca camısı anlamına gelen hyaloid ve yapısında bulunan üronik asit kelimelerinden türetilmiştir. İsim babası olan Karl Meyer ve John Palmer, 1934 yılında ilk olarak bu polisakkariti sığır gözünün' vitröz humor'undan izole ettiği için (vitröz=hyaloid) bu adı vermiştir (53). Takip eden yıllarda hem çeşitli ökaryot sistem yapılarında hem de prokaryot sistemlerde HA izole edilmiştir. Biyokimya literatüründe vücutta mevcut olduğu polianyonik formunu ifade etmek için 'hyalüronan' terimi tercih edilir (54). HA, sodyum tuzu olan sodyum hyalüronat adıyla ticari olarak mevcuttur. Bununla beraber genel olarak hyalüronan, sodyum hyalüronat ve HA literatürde aynı anlamı ifade etmek için kullanılır. Bu çalışmada molekülün her 3 formundan HA olarak bahsedilecektir.

2.3.2. Bulunduğu Doku ve Organlar

HA, diğer glikozaminoglikanlar ile beraber ESM'nin temel zemin maddesini oluşturur (18). Ayrıca periselüler ve intraselüler alanlarda da mevcuttur (8, 55). ESM'de, ortamda bulunan glikoproteinlere; hücre yüzeyinde ise reseptörlere bağlı halde bulunur (Şekil 4). Ortalama 70 kiloda olan bir yetişkinin vücudunda yaklaşık 15 gram HA mevcuttur (56). Tüm dokularda mevcut olan HA, vitröz humor, umbilikal kordon, dermis, sinoviyal sıvı ve kalp kapaklarında yüksek miktarda bulunmaktadır. Akciğer, böbrek, beyin, karaciğer ve kas dokularında da belli miktarda bulunur. Kan ve lenf dolaşımında ise serbest halde ve en düşük oranda görülür (56).

2.3.3. Sentezi

HA'nın sentezlenmesinde rol alan en önemli hücreler mezenşimal hücrelerdir. Fibroblastlar, kondrositler, sinoviyal hücreler ve karaciğer hücreleri başta olmak üzere vücutta hemen hemen bütün hücreler tarafından sentezlenir (7). Hücre membranının iç kısmında yer alan bir tür özelleşmiş membran proteini olan enzimler tarafından üretilir (Şekil 6). Bu enzimler hyalüronan sentaz (HAS) olarak adlandırılır. Sentezlenen HA, hücre zarındaki por benzeri yapılardan ESM'ye salınır (13, 57). HAS enzimleri HAS1, HAS2 ve HAS3 olmak üzere 3 adet enzim grubundan oluşmaktadır. HAS1 böbrek ve eklemlerde, HAS3 keratinosit hücrelerinde daha fazla bulunur. HAS2'nin ise vücutta hemen hemen her hücrede olduğu düşünülmektedir. HAS2 enzimi uzun HA zinciri (>1000 kDa) sentezleyebilirken HAS1 ve HAS3 enzimleri daha kısa zincirli (100-1000 kDa aralığında) HA sentezler (58, 59).



Şekil 6. Hyalüronan sentezi.

2.3.4. Metabolizması

HA, hyalüronidaz (HYAL) adı verilen enzimler tarafından parçalanır. HYAL enzim grubunda HYAL1, HYAL2, HYAL3, P1 ve PH20 gibi çeşitli üyeler mevcuttur (9). Her bir enzim farklı molekül ağırlığına sahip HA'nın farklı bölgelerde

yıkılmasında rol alır. Örneğin HYAL2 ekstraselüler HA yıkımından sorumlu iken HYAL1 intraselüler HA katabolizmasından sorumludur. Yine HYAL1 hem YMA HA'yı (>1000 kDa) hem DMA HA'yı (<500 kDa) parçalayabilirken, HYAL2 sadece YMA HA'nın parçalanmasını sağlar (58). HYAL enzimleri ile HA, DMA oligosakkarit birimlerine parçalanır. Tetrasakkarit seviyesinde parçalanan HA lizozomda bulunan β -glukuronidaz ve β -N-asetil-glukozaminidaz enzimleri vasıtasıyla en küçük (monosakkarit) birimine ayrılır (13). HA katabolizması anlatılan şekilde dokularda lokal enzimler tarafından gerçekleşirken, ESM'de küçük boyutlara ayrılan HA molekülünün bir kısmı ise lenfatik sistem ile drene olur. Lenf düğümlerinde metabolize olur ve oradan kan akımına geçerek karaciğerde ve böbreklerde atılımı gerçekleşir (52).

HA'nın yarılanma ömrü her organda farklılık gösterir. Dolaşımında yarılanma ömrü 2-5 dakika arasında iken, dermiste 1-2 gün, kartilaj dokusunda ise 1-2 hafta olarak belirtilmiştir. HA yarılanma ömrü ciddi kan kayıpları, septisemi, ciddi yanıklar ve major cerrahi gibi durumlarda artar (56). HA'nın ortamda uzun kalmasını gerektiren bu gibi durumlarda HYAL enzimlerinin inhibitörleri ile HA'nın parçalanması engellenmeye çalışılır. Bu inhibitörler karaciğerde sentezlenir (56).

2.3.5. Fonksiyonu

Aşırı derecede hidrofilik özelliği olan HA, su bağladıkça viskoelastik özellik kazanır ve jelimsi bir hal alır. Molekül ağırlığının bu kadar yüksek olmasına rağmen viskositeyi ve elastisiteyi aynı anda barındırması çok nadir görülen bir özelliktir. Sahip olduğu bu benzersiz reolojik özelliği moleküle lubrikasyon özelliğini de kazandırır (13). HA, bu özelliği ile su damlasına benzetilmektedir. Su damlasında olduğu gibi kısa süreli kuvvet uygulandığı zaman yapısal bütünlüğünü korur. Ancak kuvvet uzun süre uygulanırsa HA parçalarına ayrılıp tekrar birleşir (52). Bu özelliği sayesinde kuvvetlerin yıkıcı etkisini adeta 'şok emici' görevi görerek engellemektedir (58). Örneğin, embriyojenik hayatta bol miktarda görülen HA yeni gelişen dokuların mekanik kompresyondan korunmalarını sağlar (60). Vücuttaki eklemler sahip oldukları lubrikasyon ve viskoelastik özelliklerini HA sayesinde kazanırlar. Şok

emici ve lubrikasyon sağlama özelliklerinin yanı sıra HA'nın; kartilaj gelişiminde ve sinoviyal sıvının devamlılığında önemli rolü vardır (13).

HA, hacminin 1000 katı kadar su bağlama özelliği ile dermisin hacmini ve esnekliğini artırır (13, 14). ESM'nin ve periselüler ortamın yapısal bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur. Vitröz humorda ise su bağlayarak kazandığı geniş hacim ve yoğun kıvamı, alan doldurucu özelliği sağlamaktadır (9). HA'nın eksikliği özellikle yoğun ve molekül ağırlığı yüksek olarak bulunduğu dokularda, fonksiyon kaybına ve yapısal dejenerasyona neden olur.

HA aynı zamanda aktif bir sinyal moleküldür. Hücrelerin; proliferasyonu, apoptozu, migrasyonu, diferansiyasyonu ve morfogenezi için ideal ortam oluşturur. Hücrelerde migrasyon ve proliferasyon gibi fonksiyonları özel membran proteinleri veya hyaladherin olarak adlandırılan özel proteinler ile gerçekleştirir (13). Dokular arasında molekül transportunu kolaylaştırır, molekül ağırlığı yüksek olan proteinlerin dağılımını ve ozmotik basıncı dengeler (9, 52, 56). Hücre yüzeyinde yer alan bir takım reseptörler aracılığı ile hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimini sağlar, hücre içi reaksiyonları tetikleyerek fonksiyonları düzenler (61). HA için spesifik olan çeşitli hücre yüzey reseptörleri -CD44, Toll-4, hyalüronan-media motilite reseptörü (RHAMM), lenfatik damar endotelial HA reseptörü-1, endositoz için hyalüronan reseptörü, ve layilin- tanımlanmıştır. Bu reseptörler içinde en fazla tanımlanmış olanları CD44 ve RHAMM'dır.

HA, sadece hücresel davranışlarda ve ESM bütünlüğünü sağlamada değil hücrelerin korunmasında da etkili bir moleküldür. Viral ve bakteriel etkenlere karşı hücreleri adeta bir kalkan gibi sararak koruduğu gözlenmiştir (52).

YMA HA ile fragmanları (DMA HA), hücre reseptörlerine bağlanabilme kapasitelerindeki farklılıklarından dolayı çok farklı hatta tamamen zıt fonksiyonlara sahiptirler (9). Fragmanlara ayrılmamış YMA HA; alan doldurucu, apoptotik, antienflamatuar ve antianjiojenik özelliğe sahipken DMA HA; antiapoptotik, enflamatuar ve anjiojenik özelliklere sahiptir (13). En küçük HA (3-10 disakkarit birimi içeren HA) biriminin bile kendine özgü ve önemli görevleri vardır (62, 63) Disakkaritler, heat şok proteinlerini indükler ve antiapoptotik etkileri ile hücre ölümlerini baskılar (56). Molekül ağırlığı 6-20 kDa olan HA ise anjiojenik,

enflamatuar sitokinlerin salınımını stimüle etme, matriks metalloproteinaz (MMP) enzimini aktive etme, doku yaralanmalarında endotel uyarımını artırma gibi etkiye sahiptir (56).

YMA HA ve DMA HA'nın farklı fonksiyonlarının gözlemlendiği en iyi örnek yara iyileşmesidir. Yara iyileşmesinin ilk evresinde YMA HA'nın sentezinde ciddi artış görülür. YMA HA hücrelerin migrasyonunu, proliferasyonunu artırır. Fibrinojen ile yaptığı bağ sayesinde pıhtı oluşumunu destekler. İyileşmenin ilerleyen evrelerinde granülasyon dokusunun organizasyonuna yardımcı olur. Yara bölgesine PNL'nin daha hızlı ulaşabilmesini ve bölgede hızlı hareket etmesini sağlar. Bakteriostatik etkisi ile iyileşmeyi destekler. YMA HA'nın bölgede sentezlenmesini kolaylaştıran diğer bir faktör de asidik ortam pH'sıdır. Yara iyileşmesinin ilk evrelerinde HYAL2 inhibitörlerinin ortamda olması YMA HA'ya ihtiyaç duyulduğunun bir göstergesidir. İyileşmenin ilerleyen evrelerinde HYAL2 inhibitörleri ortamdaki yavaş yavaş çekilir ve YMA HA fragmanlarına ayrılmaya başlar. DMA HA; endotel hücreler, eozinofiller ve epitelyal hücrelerin gen ekspresyonunda ve makrofajların kümelenmelerinde stimüle edici olarak rol alır. Fragmanlar fibroblast proliferasyonunu ve takibinde anjiogenezisi başlatır (56). Ortamda oluşan serbest radikalleri bağlayarak adeta çöpçü görevi görür. Yara iyileşmesinin son evrelerinde özellikle yara kenarlarında HA salınım miktarı artar. Bu alanda matriks-hücre, hücre-hücre etkileşimini destekler, kollajenlerin ve keratinositlerin organize olmasını sağlar. Dicker ve ark. embriyojenik dönemde skar kalmamasının nedenini, HA'nın çok miktarda sentezlenmesi ve uzun süre ortamda muhafaza edilmesi olarak açıklamıştır (59).

HA'nın ve fragmanlarının tümör gelişiminde de önemli görevleri vardır. Sağlıklı epitel doku ile tümör gelişiminin görüldüğü epitel doku arasında HA yoğunluğu ve molekül ağırlığı açısından ciddi fark olduğu görülmüştür. Ortamda HYAL enzimlerinin artması molekülün fragmanlarının artması anlamına gelir. Bu fragmaların artması tümör gelişimini tetikler ve artmış HA fragmanlarının anjiogenez etkisi tümör metastazının gerçekleşmesinde rol alır (59).

2.3.6. Kemik Metabolizması Üzerine Etkisi

Kırık oluşumundan sonra 3-5 gün içerisinde oluşan granülasyon dokusu içinde YMA HA bol miktarda ve dağınık bir şekilde bulunur. Kırık iyileşmesi, granülasyon dokusunu takiben yumuşak kallus ve sert kallus oluşumu ile devam eder. Bu nedenle granülasyon dokusunun organizasyonu büyük önem taşır. YMA HA'nın, granülasyon dokusunun organize olmasında etkili bir faktör olduğu düşünülmektedir. Osteoprogenitör hücrelerin bulunduğu alanlarda YMA HA yoğunluğunun olması, bu hücrelerin diferansiyasyonunda ve proliferasyonunda HA'nın rolü olduğunu düşündürmektedir. Osteoprogenitör hücrelerin diferansiye olup fonksiyon görmelerinin ardından YMA HA'nın fragmanlarına ayrılıp hücre içine alındığı düşünülmektedir. Kemik iyileşmesinin ilerleyen safhalarında osteositlerin sitoplazmalarında HA fragmanlarına rastlanmıştır. Fragmanlarına ayrılarak ortamda DMA olarak bulunan HA, anjiojenik etkisi ile vaskülerizasyonda rol alır. DMA HA ayrıca bölgeye enflamatuvar hücrelerin göç etmesini sağlayan faktörlerin başında gelmektedir. Kırık iyileşme evrelerini birbirinden ayırmak mümkün değildir. Bu nedenle iyileşmenin görüldüğü farklı alanlarda aynı zaman dilimi içerisinde HA'nın ve fragmanlarının rol aldığı görülmüştür. Kemik iyileşmesi sırasında HA'nın nasıl dağılım gösterdiğini araştıran bir başka çalışmada ise fare tibiasında encondral iyileşme sırasında HA'nın hipertrofik bölgedeki lakünalarda bol miktarda görüldüğü ancak proliferasyon ve maturasyon bölgesinde bu kadar yoğun görülmediği saptanmıştır. Bu durumun nedeni olarak kondrositlerin HA sentezleyerek hidrostatik basınç oluşmasına ve lakünaların çevresinin genişlemesi gösterilebilir. Bu sayede kartilaj matriksinin oluşumunda önemli rolü olan kollajenaz ve proteaz gibi enzimlerin sentezi için uygun alan da elde edilmiş olur. HA'ya rezorbsiyon bölgesinde yer alan lakünalarda rastlanmamakla beraber bu bölgedeki osteoprogenitör hücrelerin sitoplazmalarında rastlanmıştır. HA'nın CD44 reseptörü aracılığı ile rezorbsiyon bölgesinde yer alan hücrelerce parçalandığı ve hücre içine alındığı düşünülmektedir. Rezorbsiyon bölgesinde osteoklast artışının, DMA HA'nın makrofaj hücrelerinin osteoklast hücrelerine dönüşümünü tetiklemesi sonucu olduğu düşünülmektedir (64).

HA'nın kemik metabolizması üzerine olan etkisi birçok hücre ve protein ile etkileşimi sonucu olmaktadır (13). Vücutta diğer dokularda olduğu gibi kemik dokusunda da bulunan HA; kondrosit, fibroblast, osteosit, osteoklast, osteoblast gibi hücreler ve OPN, kemik sialoproteini gibi proteinler ile etkileşime girerek fonksiyon görür ve etkisinin büyük bir kısmını CD44 reseptörü aracılığı ile gerçekleştirir. Bu reseptör; monosit, fibroblast, osteoblast, osteoklast ve osteosit gibi kemik yapımında aktif rol alan hücrelerin yüzeylerinde bulunabildiği gibi büyüme faktörleri, kollajen tip I, kollajen tip V, fibronektin, kalsitonin gibi proteinlerle de etkileşime geçebilmektedir. CD44 ve HA etkileşimi; reseptörü olduğu hücre tipine, HA'nın yoğunluğuna ve molekül ağırlığına bağlı farklılık gösterir (11, 12).

HA'nın molekül ağırlığına bağlı olarak osteoklastik aktiviteyi hem artırıcı hem azaltıcı yönde etkisi olduğu düşünülmektedir (65). YMA HA'nın, M-CSF yolağını osteoklastlar üzerinde bulunan reseptörlere bağlanarak engellediği belirtilmiştir. MCS-F yolağının engellenmesi ile RANKL yolağının aktifleşmesini sağlayan enzimlerin salınımı bloke olur. Bu sayede YMA HA'nın, osteoklastik matürasyonu engelleyerek kemik rezorbsiyonunu önlediği rapor edilmiştir (66).

HA'nın kemik rezorbsiyonunu artırıcı yöndeki etkisini osteoklastlara bağlanarak yaptığı belirtilmektedir. Osteoklastların kemik yüzeyine tutunmada OPN gibi hücre adezyonunu sağlayan proteinlerin yanı sıra HA'yı da kullandığı bildirilmiştir (55). Fuji ve ark. CD44 reseptörünün RANKL/RANK etkileşiminde önemli bir faktör olduğunu, bu reseptör ortamda olmadığı osteoklastik aktivitenin azaldığını rapor etmiştir (67, 68).

HA'nın kemik remodelasyonu üzerine olan etkisinin değerlendirildiği pek çok çalışma sonucunda, beraber kullanıldığı biyomateryaller ile hücrelerin çoğalmasında, migrasyonunda ve diferansiyasyonunda aktif rol aldığı bilinmektedir. Aslan ve ark. yaptıkları çalışmada defekt sahasında görülen iyileşmenin kemik grefti ile kombine HA kullanılan grupta, sadece kemik grefti kullanılan gruba göre daha hızlı olduğunu rapor etmiştir. HA'nın bu etkisini kemik büyüme faktörü ve kalsitonin ile olan etkileşimine bağlamışlardır (8). Suzuki ve ark. OCP granülleri ile DMA HA ve YMA HA'yı sıçan kalvaryumunda oluşturulan defekt bölgesinde beraber kullanarak kemik iyileşmesi üzerine olan etkisini karşılaştırmıştır. Kemik iyileşmesinin 3. ve 6.

haftalarında değerlendirildiği çalışmada HA ile OCP granüllerinin beraber kullanıldığı grupta görülen kemik iyileşmesi, sadece OCP granüllerinin kullanıldığı gruba göre hem 3. hem de 6. haftalarda daha fazla bulunmuştur. DMA HA'nın hızlı rezorbe olarak, iyileşmenin 3. haftasında OCP granülleri etrafında oluşan kemik dokusuna yerini bıraktığı; YMA HA'nın ise kısmen rezorbe olup OCP granülleri ile beraber yeni oluşan kemik için zemin maddesi görevi gördüğü belirtilmiştir (63).

2.3.7. Biyomedikal Preparatları ve Tıbbi Kullanımları

HA, 1970-1980'li yıllarda göz cerrahisinde uygulanmak üzere 'Healon' adıyla piyasaya sürülmüştür. O tarihten günümüze ortopedi, dermatoloji, kardiovasküler cerrahi ve kanser teşhisi gibi tıbbın değişik alanlarında yararlanan bir biyomedikal ürün haline gelmiştir. Elde edildiği kaynaklar arasında horoz ibiği, umbilikal kordon, vitröz humor, deri ve tendon gelmektedir. A grubu streptokokların ekstraselüler kapsülünde de bulunan bu molekülün 1993 yılında streptokokların fermantasyonu ile elde edilmesi takibinde günümüzde HA üretimi temel olarak bakteriyel fermentasyon veya izolasyon yoluyla olmaktadır (13, 14).

Vitröz humorun ana komponentlerinden olan HA, göz operasyonlarından sonra damla formunda oldukça sık kullanılır. Katarakt operasyonlarından sonra uygulanan HA içeren göz damlaları doku tamirini hızlandırır ve yer tutucu özelliği ile de ön odanın formunu korumasına yardımcı olur (9). Antiadeziv özelliği ile bakteri adezyonunu engelleyerek enfeksiyon riskini azaltır (13, 57).

HA, hacminin 1000 katı kadar su bağlama kapasitesi ile dermisin hacmini ve esnekliğini artırır (13, 14). Bu nedenle cilt bakımı ürünlerinde sıkça kullanılır. Lokal olarak kullanılan formunun, epitel doku içine penetre olarak hem keratinosit proliferasyonunu hızlandırdığı hem de retinoik asit miktarını artırarak cildi nemlendirdiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra kozmetik amaçlı dolgu maddesi olarak enjeksiyonu (dudakların kalınlaştırılması, yüzdeki kırışıklıklar veya yumuşak dokuda görülen çöküntülerin doldurulması) 2003 yılında FDA onayı almıştır. Kozmetik amaçlı olarak, suda çözünmeyen yapısı ile şeklini koruyan ve visköz özelliği ile cilt altına kolay uygulanabilen çapraz bağlı formları kullanılmaktadır (64).

Temporomandibuler eklem ve diğer eklemlerde oluşan osteoartroz olgularında eklem içinde görülen en erken değişikliklerden biri HA yapısını oluşturan proteoglikanların kondrositler tarafından salgılanmasının azalması ve MMP-3 enziminin artışı ile eklem yüzeylerindeki yıkımın artmasıdır (50). Osteoartroz görülen eklemlerde HA yoğunluğu ve molekül ağırlığında da azalma görülmüştür (13, 50). HA miktarının azalmasıyla kıkırdak matrisi dejenerasyonunun başladığı bildirilmiştir. Eklem aralığına HA enjeksiyonunun eklem yüzeyinde oluşan yıkımı durdurduğu, prostoglandin ve sitokin gibi mediatörleri bağlayarak antienflamatuar etki gösterdiği, büyüme proteinleri ve kondrositler ile bağlanarak dejenerasyon olmuş kemikte rejenerasyonu başlattığı bildirilmiştir (51). Enjekte edilen HA'nın ortamda uzun süre kalarak kondrositleri ve sinoviyositleri uyarıp HA salınımını tetiklediği görülmüştür (61). Günümüzde osteoartroz tedavisinde Orthovisc (Sodyum Hyalüronat), Synvisc (Hyalan G-F 20) ve Adant (Sodyum Hyalüronat) olmak üzere 3 preparat kullanılmaktadır. Orthovisc ve Synvisc horoz ibiğinden, Adant ise bakteri fermantasyonu ile elde edilir (50). Ticari olarak temin edilen HA, yapısında bir takım değişiklikler oluşturularak kullanılmaya hazır hale getirilir. Yapısında geliştirilen çapraz bağlar ile DMA veya YMA olarak üretilmesi, kısa veya uzun dönemde rezorbe olması, jel veya lifsi yapıda üretilerek manipülasyonunun kolaylaşması sağlanmaktadır.

2.4. MBT

MBT, X ışınlarını kullanarak kesitsel görüntüler alan ve bu görüntüleri birleştirerek nesnelerin üç boyutlu incelenmesini sağlayan bir tekniktir. Mikro terimi cihazın aldığı kesitsel görüntülerin mikrometre cinsinden ifade edilmesinden kaynaklanır (69). Alınan kesitlerin kalınlığı ve kesit aralıkları, nesnelerin çözünürlüğünü belirleyen değerlerdir (70). Bilgisayarlı tomografi (BT) ile kesit aralıkları yaklaşık 1,5 mm civarında iken; MBT sistemleri için bu aralıklar 81 µm, 34 µm ve 12,5 µm gibi çok daha düşük değerlere ulaşır (71, 72). Bu sayede MBT ile elde edilen görüntülerin çözünürlüğü daha yüksek olmaktadır.

MBT ile üç boyutlu görüntü elde edilmesi temelde iki önemli aşama ile olur. Birinci aşamada görüntülerden belirli aralıklar ile kesit (segmentasyon) elde edilir. İkinci aşamada ise segmentasyon sonucu elde edilen data-set (görüntü yığını) rekonstrüksiyonuyla 3 boyutlu görüntü elde edilir. Bu bütün örnek için elde edilebileceği gibi incelenen örnek üzerinde lokalize bir alan için de olabilir. Elde edilen üç boyutlu görüntünün ardından bütün örneğin veya sadece bir bölümünün değerlendirilmesi region of interest (ROI) ile olmaktadır. Bu durum, incelenmesi istenen bölgenin başlangıç noktasından başlayarak mesafenin belirlenip üç boyutlu olarak incelenmesi ile gerçekleşir (73, 74).

MBT ile üç boyutlu görüntü elde edilmesinin yanı sıra, kemik dokunun mikroyapısının incelenmesi ve mineralizasyon seviyelerinin değerlendirilmesi de mümkün olmaktadır. Data-set rekonstrüksiyonunun ardından elde edilen görüntüde 'gri alanlar' mevcuttur. Bu alanların yoğunluğu veya başka bir ifade ile tonu mineralizasyon seviyesi ile ilgili bilgi verir. Bu nedenle ölçüm sırasında kemik gibi sert dokular siyaha yakın iken yumuşak dokular beyaza yakın renkte görüntü verir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi (3850-D2-14 no'lu proje) tarafından desteklenmiştir (Ek 1). Araştırmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından değerlendirilerek hayvan etiği açısından uygun görülmüştür (Ek 2).

3.1. Deney Hayvanları

İskeletsel gelişimini tamamlamış 40 adet 12 aylık 450-550 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan, deney hayvanı olarak kullanılmak üzere Ankara Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı San. Tic. A.Ş. ve Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı Başkanlığı'ndan temin edilmiştir. Deney hayvanlarının cerrahi işlemleri Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Sıçan mandibulasının model olarak kullanıldığı kısıtlı sayıda çalışma olması nedeniyle deneylere başlamadan önce cerrahi protokolü oluşturmak ve standardize etmek için pilot çalışma yapıldı. Pilot çalışmada 3 adet deney hayvanı kullanıldı ve 6 hafta takip edildi. Pilot çalışma sonucunda cerrahi protokolün oluşturulmasının yanı sıra bu çalışma için kullanılması gereken deney hayvanlarının ağırlıklarına karar verildi ve postoperatif dönemde bakımları ve beslenmeleri ile ilgili tecrübe edinildi.

3.2. Uygulanan Biyomateryaller

Çalışmamızda kemik grefti olarak insan kaynaklı kortikal kemiğin DKK ve partikül formu (DuraGraft, Gainesville, Amerika Birleşik Devletleri); HA olarak ise bakteri fermantasyonu ile elde edilen formu (Hyaloss, Reggio Emilia, İtalya) kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan HA; lifsi yapıda olup molekülün karboksilik gruplarının propiyofenon türevlerinin hidroksil gruplarıyla parsiyel olarak esterlenmesiyle üretilen HA ester türevidir.

3.3. Cerrahi Yöntem

3.3.1. Kemik Defekti Oluşturulması

Her bir deney hayvanına 90 mg/kg Ketamin HCl (Alfamine®, Ege-Vet, Türkiye) ve 10 mg/kg Xylazine HCl₂ (Alfazyne, Ege-Vet, Türkiye) intraperitoneal olarak enjekte edilerek genel anestezi sağlandı. Genel anestezinin derinliği pedal refleksinin kaybolması ile teyit edildi. Sağ ve sol olmak üzere her iki taraftaki operasyon sahası üzerindeki cilt, iyot solüsyonu ile silindikten sonra tıraşlandı. Sıçanların başı, köpük blok üzerinde konumlandırıldıktan sonra ense bölgesindeki cilt üzerinden 10 cc'lik enjektör ucu yardımıyla köpük bloğa sabitlendi (Resim 1). İnsizyon hattının cerrahi saha üzerinde kalmaması için cilt yukarı doğru gerilerek mandibula alt kenarının yaklaşık 3 mm üzerinden ve mandibula alt kenarına paralel olarak 12 mm uzunluğunda longitudinal cilt insizyonu yapıldı (Resim 2). Kasların küt diseksiyonu ve periostun keskin diseksiyonu ile kemiğe ulaşım sağlandı. Küçük Langenbeck retraktörleri yardımı ile kaslar superior ve inferior yönde ekarte edilerek; mandibula posterior kenarı, inferior kenarı ve sigmoid notch görülecek şekilde ramus lateral yüzü ortaya çıkarıldı (Resim 3). Defektin oluşturulacağı bölge; mandibula inferior ve posterior kenarlarına 3mm uzakta olacak şekilde belirlendi. Serum fizyolojik irrigasyonu altında tur motoru piyasemenine takılı 5 mm çapındaki yuvarlak uçlu cerrahi trefin frez ile bikortikal osteotomi ardından blok halinde kemik çıkarılarak düzgün sınırlı defekt oluşturuldu (Resim 4, 5).



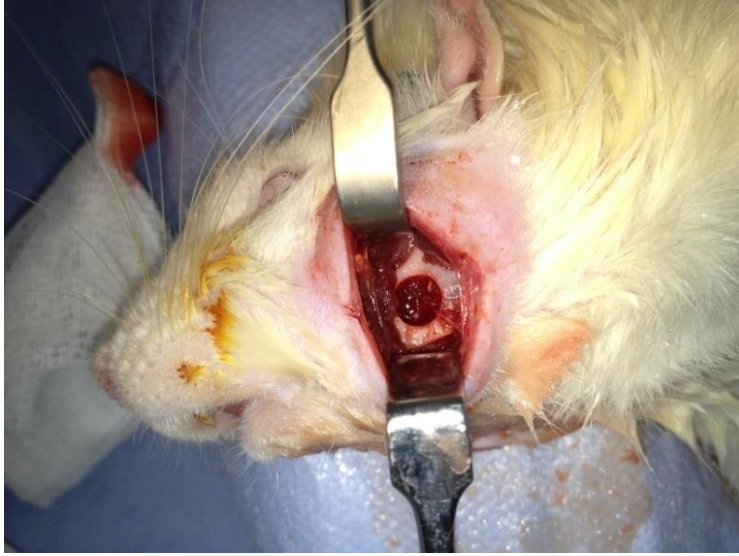
Resim 1. İşlem sahası tıraşlanmış sıçanların köpük blok üzerinde sabitlenmesi.



Resim 2. Sıçan mandibulasında cilt insizyonu.



Resim 3. Yumuşak dokuların ekartasyonu ile cerrahi sahanın ortaya çıkarılması.



Resim 4. Trefin frez ile 5 mm çapında oluşturulan defekt.



Resim 5. Defekt oluşturularak çıkarılan bikortikal kemik.

3.3.2. Biyomateryal Uygulaması

Deney hayvanları, her grupta rastgele seçilmiş 10 adet denek bulunmak üzere 4 gruba ayrıldı (Tablo 1). Grup 1'deki hayvanlarda, oluşturulan defekt boş bırakıldı. Grup 2'deki hayvanlarda, defekte defekt sahasını tamamen dolduracak miktarda partikül kemik grefti yerleştirildi (Resim 6). Grup 3'teki hayvanlarda, HA'nın bir demetinin yarısı kesilerek defekte yerleştirildi (Resim 7, 8). Grup 4'te ise HA, bir demetinin yarısı olacak şekilde defekt sahasına yerleştirildikten hemen sonra defekt sahası tamamen dolacak şekilde greft materyali eklendi.

Tablo 1. Çalışma gruplarının dağılımı.

Gruplar	N	Kullanılan Materyal
Grup 1	10	Boş bırakılan defekt
Grup 2	10	Kemik grefti
Grup 3	10	HA
Grup 4	10	HA ve kemik grefti



Resim 6. Defekt sahasına yerleştirilmiş partikül kemik.



Resim 7. Defekt sahasına yerleştirilmiş HA.



Resim 8. Her kutuda iki adet demet halinde temin edilen lifsi yapıya sahip HA.

Kas ve cilt dokuları ayrı ayrı, 4/0 vicryl (Doğsan, Trabzon, Türkiye) ile devamlı kilitli suture tekniği kullanılarak suture edildi. (resim 9, 10).

Tüm işlemler mandibulanın karşı tarafında tekrar edilerek bilateral olarak uygulandı.

Cerrahi işlemler bütün deney hayvanlarında tek bir kişi tarafından gerçekleştirildi. Her deney hayvanında yeni bir bistüri ve suture materyali kullanıldı. Köpük blok üzerine serilen cerrahi örtü ve cerrahi el aletleri ise her bir cerrahi işlem sonrası dezenfekte (CIDEX® OPA, İstanbul, Türkiye) edildi.



Resim 9. Kas dokusunun devamlı kilitli suture tekniğiyle suture edilmesi.



Resim 10. Cildin devamlı kilitli suture tekniğiyle suture edilmesi.

3.4. Operasyon Sonrası Takip

Cerrahi işlem günü ve postoperatif 2 gün boyunca bütün sıçanlara enfeksiyon kontrolü için intramusküler 5 mg/kg/gün amikasin sülfat (Amikozit®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) antibiyotik ve ağrı kontrolü için intraperitoneal ketoprofen (Profenid® ampul, Sanofi Aventis, İstanbul, Türkiye) analjezik uygulandı.

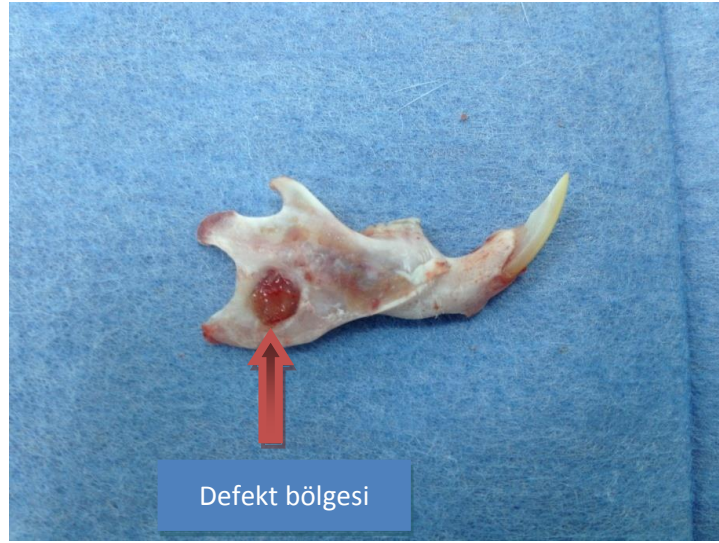
Postoperatif dönemde deney hayvanları normal şehir suyu ve %21 protein içeren özel yemler ile beslendi. Pelet formundaki sert yemler toz haline getirildikten sonra su ile karıştırılarak kalıp halinde kemirmeye uygun kıvamda hazırlandı. Bu sayede beslenme sırasında mandibulaya fazla kuvvet gelmesi engellenirken hayvanların kemirme alışkanlıkları korunarak dişlerin ekstrüzyonu engellendi. Toz yemlere ek olarak ciddi kilo kaybını engellemek için postoperatif birinci hafta boyunca protein ve kalsiyum değeri yüksek bisküviler (Cici Bebe, Eti, Bozüyük, Türkiye) sabah ve akşam 1 adet olacak şekilde verildi.

Deney süresi boyunca sıçanlar; 21-22°C oda sıcaklığında, %50 nem ayarlı, optimize edilmiş küçük hayvan bakım odalarında, tek sıçanlık kafeslerde ayrı ayrı barındırıldı. Gün içerisinde yapılan kontrollerde sıçanların genel sağlık durumları, yem ve su alımları, davranış şekilleri takip edildi ve kafes temizlikleri yapıldı.

3.5. Örneklerin Elde Edilmesi

Postoperatif 6. hafta sonunda anestezi dozu 2 katına çıkarılarak deney hayvanları sakrifiye edildi. Mandibula, çevreleyen yumuşak doku ve kaslar diseke edildikten sonra tek parça halinde çıkarılıp orta hattan iki ayrı parçaya ayrıldı (Resim 11). Mandibulanın her bir parçası %10'luk formalin (Merck, Darmstadt, Almanya) içerisine konularak ölçümlendirme işlemleri yapılanaya dek muhafaza edildi.

Mandibulanın sağ yarısından elde edilen örnekler histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeye tabi tutularak kemik iyileşmesi değerlendirildi. Mandibulanın sol yarısından elde edilen örnekler ise MBT ile incelenerek yeni oluşan kemik dokunun yoğunluğu incelendi. Örnekler değerlendirilmek için ilgili laboratuvarlara gönderilmeden önce kodlandı ve örneklerin hangi gruba ait olduğuna dair bilgiler, ölçümlendirmeleri yapan çalışmacılar ile paylaşılmadı.



Resim 11. Kontrol grubuna ait bir denekten elde edilen örnekte, çevreleyen yumuşak dokularından arındırılmış mandibula bir yarısı.

3.6. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme

Örneklerinin histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Kemik örnekleri, aynı patolog tarafından farklı zamanlarda 2 defa incelendi.

Formaldehit içerisinde bekletilen kemik örnekleri histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri yapılmadan önce 2 hafta boyunca dekalsifiye solüsyonunda (%5'lik nitrik asit) bekletildi. Yumuşayan kemik örnekleri defektin olduğu bölgede 3 ayrı parçaya bölünerek takip prosedürüne alındı ve bu sayede defekt bölgesinin 3 seviyede incelenmesi sağlandı.

3.6.1. Histopatolojik İnceleme

Her bir sıçana ait kemik örnekleri ayrı takip kasetlerine konuldu. Akarsu altında 1 saat yıkanan dokular doku takip cihazına yerleştirildi. Dokular, gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek içeriğinde bulunan su alındı. Bu işlemi takiben 2 defa ksilolden geçirilip içeriğinde bulunan yağdan arındırıldı. Son olarak doku boşluklarına parafin dolması için sıcak parafine geçirildi. Bir sonraki gün dokular parafine gömülerek bloklama işlemi yapıldı. Bloklarda 4-5 saat soğutulmalarının ardından rotary mikrotom ile 5 mikron kalınlığında 2 farklı seviyede kesitler alındı. Bu sayede 3 parçaya ayrılan defekt bölgesi, 2 ayrı seviyedeki kesitleri ile birlikte toplam 6 farklı alanda örneklendi.

Kesitler hematoksilin eozin ile boyandıktan sonra x400'lük büyütme ile ışık mikroskobu altında incelendi. Defekt bölgesinde oluşan kemik iyileşmesi Tablo 2'de belirtildiği gibi Emery skalası kullanılarak skorlandı (8).

Tablo 2. Emery histopatolojik kemik iyileşme skalası.

Skor	Doku bulguları
0	Boş kavite
1	Sadece fibröz doku gelişimi
2	Fibrokartilaj doku gelişiminden daha fazla gelişimi fibröz doku
3	Fibröz doku gelişiminden daha fazla fibrokartilajdoku gelişimi
4	Sadece fibrokartilaj doku
5	Kemik gelişiminden daha fazla fibrokartilaj doku
6	Fibrokartilaj doku gelişiminden daha fazla kemik doku
7	Sadece kemik doku

3.6.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmunoperoksidaz yöntemi için streptoavidin-biotin peroksidaz metodu kullanıldı. İmmunhistokimyasal incelemede şekillenen yeni dokudaki OPN, OSX ve ALP aktiviteleri sırasıyla anti-osteopontin antibody (ab8448, 1/100 dilüsyon), anti-Sp7/osterix antibody - ChIP Grade (ab22552, 1/100 dilüsyon) ve anti-alkaline phosphatase, tissue non-specific antibody (ab65834, 1/100 dilüsyon) kitleri (Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık) ile incelendi.

Kesitler sıra ile dereceli alkollerden ve ksilol geçirildi. Bu işlemleri takiben dehidrate ve deparafinize edildi. Dokular 10 dakika süreyle suda yıkandı. İçerdikleri endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla dokular, %3'lük metanoldeki hidrojen peroksit ile 20 dakika süreyle muamale edildi. Bu işlemi takiben dokular, Phosphate-Buffer Saline (PBS) solusyonunda 2 defa 10'ar dakika süreyle yıkandı. Daha sonra nonspesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serum içinde 45 dakika bekletildi. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan primer serumlar uygulandı ve örnekler +4⁰C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün dokular aynı şekil ve süreyle PBS'de yıkandı, takiben biotinli serum ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS'de 2 defa 10'ar dakika tekrar yıkandı. Bu işlemden sonra dokular streptoavidin alkalin fosfataz konjuguat ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve tekrar PBS ile yıkandı. Ardından 30 dakika süreyle biotinli sekonder antikor ile inkübe edildi. İşlemleri takiben örnekler DAB (3,3 diaminobenzidine) kromojen ile boyandı. Karşıt boyama için Harris hematoksilen kullanıldı ve preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

Her bir grupta belirtilen OPN, OSX ve ALP yoğunlukları 0 ile 3 arasında skorlanan sınıflamaya göre ölçümlendi (Tablo 3).

Tablo 3. İmmünohistokimyasal belirteçlerin yoğunluğunun ölçümlendirilmesi.

Negatif	0
Hafif pozitif	1
Orta şiddette pozitif	2
Şiddetli pozitif	3

Boyanmış kesitler Olympus CX41 model mikroskop ile Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanılarak fotoğraflandı.

3.7. MBT ile Değerlendirme

Örneklerin MBT ile değerlendirmeleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda, MBT cihazı (SkyScan 1174 compact Micro CT, Kontich, Belçika) kullanılarak gerçekleştirildi (Resim 12).



Resim 12. Kemik yoğunluğunun tayini için kullanılan MBT cihazı.

Çalışmamızda kemik örnekleri, aynı çalışmacı tarafından farklı zamanlarda 2 defa incelendi. Her bir sıçana ait kemik örneği içerdiği formaldehit solüsyonunu uzaklaştırmak için kağıt havlu ile kurulandı. Hafif nemli halde olan kemik örnekleri 6 cm çapındaki hazır silindirik kalıpların tam merkezine dik bir şekilde yerleştirildi. Örnekler, kalıpların içerisinde şeffaf akrilik rezin (Orthoplast, Vertex, Zeist, Hollanda) yardımıyla stabilize edildi. Silindirik kalıplar içerisinde inceleme için sabitlenen örnekler, MBT cihazının içinde bulunan örnek tablasına yerleştirildi.

Her bir örneğin taranmasında Flat-Field programı kullanıldı. Bu programda tarama süresi 2300 milisaniye ve dönme derecesi 0,7 derece olarak ayarlandı. Bütün taramalar 180 derecelik dönme açısı ile yapıldı. Bu esnada her bir 0,7 derecelik dönmeye 3 adet görüntü elde edildi. Tarama işlemleri tamamlandıktan sonra NRecon

programı kullanılarak elde edilen ham verilerden 33 mikrometre kalınlığında transvers kesitler alındı. Bu sayede her bir örnek için toplamda 272 adet kesit elde edildi. Elde edilen kesitler bmp formatına dönüştürüldü ve CTan yazılım programına aktarıldı.

Kesitlerin yazılım programına aktarılmasının ardından ROI ile defekt bölgesinde ilgili alanlar seçildi. ROI ile kesitlerdeki görüntülerde defekt alt sınırı 0 noktası olarak kabul edilerek bu noktadan 5 mm mesafedeki alan işaretlendi. Bu iki nokta arasında yeni oluşan kemik alanlarında görülen farklı mineralizasyon seviyeleri üç boyutlu olarak değerlendirildi ve farklı yoğunluktaki alanlar 'Gri Alanlar' olarak kaydedildi. En düşük mineralizasyon Düşük Gri Alan (DGA), en yüksek mineralizasyon Yüksek Gri Alan (YGA) olarak belirtildi. Yeni oluşan dokunun mineralizasyon seviyesinin değerlendirilmesini sağlayan bu protokol her bir kemik örneği için aynı şekilde uygulandı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago IL, ABD) 20.0 yazılım paket programı kullanılarak yapıldı.

Elde edilen verilerin parametrik testlerin ön şartlarından olan normal dağılıma uyum şartını sağlayıp sağlamadığı Anderson-Darling testi uygulanarak bakıldı. Parametrik testlerin en önemli şartlarından biri olan varyans kovaryans matrisinin homojenliği ön şartının sağlanıp sağlanmadığı ise Box's M testi ile irdelendi. Yeni kemik oluşum skorları, ALP, OPN ve OSX belirteçleri yoğunluk skorları ve yeni kemik mineralizasyon (DGA ve YGA) değerleri parametrik testlerin varyansların homojenliği ve gözlemlerin normal değerleri ön şartlarını sağlamadığı için gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi uygulanarak analiz edildi. Grupların RANK ortalamasındaki farklılıkların belirlenmesinde bu özellikler için çoklu karşılaştırma yöntemi olan Bonferroni-Dunn testi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Gruplara Göre Dağılımı

Çalışmaya dahil edilen toplam 40 adet deney hayvanının 8 adedi operasyon sırasında oluşan fraktür, 2 adedi defekt bölgesinde gelişen apse, 3 adedi deney süresini tamamlayamadan ölüm nedenleri ile çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca mandibula örnekleri alınırken 2 deneğin mandibulasının sağ yarısında; 1 deneğin mandibulasının sol yarısında fraktür gözlenerek bu örnekler çalışma dışı bırakıldı. Çalışmada toplamda 27 adet kemik örneği histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenirken, 28 adet kemik örneğinin kemik yoğunluğu değerlendirildi (Tablo 4).

Tablo 4. Her bir grupta değerlendirmeye katılan örnek sayısı.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Toplam
İmmünohistokimyasal ve Histopatolojik	4	9	9	5	27
MBT	5	10	9	4	28

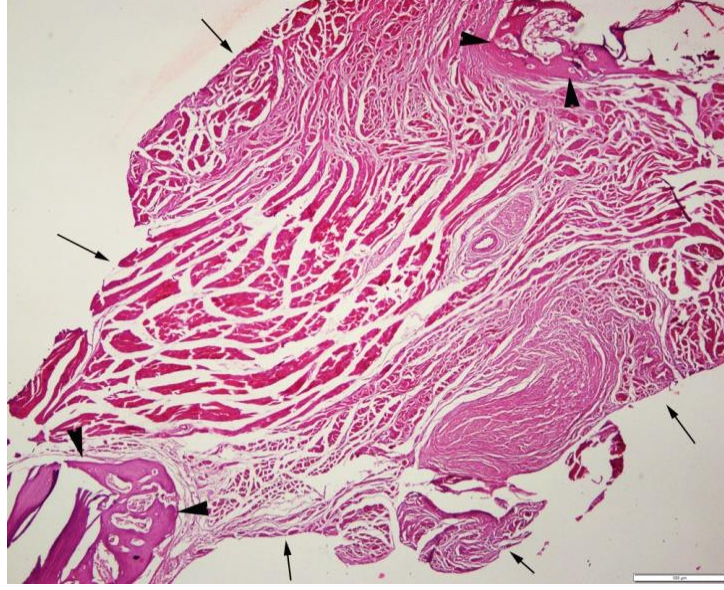
4.2. Makroskobik Kemik İyileşmesi

Bütün gruplara ait örneklerin makroskobik incelemesinde kemik defektlerinin yeni oluşan doku ile kaplandığı ve yeni oluşan bu doku ile defekt sınırları arasında sıkı bir bağlantı olduğu gözlemlendi. Yeni oluşan dokunun Grup 1'de diğer gruplara göre daha yumuşak bir yapıda olduğu dikkat çekiciydi. Deneylerde kullanılan materyaller rezorbe olduğu için Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te kullanılan biyomateryallere rastlanmadı.

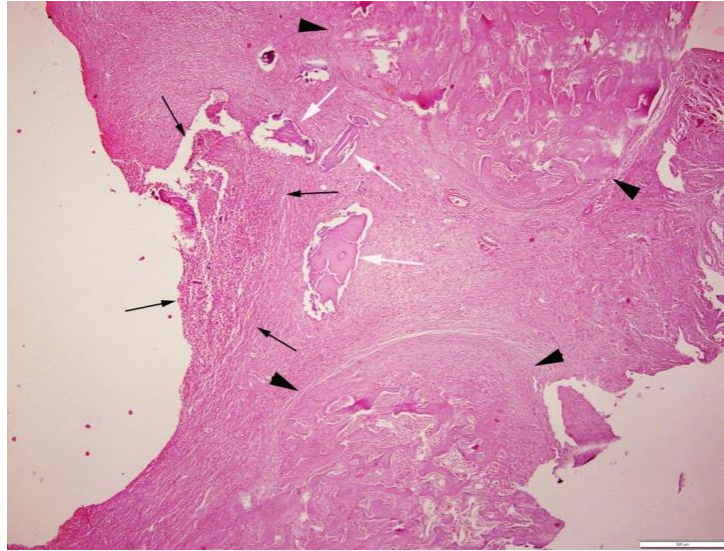
4.3. Histopatolojik Kemik İyileşmesi

Histopatolojik incelemeler ile postoperatif 6. haftada bütün gruplarda defekt sınırlarındaki kemik dokuda proliferasyon olduğu görüldü. Yeni gelişen granülasyon dokusunda yoğun şekilde vaskülerizasyon saptandı. Yine bütün çalışma gruplarına

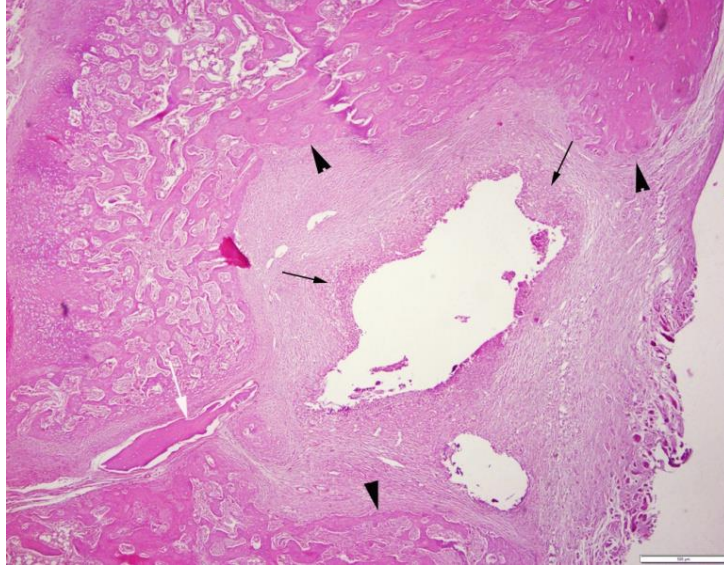
ait örneklerde, özellikle defekt bölgesinin merkezine yakın yerlerinde belirgin şekilde yoğunlaşan enflamatuar hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 13-16).



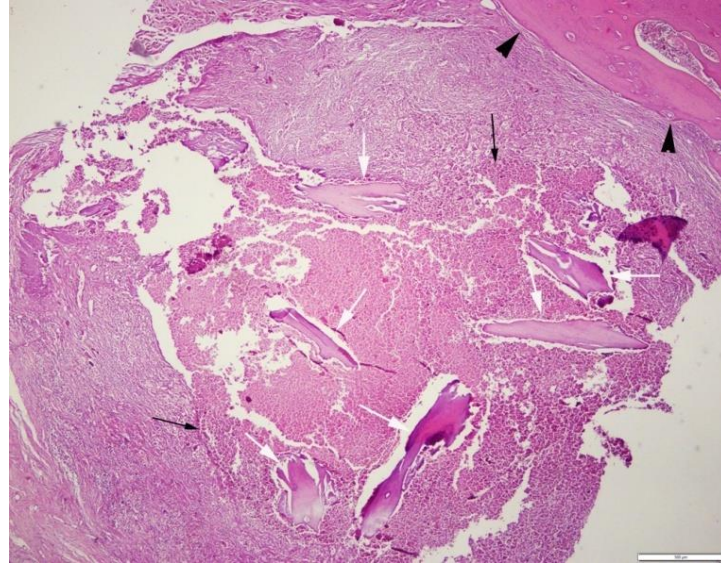
Resim 13. Grup 1'e ait kemik iyileşmesine dair bir örnek. Ok başları defekt çevresindeki kemik dokuyu, oklar yeni şekillenen dokuyu göstermektedir (Bar=100 µm).



Resim 14. Grup 2'ye ait kemik iyileşmesine dair bir örnek. Ok başları defekt çevresindeki kemik dokuyu, siyah oklar enflamatuar hücre infiltrasyonunu, beyaz oklar yeni gelişen kemik dokusunu göstermektedir (Bar=100 µm).



Resim 15. Grup 3'e ait kemik iyileşmesine dair bir örnek. Ok başları defekt çevresindeki kemik dokuyu, siyah oklar enflamatuar hücre infiltrasyonunu, beyaz oklar yeni gelişen kemik dokusunu göstermektedir (Bar=100 µm).



Resim 16. Grup 4'e ait kemik iyileşmesine dair bir örnek. Ok başları defekt çevresindeki kemik dokuyu, siyah oklar enflamatuar hücre infiltrasyonunu, beyaz oklar yeni gelişen kemik dokuyu göstermektedir (Bar=100 µm).

Gruplar arası defekt bölgesindeki histopatolojik kemik iyileşmesinin Emery skalasına göre skor değerleri Tablo 5'te sunulmuştur. Kemik iyileşmesinin en düşük 0 ve en yüksek 7 olduğu skalada elde edilen değerler gruplar arasında karşılaştırıldığında en düşük seviyede kemik iyileşmesi kontrol grubu olan Grup 1'e ait örneklerde ($1,25 \pm 0,25$) gözlemlendi. Grup 1'e ait örneklerdeki kemik iyileşmesi

değerleri ile Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (tüm gruplar için $p < 0,01$). Greft ve HA kullanılan grupta kemik iyileşmesi skala ortalaması biyomateryal kullanılan diğer iki gruptan (sadece greft materyalinin kullanıldığı ve sadece HA kullanılan grup) daha yüksek olmakla beraber aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde değildi. Kemik iyileşmesi skoru ortalaması Grup 2’de $4,67 \pm 0,41$, Grup 3’te $4,67 \pm 0,41$ ve Grup 4’te $5,60 \pm 0,25$ idi.

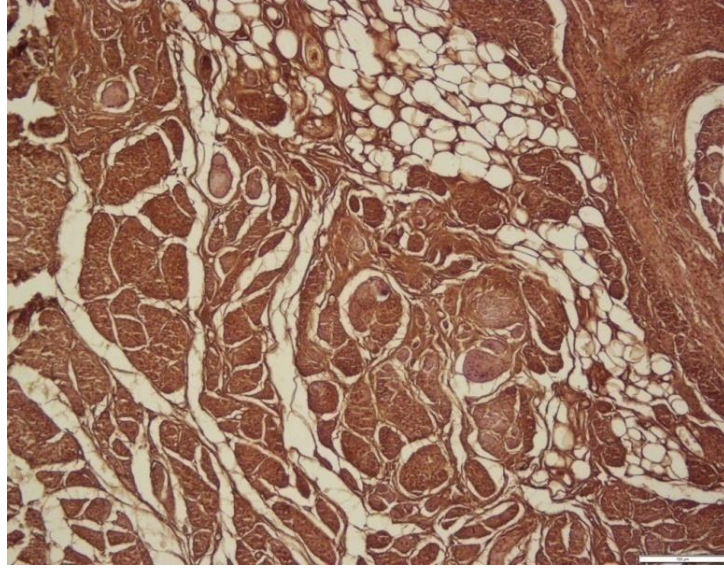
Tablo 5. Çalışma gruplarına ait örneklerde kemik iyileşmesi değerleri. Aynı harf ile işaretlenmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yok iken farklı harfler ile işaretlenmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur (St. Hata: Standart hata; St. Dev.: Standart deviasyon).

	Ortalama	St. Hata	St. Dev.	Minimum	Medyan	Maksimum
Grup 1	1,25b	0,25	0,50	1,00	1,00b	2,00
Grup 2	4,67a	0,41	1,23	3,00	5,00a	6,00
Grup 3	4,67a	0,41	1,23	3,00	5,00a	6,00
Grup 4	5,60a	0,25	0,55	5,00	6,00a	6,00

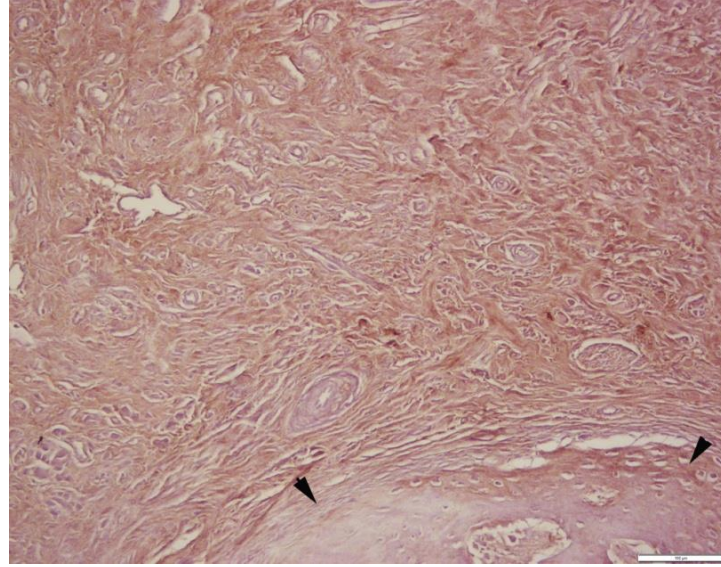
4.4. Kemik-Yapım Belirteçlerinin Aktivitesi

Çalışma gruplarına ait örneklerde ALP immünoreaksiyonu Resim 17-20; OSX immünoreaksiyonu Resim 21-24, OPN immünoreaksiyonu Resim 25-28’de sunulmuştur. Resimlerden de izlenebildiği üzere incelenen belirteçlerin tümünün aktivitesinde artış görüldü. Bağ dokuda ve enflamatuar hücrelerde bu belirteçlerin aktivitelerinde artış daha şiddetli iken kemik ve kas dokularında daha hafif şiddette olduğu belirlendi.

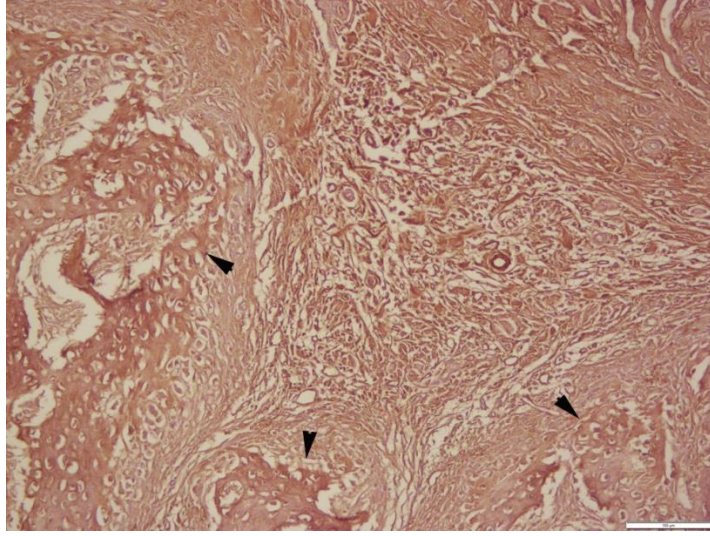
Tablo 6, Tablo 7 ve Tablo 8 sırasıyla ALP, OPN ve OSX aktivitelerinin istatistiki değerlerini vermektedir. Kemik yapım belirteçlerinin aktivitesi ölçümünde kullanılan, en düşük 0 en yüksek 3 olan skorlamaya göre çalışılan her 3 kemik yapım belirtecinin aktivitesi tüm çalışma gruplarında genel olarak 2-3 (orta şiddetli-şiddetli pozitif) seviyesindedir. Çalışılan gruplar arasında kemik belirteçleri seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemektedir.



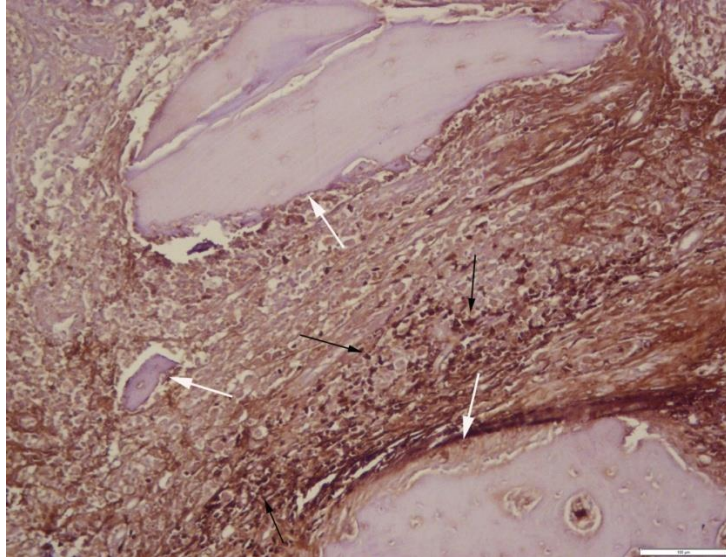
Resim 17. Grup 1'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki ALP immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünpozitif reaksiyon gözlenmektedir (Bar=100 μ m).



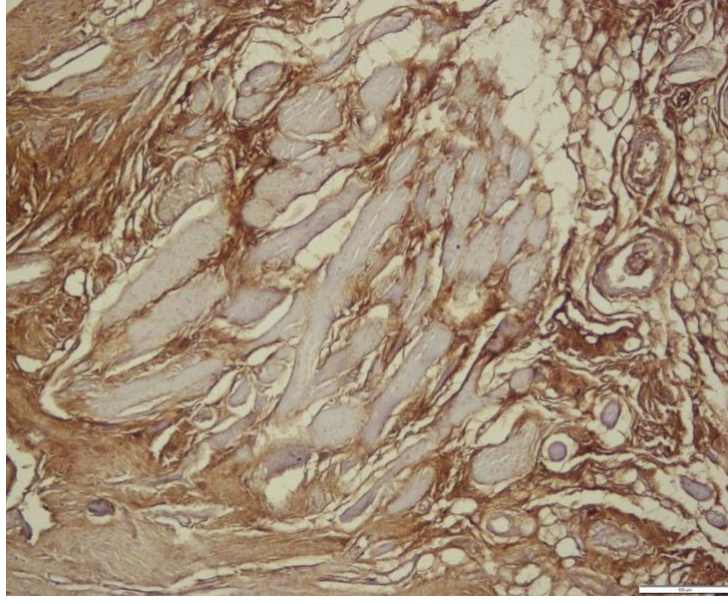
Resim 18. Grup 2'ye ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki ALP immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünpozitif reaksiyon gözlenmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 μ m).



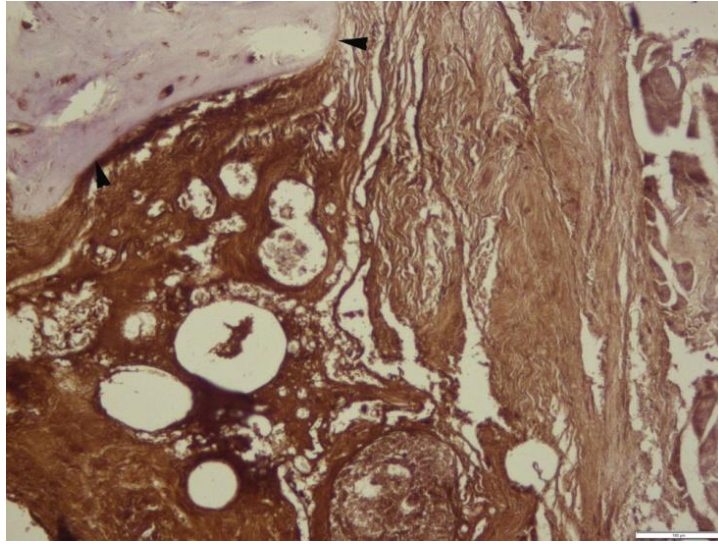
Resim 19. Grup 3'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki ALP immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünpozitif reaksiyon gösterilmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 μ m).



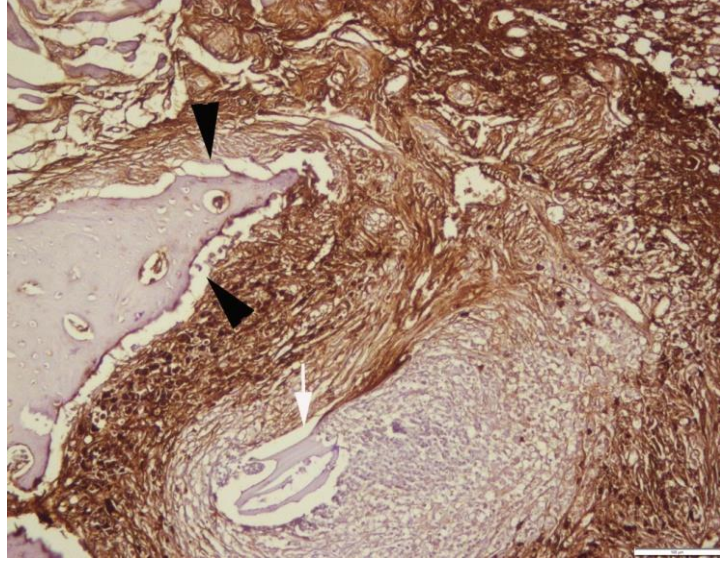
Resim 20. Grup 4'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki ALP immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünpozitif reaksiyon gösterilmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 μ m).



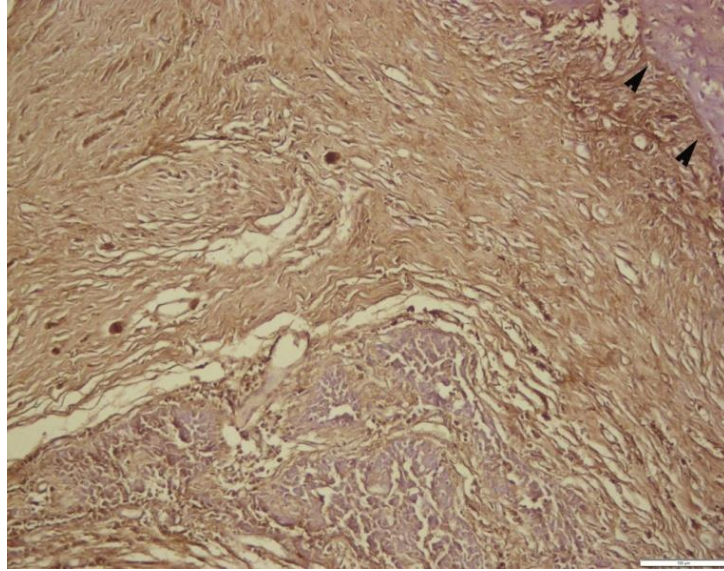
Resim 21. Grup 1'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OSX immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünpozitif reaksiyon gösterilmiştir (Bar=100 μ m).



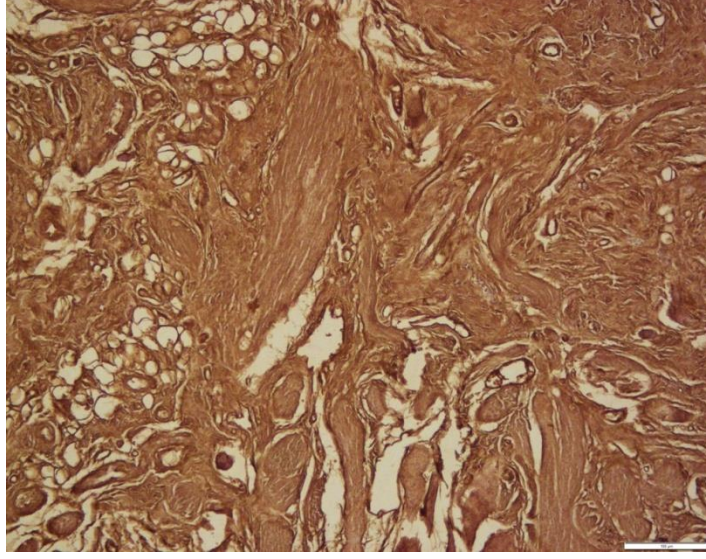
Resim 22. Grup 2'ye ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OSX immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünpozitif reaksiyon gösterilmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 μ m).



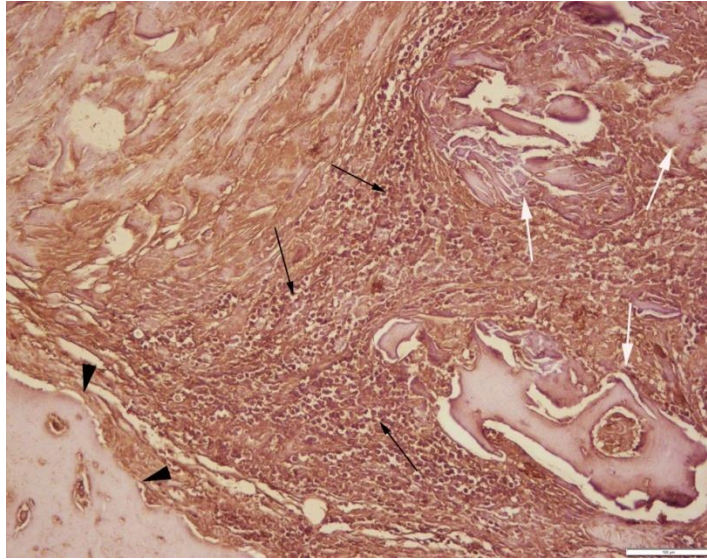
Resim 23. Grup 3'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OSX immünoaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünopozitif reaksiyon gösterilmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 µm).



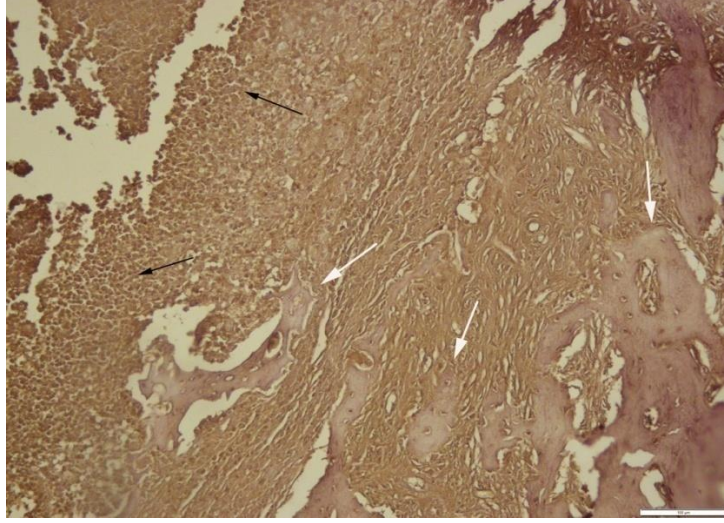
Resim 24. Grup 4'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OSX immünoaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünopozitif reaksiyon gösterilmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 µm).



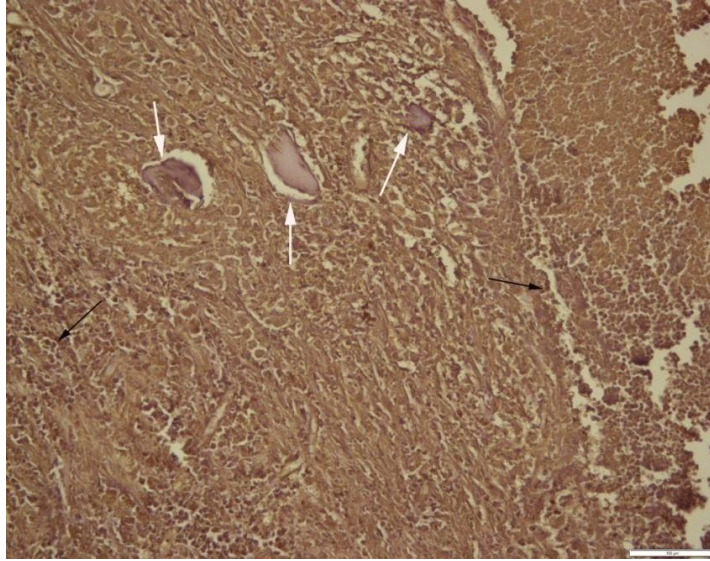
Resim 25. Grup 1'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OPN immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünopozitif reaksiyon gösterilmiştir (Bar=100 μ m).



Resim 26. Grup 2'ye ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OPN immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünopozitif reaksiyon gösterilmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 μ m).



Resim 27. Grup 3'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OPN immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünpozitif reaksiyon gösterilmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 µm).



Resim 28. Grup 4'e ait bir örnekte defekt bölgesinde gelişen dokudaki OPN immünoreaksiyonu. Tüm hücrelerde şiddetli immünpozitif reaksiyon gösterilmektedir. Çevre kemik doku ok başları ile gösterilmiştir (Bar=100 µm).

Tablo 6. Çalışma gruplarına ait örneklerde saptanan ALP belirteci aktivitesi. Değerlerin işaretlendiği harflerin aynı olması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirtir (St. Hata: Standart hata; St Dev.: Standart deviasyon).

	Ortalama	St. Hata	St. Dev.	Minimum	Medyan	Maksimum
Grup 1	2,50a	0,29	0,58	2,00	2,50a	3,00
Grup 2	2,44a	0,18	0,53	2,00	2,00a	3,00
Grup 3	2,56a	0,91	2,73	2,00	3,00a	3,00
Grup 4	2,60a	0,25	0,55	2,00	3,00a	3,00

Tablo 7. Çalışma gruplarına ait örneklerde saptanan OPN belirteci aktivitesi. Değerlerin işaretlendiği harflerin aynı olması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirtir (St. Hata: Standart hata; St Dev.: Standart deviasyon).

	Ortalama	St. Hata	St. Dev.	Minimum	Medyan	Maksimum
Grup 1	2,25a	0,25	0,50	2,00	2,00a	3,00
Grup 2	2,44a	0,24	0,73	1,00	3,00a	3,00
Grup 3	2,67a	0,17	0,50	2,00	3,00a	3,00
Grup 4	2,60a	0,25	0,55	2,00	3,00a	3,00

Tablo 8. Çalışma gruplarına ait örneklerde saptanan OSX belirteci aktivitesi. Değerlerin işaretlendiği harflerin aynı olması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirtir (St. Hata: Standart hata; St Dev.: Standart deviasyon).

	Ortalama	St. Hata	St. Dev.	Minimum	Medyan	Maksimum
Grup 1	2,50a	0,29	0,58	2,00	2,50a	3,00
Grup 2	2,56a	0,18	0,53	2,00	3,00a	3,00
Grup 3	2,78a	0,15	0,44	2,00	3,00a	3,00
Grup 4	2,80a	0,20	0,45	2,00	3,00a	3,00

4.5. Kemik Yoğunluğu

Deneklerde oluşturulmuş defekt bölgesinin postoperatif 6. hafta sonunda MBT ile tarama görselleri Resim 29-32’de izlenmektedir. Yeni kemikleşen dokuda DGA kemik mineralizasyon seviyesinin en düşük görüldüğü; YGA ise kemik mineralizasyon seviyesinin en yüksek görüldüğü alandır. Çalışmamızda incelenen

örneklerde DGA sahaları defekt sahasının merkezinde veya merkezine yakın görülürken, YGA sahaları defekt sınırlarında veya sınıra yakın alanlarda görüldü.

Yeni oluşan kemik dokunun sahip olduğu en düşük mineralizasyon seviyesi bakımından elde edilen verilere ait tanıtıcı istatistikler Tablo 9'da gösterilmiştir. Grup 1'e ait örnekler ($57,60 \pm 1,60$) en düşük DGA ortalamasına sahipken Grup 3'e ait örnekler ($69,33 \pm 3,98$) en yüksek DGA ortalamasına sahiptir. Her iki grubun DGA değeri diğer gruplardan istatistiksel olarak farklıydı (her iki grup için $p < 0,05$). Grup 2 ($63,80 \pm 0,20$) ve Grup 4 ($64,25 \pm 3,33$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi.

Yeni oluşan kemik dokunun sahip olduğu en yüksek mineralizasyon seviyesi bakımından elde edilen verilere ait tanıtıcı istatistikler Tablo 10'da gösterilmiştir. Tablodan da görüleceği üzere Grup 3 ($242,56 \pm 2,80$) ve Grup 4 ($241,3 \pm 13,8$) en yüksek YGA ortalama değerlere sahip iken Grup 1 ($221,80 \pm 5,20$) ve Grup 2 ($227,00 \pm 0,00$) en düşük YGA ortalama değerlerine sahipti. Grup 3 ve Grup 4 ortalama değerleri ile Grup 1 ve Grup 2 ortalama değerleri arasındaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). Bununla beraber Grup 1 ve Grup 2'ye ait örnekler arasında ve Grup 3 ve Grup 4'e ait örnekler arasında YGA değerleri açısından anlamlı bir farklılık mevcut değildi. (Değerlendirmeler sırasında en yüksek mineralizasyon seviyesine sahip olan alan 256 sayısı ile ifade edilir.)

Tablo 9. Çalışma gruplarına ait örneklerde ölçülen DGA değerleri. Değerlerin işaretlendiği harflerin farklı olması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu; aynı olması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirtir.

	Ortalama	St. Hata	St. Dev.	Minimum	Medyan	Maksimum
Grup 1	57,60c	1,60	3,58	56,00	56,00c	64,00
Grup 2	63,80b	0,20	0,63	62,00	64,00b	64,00
Grup 3	69,33a	3,98	11,93	63,00	66,00a	101,00
Grup 4	64,25bc	3,33	6,65	60,00	61,50bc	74,00

Tablo 10. Çalışma gruplarına ait örneklerde ölçülen YGA değerleri. Değerlerin işaretlendiği harflerin farklı olması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu; aynı olması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirtir.

	Ortalama	St. Hata	St. Dev.	Minimum	Medyan	Maksimum
Grup 1	221,80b	5,20	11,63	201,00	227,00b	227,00
Grup 2	227,00b	0,00	0,00	227,00	227,00b	227,00
Grup 3	242,56a	2,80	8,41	227,00	241,00a	255,00
Grup 4	241,30a	13,8	27,50	200,00	255,00a	255,00



Resim 29. Grup 1'e ait defekt sahasının görüntüsü.



Resim 30. Grup 2'ye ait defekt sahasının görüntüsü.



Resim 31. Grup 3'e ait defekt sahasının görüntüsü.



Resim 32. Grup 4'e ait defekt sahasının görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Oral ve maksillofasial cerrahide kemik greftleri yaygın kullanım alanına sahiptir. Herhangi bir sebepten dolayı kemik bütünlüğünün bozulduğu durumlarda yeni kemik dokusunun oluşumunu hızlandırmak ve güçlendirmek amaçlanarak pek çok greft materyali ve biyouyumlu materyal geliştirilmiş olup bu konu üzerine çalışmalar devam etmektedir (75, 76).

İdeal bir biyomateryalin esas görevi defektlerin kısa sürede anatomik forma en uygun şekilde iyileşmesini sağlamak ve yeni oluşacak dokulara rehberlik etmektir. Bunun yanı sıra cerrahi sahadaki mekanik kuvvetlere karşı dirençli olmalı, yeterli miktarda temin edilebilmeli, maliyeti uygun olmalı, ikinci bir operasyona ihtiyaç duyulmamalı, istenilen forma kolayca getirilebilmeli, defekt bölgesi içerisinde stabilizasyonu ve şeklini muhafaza edebilmeli, uygulanması kolay olmalı, uzun süre saklanabilmeli ve antijenik özellik taşımamalıdır (4).

Günümüzde kullandığımız greft materyalleri bu özelliklerin sadece bir kısmını karşılayabilmektedir. İdeal greft materyalini oluşturmak için yapılan çalışmalarda; KMP, kollajen, fibrin, fibroblast büyüme faktörü gibi kemik yapımında görev alan pek çok faktör kemik yapımını uyarıcı biyomateryal olarak kullanılmaya başlanmıştır (6, 29). HA ise birçok fonksiyonu ile çenelerde oluşan kemik defektlerinin tamirinde umut vaat eden bir biyomateryal olarak son yıllarda karşımıza çıkmaktadır (7). HA, ESM'nin önemli bir yapıtaşı olup vücutta hemen hemen bütün hücreler tarafından üretilir. Yara iyileşmesi, tümör progresyonu gibi durumlarda sentezinde artış görülen bu faktör; hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve migrasyonunda önemli rol alır. Bu özelliklerine ek olarak bakteriostatik özelliği ve yüksek su bağlama kapasitesi sayesinde oftalmoloji, ortopedi ve dermatoloji alanlarında sıkça tercih edilen bu biyomateryalin oral ve maksillofasial cerrahi alanında uygulanması üzerine oldukça kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur (7, 57, 62, 64).

Kemik iyileşmesinin; histolojik, histomorfometrik ve biyomekanik açıdan değerlendirildiği pek çok çalışmada köpek, tavşan, domuz, koyun, kedi ve sıçan gibi deney hayvanları kullanılmaktadır (39, 77). Çalışmamızda ise HA ile allogreftlerin çene kemiklerinin iyileşmesi üzerine olan etkisi Sprague-Dawley cinsi sıçan modeli

kullanılarak karşılaştırıldı. Mandibula büyüme ve gelişimleri insanlara benzerlik gösteren sıçanların (78- 80) bakımları ve manüplasyonları nispeten kolay olduğu için çalışmamızda tercih edildi. Hormonal değişikliklerin özellikle östrojen hormonunun kemik metabolizması üzerinde önemli etkisinin bulunması ve dişi sıçanlarda mandibula yüksekliğinin daha az olması nedenleri ile erkek sıçanlar kullanıldı (80, 81).

Sıçanlar üzerinde kemik iyileşmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda kolay uygulanabilir olması nedeni ile tibia ve femur gibi uzun kemikler tercih edilmekle beraber kimi çalışmalarda kalvaryum ve mandibula gibi kraniofasial kemikler incelenmiştir (81-83). Uzun kemikler ve kraniofasial kemiklerin aşağıda sıraladığımız farklılıkları dikkate alınarak, bu çalışmada test ettiğimiz biyomateryallerin kemik defektlerinin iyileşmesine etkisi mandibular kemik model alınarak karşılaştırılmıştır.

- 1) Uzun kemikler endokondral kemikleşme ile oluşurken, kraniofasial kemikler intramembranöz kemikleşme ile oluşmaktadır (84). Yapılan çalışma sonucunda bu farklılığın kemik iyileşmesini etkilediği, ancak iyileşmenin hem uzun kemiklerde hem de kraniofasial kemiklerde önce kartilaj dokusunun oluşması ile gerçekleştiği görülmüştür (85).
- 2) Uzun kemikler ile kraniofasial kemiklerdeki hemostatik mekanizma ve hücresel yanıtlar farklıdır (81). Mekanik ve hormonal pek çok uyarı kemik dokusunun hemostatik fonksiyonlarını ve hücresel yanıtlarını etkilemektedir. Paratiroid hormon ve kalsitonin gibi kalsiyum metabolizmasını düzenleyen hormonlar, büyüme hormonları, östrojen ve glikokortikoid gibi sistemik hormonlar ve PGE₂, insülin benzeri büyüme faktörü, TGF- β gibi lokal faktörler hemostatik fonksiyonları etkileyen önemli faktörlerdendir. Belirtilen faktörlerde oluşan eksiklikler metabolik kemik hastalıklarının (Paget hastalığı, hiperparatiroidizm ve osteoporoz gibi) oluşumuna neden olur. Vücuttaki bütün kemikleri etkileyen bu hastalıklar uzun kemikler ile kraniofasial kemikler için aynı derecede etkili olmamaktadır. Örneğin, deney hayvanlarında östrojen hormonu kısıtlaması ile oluşturulan osteoporoz hastalığı sonucu mandibulada görülen kemik kaybının femurda görülen kemik kaybına kıyasla çok daha az olduğu belirtilmiştir (81).

Paratiroid hormonun salınımında oluşan değişimin kemik yoğunluğu üzerine olan etkisinin değerlendirildiği bu çalışmada mandibulanın femur kadar etkilenmediği görülmüştür (81).

- 3) Kemik hücreleri, kemik iyileşmesini etkileyen diğer önemli faktördür (86). Yapılan alışmalar ile insan mandibulasında bulunan kemik hücrelerinin osteojenik potansiyelinin, iliak krette bulunan kemik hücrelerinin osteojenik potansiyelinden daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca mandibulada bulunan kemik hücrelerinin, osteoblastik diferansiyasyonda önemli rolü olan KMP-2'ye olan duyarlılığının, iliak krette bulunan kemik hücrelerinin duyarlılığından daha fazla olduğu rapor edilmiştir (81).
- 4) Osteoradyonekroz veya bifosfonata bağlı gelişen osteonekroz gibi kemik metabolizmasını etkileyen dış faktörlerin mandibula ve femur kaynaklı osteojenik hücreler üzerinde yarattığı etki birbirinden farklıdır. Bifosfonat kullanımına bağlı oluşan ALP salınımında ve hücre proliferasyon hızında görülen azalmanın, mandibula kaynaklı osteojenik hücrelerde femur kaynaklı osteojenik hücrelere kıyasla daha az olduğu görülmüştür. Osteoradyonekroz sonrası görülen iyileşme döneminde mandibula ve maksilla kaynaklı osteojenik hücrelerin, femur kaynaklı osteojenik hücrelere oranla daha hızlı yenilenebildiği rapor edilmiştir (81).
- 5) Uzun kemikler ile kraniofasial kemikler arasındaki hücresel farklılık osteoklastik diferansiyasyon ve fonksiyonlarda da gözlenmektedir. Preosteoklastların osteoklastlara diferansiye olup bütün fonksiyonel özelliklerini kazanmasında rol alan 2 temel yolak vardır. Bu yolaklar RANK/RANKL ve M-CSF yolaklarıdır. Yapılan çalışmalarda mandibula kaynaklı preosteoklastların sadece osteoblastlar tarafından sentez edilen RANKL aracılığı ile osteoklastlara dönüşebildiği gözlenmiştir. Ancak femur kaynaklı preosteoklastların lenfatik hücreler tarafından sentezlenen RANKL aracılığıyla da diferansiye olabileceği rapor edilmiştir (81). Bu nedenle femur kaynaklı preosteoklastlarda, osteoblast kaynaklı RANKL eksikliğinde osteoklastik diferansiyasyon görülebilirken, mandibula kaynaklı preosteoklastlar sadece osteoblastlar tarafından sentezlenen RANKL ile diferansiye olabilmektedirler.

Sıçan mandibulası modeli üzerine oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunması nedeniyle deney protokolünün tam olarak oluşturulması için deneylerimize başlamadan önce bir pilot çalışma gerçekleştirdik. Bu pilot çalışma sonucunda, 450-550 gram ağırlığındaki sıçanların mandibula boyutlarının oluşturacağımız KBD için yeterli büyüklüğe ulaştığını tecrübe ettik. Operasyon sırasında ve sonrasında gelişebilecek fraktür ihtimali, belirtilen kilo aralığındaki hayvanlarda ağırlığı düşük hayvanlara göre daha düşüktü.

Yaptığımız pilot çalışma sonucunda elde ettiğimiz bir diğer bulgu ise masseter kasının künt diseksiyonu ile operasyon sahasına ulaşımın, kasın keskin diseksiyonuna göre komplikasyonsuz iyileşme açısından daha güvenli olduğu idi. Sıçan mandibulasında gerçekleştirilen çalışmalarda cerrahi işlem sırasında masseter kası ile ilgili farklı tekniklere rastlanmaktadır. Chin ve ark. ve Benedicta ve ark. masseter kasında künt diseksiyon yapmayı tercih ederken, Adam ve ark. pterigomasseterik birleşim bölgesinden koterleyerek kemiğe ulaşmıştır (87-89). Sıçan mandibulası modeli ile ilgili olarak ayrıca, Adam ve ark. ve Benedicta ve ark. yaptıkları çalışmalarda lingual bölgede bulunan adductor mandible externus medialis kası ile kemik arasına periost elevatörünü yerleştirmişlerdir. Bu sayede hem mandibulayı desteklediklerini hem de lingual bölgede yer alan kasın zarar görmesini engellediklerini belirtmişlerdir (88, 89). Yaptığımız pilot çalışma sonucunda bu yöntemin daha travmatik olduğunu ve kas yapışıklıklarının sıyrılması ile mandibulanın beslenmesinin bozulacağını düşündüğümüz için deneylerde bu teknik tercih edilmedi (88, 89). Çalışmamıza benzer olarak Chin ve ark. lingual bölgeye müdahale etmeden yaptıkları çalışmada postoperatif dönemde, oluşturdukları bikortikal defekt sahasında iyileşmenin komplikasyonsuz geliştiğini bildirmişlerdir (87).

Sıçan mandibula modelinin kullanılması planlanan çalışmalarda dikkat edilecek bir diğer husus hayvanların postoperatif dönemde beslenmesidir. Postoperatif dönemde sıçanların beslenmesi ile ilgili literatürde farklı tercihler mevcuttur. Hoogeven ve ark. yaptıkları çalışmada standart laboratuvar yemine devam ettiklerini bildirmiştir (90). Adam ve ark. ise postoperatif bir hafta boyunca jel yem sonra yumuşak diyet tercih etmiştir (89). Yaptığımız pilot çalışma sonucunda yumuşak diyet ile beslenen sıçanlarda alt ve üst keser dişlerde ekstrüzyon görüldü.

Bu durum beslenmelerine engel olduğu için aşırı kilo kayıpları gözlemlendi. Çalışmamızda postoperatif dönemde beslenme sırasında mandibulaya fazla kuvvet gelmesini engellemek amacıyla özel hazır pelet yemler toz haline getirildikten sonra su ile karıştırılarak kalıp halinde kemirmeye uygun kıvamda hazırlanmasına dikkat edildi. Bu sayede sıçanların kemirme alışkanlıkları korunarak dişlerin ekstrüzyonu engellendi ve aşırı kilo kayıpları görülmedi.

Çalışmamızda oluşturulan 5 mm çapındaki bikortikal defekt, KBD olarak belirlenmiştir. KBD, vücudun kendi kendine tamir edemeyeceği minimum boyuttaki defekt olarak adlandırılmaktadır (91). Deney hayvanlarında oluşturulan KBD'nin çapı; canlının türüne, cinsine, yaşına, defektin oluşturulacağı anatomik bölgeye ve bölgedeki kortikal kemik yoğunluğuna bağlıdır (81, 91). Sıçanlarda KBD; kalvaryum için 8 mm, femur için 5-8 mm olarak rapor edilmiştir. Sıçan mandibulasında KBD değeri elde etmek için yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Adam ve ark. sıçan mandibulasında oluşturduğu 1 mm, 3 mm ve 5 mm çapındaki defektleri 12 hafta sonra MBT ile incelemiştir. Kemik köprülerin 1 mm ve 3 mm çapındaki defekt bölgelerinde olduğu ancak 5 mm çapındaki defekt bölgesinde oluşmadığı izlenmiştir (89). Chin ve ark. hipertansif sıçanlarda kemik iyileşmesini değerlendirdiği çalışmada kendiliğinden iyileşen defektlerin 4 mm ve daha küçük çaplı defektler olduğunu rapor etmiştir (87). Bu çalışmaların dışında yapılan diğer çalışmalar da sıçan mandibulasında KBD'nin 5 mm olduğunu desteklemektedir (90, 92, 93).

Araştırmamızda deneysel olarak oluşturulan defektlerin boyutunun seçiminde dokuların kendi kendini tamamen tamir edemeyeceği minimum boyut tercih edilmekle beraber, oluşturulan boyuttaki defekt bir takım olumsuzlukları da beraberinde taşımıştır. Çalışmamızda oluşturulan defektler çiğneme kuvvetlerine direkt olarak maruz kalmayacağını düşündüğümüz ramus içinde konumlandırıldı. Bununla beraber bölgedeki kemik kalınlığının bukko-lingual yönde ince olması ve oluşturulan defektin ramusta geniş bir alan kaplaması nedeniyle mandibular kemiğin kuvvetlere direnci azaltılmış oldu. Defektten başlayarak posterior yönde veya inferior yönde olmak üzere operasyon sırasında iatrojenik oluşan 8 fraktüre ilave olarak 3 hayvanda örneklerin alınması sırasında fraktür saptandı. Sıçan mandibulasında yapılması planlanan benzer çalışmalarda, fraktür olasılığının

azaltılması için bölgenin insan mandibulasında kullanılan rekonstrüksiyon plağına benzer işlev gören plaklama ile kemiğin mekanik kuvvetlere direncinin artırılması sağlanabilir.

Çalışmamızda gruplar arasında hem histolojik hem de radyolojik olarak karşılaştırma yapmak için kemik iyileşmesine izin verilen süre 6 hafta olarak belirlenmiştir. Sıçan mandibulasında oluşturulan kemik defektlerinin iyileşmesinin araştırıldığı diğer çalışmalarda iyileşmenin incelenmesinde farklı zaman dilimleri kullanılmıştır. Schliephake ve ark. sıçan mandibulasında oluşturduğu KBD'nin iyileşmesini postoperatif 6. haftada incelemiştir (92). Suzuki ve ark. OCP ile HA karışımının sıçan kalvaryumunda kemikleşmeye olan etkinliklerini postoperatif 3. ve 6. haftanın sonunda değerlendirmiştir (63). Kemik iyileşmesinin değerlendirildiği süre ile ilgili belirleyici olan diğer bir faktör ise kemik yoğunluğunun ölçümlenmesidir. Miguez ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan mandibulasında oluşturdukları defekt bölgesinin iyileşmesini postoperatif 2. haftada; Streckbein ve ark. ve Deconde ve ark. postoperatif 8. haftada; ve ark. postoperatif 2., 4. ve 12. haftada değerlendirmiştir (90, 93-95).

Çalışmamızda boş bırakılan defektlerde 6. hafta sonunda sadece fibröz doku gelişimi gözlenmiştir. Sadece HA ve sadece kemik greftinin kullanıldığı grupta yer yer sadece fibrokartilaj doku/ kemik gelişiminden daha fazla fibrokartilaj doku görülürken, HA ve kemik greftinin birlikte kullanıldığı grupta yer yer kemik gelişiminden baskın fibrokartilaj doku/fibrokartilaj doku gelişiminden daha baskın kemik doku oluşumu gözlenmiştir. Sadece HA kullanılan grup ile sadece kemik greftinin kullanıldığı grupta benzer seviyede kemikleşme gözlemekle beraber, literatürdeki veriler ışığında her iki biyomateryalin farklı mekanizmalarla fonksiyon gördüğünü düşünmekteyiz. Kemik grefti; kemik hücreleri, hücrelerin salgıladığı organik matriks, kandan gelen mineralize yapı ve kan damarlarının bölgede idamesi için bir iskelet yapı teşkil ederek osteokondüktif etki gösterir. 'Creepingsubstitution' adı verilen bir süreç ile kemik grefti zamanla rezorbe olarak yerini defektin periferinden yönelen yeni oluşan kemik ile yer değiştirir. HA ise bu iskelet şablon içinde hem yer tutucu olarak görev üstlenmekte hem de kemikleşmede rol alan hücrelerin, moleküllerin ve kan damarlarının oluşum ve organizasyonunu tetiklemektedir. Bu konu hakkında detaylı tartışma ilerleyen bölümlerde verilmiştir.

Bu nedenle HA ve kemik greftinin beraber uygulandığı gruptaki histolojik iyileşmenin bu iki materyalin tek tek kullanıldığı gruba göre daha fazla olmasının, arasındaki farkın, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, klinik olarak önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda 6. hafta sonunda en hızlı iyileşmenin görüldüğü grupta (Grup 3) MBT ile ölçülen kemik yoğunluğu ortalaması $242,56 \pm 2,80$ olarak bulunmuştur. MBT’de en yüksek kemik yoğunluğu referans değeri ise 256 idi. Buna göre 6 hafta süresi sonunda 5 mm çapındaki bir defektin biyomateryal katkısı ile iyileşmesi, iyileşmesini tamamlamış kemik yoğunluğuna oldukça yakındır. Çalışmamızda 6. haftanın sonunda incelenen kemik yapım belirteçleri yoğunluğu ise tüm gruplarda en yüksek seviyelerde çıkmıştır. HA’nın kemik iyileşmesini hızlandırması üzerine yapılacak ilave çalışmalarda biyomateryalin etkinliğinin hem tomografik olarak hem de immünohistokimyasal olarak 6 haftadan önce ve sonra olmak üzere farklı zaman dilimlerinde incelenmesinin yararlı olacağı kanaatindeyiz. Histolojik incelemeler için dekalsifikasyon işlemlerine tabi tutulan örneklerde kalsifiye materyal olan kemik grefti bölgeden uzaklaştırılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız insan kaynaklı DKK grefti partiküllerine histolojik incelemeler sırasında rastlanmazken MBT görüntülerinde, partiküllerin tamamen rezorbe olmadığı görülmüştür. Bu bulgudan postoperatif 6. hafta sonunda yerleştirilen partikül greftin henüz tamamen rezorbe olmadığı söylenebilir. Bölgeye yerleştirilen greftlerin tamamen rezorbe olma süresinin belirlenmesi için 6 haftadan daha uzun süreler beklenmesi gerektiği de ayrıca gözlenmiştir.

HA’nın vücudun farklı bölgelerinde oluşturulan defektlerdeki kemik iyileşmesi üzerine etkisi çeşitli çalışmalarca araştırılmıştır. Aslan ve ark. uzun kemiklerin encondral iyileşmesinde HA ve kemik greftinin etkinliğini karşılaştırmıştır. Tavşan tibiasında oluşturdukları 3 mm çap ve derinliğindeki defekt bölgesinde postoperatif 40. günde sadece kemik grefti kullanımında histolojik olarak fibrokartilaj doku ve fibrotik doku; HA ile kombine kemik grefti kullanımında ise fibrokartilaj doku ile yeni kemik doku oluşumu görülmüştür (8). Suzuki ve ark. sıçan kalvaryumuna OCP granülleri ile HA karışımının uygulamışlardır. Postoperatif 3. ve 6. hafta itibarıyla kemikleşme üzerine olan etkisinin, HA’nın özellikle kemikleşmenin erken dönemlerinde OCP’nin osteokondüktif etkinliğini artırdığı

yönde olduğunu belirtmişlerdir (63). Ayrıca, HA ve OCP granülleri karışımı kadar olmasa da HA'nın tek başına kemikleşmeyi artırdığı bildirilmiştir (63). Zou ve ark. yaptığı çalışmada, domuz lumbar bölgesinde oluşturulan defekt sahasında kök hücreler ile jel formundaki HA'nın etkinliğini karşılaştırmıştır. Postoperatif 21. günde defekt bölgesinde HA ile kök hücrelerin beraber kullanıldığı grupta görülen kemik oluşumu, sadece kök hücrelerin kullanıldığı gruba oranla daha fazla bulunmuştur (96). Sıçan mandibulasında oluşan defektlerde HA'nın tek başına veya kemik grefti ile beraber kullanımının kemik yapımı üzerine olan etkinliğinin karşılaştırıldığı araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular yukarıda bahsi geçen çalışmalarla uyumludur. Literatürde mevcut olan kimi çalışmalar ise çene kemiklerindeki defektlerin iyileşmesinde HA'nın kemik greftlerine bir üstünlüğünün olmadığını bildirmiştir. Segari ve ark. köpeklerde apikal rezeksiyon yapmış ve kemik defektlerinde sadece OCP ve OCP ile HA karışımının etkinliğini karşılaştırmıştır. Postoperatif 60. günde yeni oluşan kemik dokusu ve trabeküler kemik kalınlığı histolojik ve histomorfometrik analiz ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda her iki grupta da defekt alanlarının kemik ve fibrovasküler bağ dokusu oluşumu ile iyileştiği; OCP ile HA karışımının kullanıldığı grupta fibrotik vasküler yapının daha fazla yer tuttuğu ancak her iki grup arasında kemik iyileşmesi açısından anlamlı fark olmadığı görülmüştür. Araştırmacılar, elde ettikleri sonuç ile ilgili olarak HA'nın yeterli dozda kullanılmadığını düşündüklerini belirtmişlerdir (97). Kullanılan YMA HA'nın birlikte kullanıldığı materyal üzerindeki etkisini belirleyen bir diğer faktör ise yoğunluğudur. Çalışmamızda kullandığımız lifsi formda olan HA'nın yoğunluğu ile bahsi geçen çalışmada kullanılan HA yoğunluğu arasında direkt karşılaştırma yapmak güçtür. Bununla beraber çalışmamızda kullandığımız HA yoğunluğunun artırılmasının, HA'nın tek başına veya kemik grefti ile beraber kullanımı ile elde edilen pozitif sonuçları güçlendireceğini öngörmekteyiz.

Kemiğin organik matriksi olan osteoid, kollajen lifler ve non-kollajen protein moleküllerini içeren ESM'den oluşur. Kollajen lifler üzerinde kalsiyum ve fosfat tuzlarının birikimi ile kemiğin mineralizasyonu gerçekleşir. Osteoid formasyonu ve mineralizasyonunda osteoblastlar ve osteositler tarafından OPN ve diğer non-kollajen glikoproteinler sentezlenir. Kalsiyum bağlamada yüksek affinitesi olan OPN, hücreler ve Ha kristalleri arasında bir köprü görevi görerek osteoidlerin

mineralizasyonunda önemli rol oynar (22, 23, 84). Osteoklastlar tarafından da sentezlenen OPN, osteoklastların kemik duvarına tutunup rezorpsiyonu gerçekleştirmesinde de etkili olduğu düşünülen bir faktördür (98). Ayrıca, yine osteoblastlar tarafından sentezlenen ve aktif kemik yapımında kemik ESM'sinde seviyesi artan ALP'nin, osteoid mineralizasyonunda önemli rolü vardır (84). Kemik oluşumunda rol alan esas hücreler olan osteoblastlar, osteojenik hücrelerin diferansiyasyonu ile oluşur. OSX ise osteoblastların diferansiyasyonunda rol alan iki önemli faktörden biridir (99). Çalışmamızda bahsi geçen bu üç belirteç aktif kemik yapımının göstergesi olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda osteoblastik farklılaşmayı ve mineralizasyon oluşumunu gösteren belirteçler, kemik iyileşmesinin 6. haftasında incelenen bütün gruplarda orta şiddette pozitif/ şiddetli pozitif çıkmış olup gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Histolojik incelemede ise kemik iyileşmesini kemik grefti ve/veya HA uygulanan gruplarda boş bırakılan gruptan belirgin olarak daha yüksek seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Kemik oluşumunu yansıtan belirteçlerle ilgili bulgularımızın (özellikle ALP yoğunluğu) histolojik kemik iyileşmesi bulguları ile uyum içerisinde olmamasının birkaç açıklaması olabilir. Bunlardan bir tanesi HA'nın ve kemik greftlerinin kemik iyileşmesine katkılarının bu moleküllerin modülasyonu dışında farklı mekanizmalar aracılığıyla olması ile olabilir. Gruplar arasında istatistiksel anlamlılığa erişmeyen farkın bir diğer olası nedeni, çalışmamızda kullandığımız ölçümlendirme şekline kaynaklanabilir. Çalışmamızda belirteçlerin yoğunluğu immünokimyasal boyanmadaki yoğunluğun; negatif, hafif, orta ve şiddetli olmak üzere dördümlü Likert skalası kullanılarak subjektif olarak ölçümlendirilmiş; non-parametrik istatistiksel yöntemlerle analizleri yapılmıştır. Boş bırakılan defektlerde de vücudun kemik tamiri faaliyeti ile bölgede oldukça yüksek seviyeye ulaşan (en yüksek skor olan 3 üzerinden 2,25-2,50) belirteç yoğunluğu gözlenmiştir. İleride bu konuda yapılacak araştırmalarda bu belirteçlerin ordinal kodlama yerine sayısal değerlerle ölçümlendirilmesi ve parametrik yöntemlerle analizi, daha hassas sonuçlar çıkmasını sağlayabilir. Son olarak, kemik yapımını yansıtan bu belirteçlerin yoğunluğu, çalışmamızda ölçümlendirmeleri yaptığımız zaman dilimi (6 hafta) dışındaki bir zamanda gruplar arasında farklılaşabilir. Örneğin; OXS osteoblastların farklılaşmasını modüle ederken ALP ve OPN osteoid

mineralizasyonunda rol oynar. Dolayısıyla kemik oluşumunun farklı evrelerinde farklı yoğunlukta olmaları beklenir. Yine ileride yapılacak araştırmalarda her iki biyomateryalin kemik iyileşmesindeki etkinliklerinin, hem bu ve benzeri kemik oluşumu belirteçlerinin hem de diğer kemik yapımı ve mineralizasyon değerlendirmelerinin farklı zaman aralıklarında ölçümlendirilmesini önermekteyiz. Ölçümlendirmelerin farklı zaman aralıklarında değerlendirilmesi ile hem erken dönem hem de geç dönem kemik iyileşmesi sırasında HA'nın etkinliği hakkında daha fazla fikir sahibi olunmasında yardımcı olacağını düşünmekteyiz. Kemik iyileşmesi sırasında 4 haftalık sürede HA ile OPN arasındaki dengenin değerlendirildiği bir çalışmada iyileşmenin başlangıç aşamalarında HA yoğunluğunun arttığını; ilerleyen aşamalarında ise OPN seviyesinin arttığını göstermiştir. Kırık oluşumu sonrası 3-5 gün içerisinde oluşan granülasyon dokusunda bol miktarda HA mevcuttur. HA, yumuşak kallus içinde de yüksek miktarda mevcut iken sert kallusta azalır. Mineralize olmaya başlayan dokularda ve osteoklastların fonksiyon gördüğü yerlerde ise OPN sentezinin arttığı belirtilmiştir (100). Geç dönem iyileşmeyle ilgili olarak da, kemik grefti rezorbe olurken HA'nın kemik iyileşmesindeki etkisi postoperatif 6. hafta sonrasında da devam edebilir. İyileşmenin ileriki evrelerinde de ESM'de bulunan veya hücre içine alınan HA fragmanlarının kemik iyileşmesini modüle etmesi söz konusu olabilir.

Vücutta YMA olarak sentezlenen HA biodegradasyon ile fragmanlarına ayrılarak DMA HA formuna döner. HA her iki formunda farklı fonksiyonlar kazanarak kemik iyileşmesinde aktif rol oynar (9). HA, kemik dokusunda hücreler ile olan etkileşimini CD44 reseptörü aracılığı ile gerçekleştirir. YMA HA'nın bu reseptöre bağlandığı zaman hücrelerde oluşturduğu yanıt ile DMA HA'nın oluşturduğu yanıtın farklı olduğu düşünülmektedir (101). Kemik yapımının erken evrelerinde bölgede baskın olarak bulunan YMA HA, geç evrelerde fragmanlara ayrılarak DMA HA şeklinde mevcut olmaktadır. Granülasyon dokusu içinde bol miktarda bulunan YMA HA'nın, bu dokunun organize olmasında etkili bir faktör olduğu düşünülmektedir. Osteoprogenitör hücrelerin bulunduğu yerlerde YMA HA'ya rastlanmıştır. Osteoprogenitör hücrelerin diferansiye olup fonksiyon görmelerinin ardından YMA HA fragmanlarına ayrılır. Ortamda DMA HA miktarında artış olur. DMA HA, anjiojenik etkisi ile vaskülerizasyonda rol alır.

DMA HA ayrıca bölgeye enflamatuar hücrelerin göç etmesini sağlayan faktörlerin başında gelmektedir. Kırık iyileşme evrelerini birbirinden ayırmak mümkün değildir. Bu nedenle iyileşmenin görüldüğü farklı alanlarda aynı zaman dilimi içerisinde HA'nın ve fragmanlarının rol aldığı görülmüştür. Küçük fragmanlara ayrılan HA'nın daha sonra hücre içine alındığı düşünülmektedir. Kemik iyileşmesinin ilerleyen evrelerinde mineralizasyon oluşmaya başladıkça osteositlerin sitoplazmalarında DMA HA'ya rastlanmaktadır. HA'nın encondral iyileşme sırasındaki dağılımının araştırıldığı bir çalışmada fare tibiasında iyileşme hattındaki hipertrofik zonda bulunan lakünalarda bol miktarda HA saptamıştır. Kondrositlerin HA sentezleyerek, oluşturdukları hidrostatik basınç ile lakünaların çevresini genişlettiği ve bu sayede kartilaj matriksinin oluşumunda önemli rolü olan kollajenaz ve proteaz gibi enzimlerin sentezi için uygun alan elde edildiği bildirilmiştir. HA, rezorbsiyon zonunda yer alan lakünalarda görülmemekle beraber bu zonda yer alan osteoprogenitör hücrelerin stoplazmalarında izlenmiştir. HA'nın CD44 reseptörü aracılığı ile rezorbsiyon zonunda yer alan hücrelerce parçalandığı ve hücre içine alındığı düşünülmektedir. Rezorbsiyon zonunda yer alan hücrelerin osteoklastik aktivitelerinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu durumun nedeni, DMA HA'nın makrofajların osteoklastlara dönüşümünü tetiklemesi olarak yorumlanabilir (11). Bu bulguları destekleyici olarak Lee ve ark. in vitro ortamda yaptıkları çalışmada 50 kDa molekül ağırlığına sahip DMA HA'nın osteoklastik aktiviteyi artırdığını saptamıştır (10). Osteoklastlar kemik rezorbsiyonunu hücre zarının dantel kenar olarak adlandırılan bölümünde gerçekleştirir. Bu bölüm, salgıladığı enzimler ile parçalara ayırdığı moleküllerin basit hücre hareketleri ile hücre içine alınmasını sağlar. Bununla beraber osteoklastların kemik yüzeyine tutunmasına da yardımcı olur. Osteoklastların, kemik yüzeyine tutunmasında OPN gibi kemik matriks proteinlerinden de yararlandığı bilinmektedir. Priece, DMA HA'nın osteoklastların rezorbsiyon için salgıladığı enzimlerin diffüzyonunda ve kemik yüzeyine tutunmasında yardımcı olduğunu öne sürmüştür (55). Bu düşüncüyü destekleyen bir klinik çalışma sonucunda osteoartrit bulunan hastalarda HA'nın molekül ağırlığının ve yoğunluğunun azaldığı ve DMA HA'nın osteoklastik fonksiyonları artırdığı belirtilmiştir. Çalışmanın diğer önemli bulgusu ise YMA HA'nın, subcondral

osteoblastların proliferasyonunu artırdığı ve PGE₂ ve IL-6 gibi enflamatuar mediatörleri bağlayarak çöpçü görevi gördüğüdür (102).

YMA HA'nın osteoklastik aktiviteyi azalttığı, DMA HA'nın ise bu aktiviteyi artırdığına dair literatürde pek çok çalışma mevcuttur (11, 64, 67). Farklı molekül ağırlığına sahip olan HA'nın hücrel fonksiyonlar üzerine olan etkisinin incelendiği bir araştırmada, Chang ve ark. fare ve insan osteoklast öncül hücrelerinin kullanıldığı in vitro ortamda DMA HA (25 kDa) ile YMA HA'nın (1300 kDa), osteoklastların diferansiyasyonu ve proliferasyonu üzerine olan etkisini osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunda salınan tartarat dirençli asit fosfataz (TRAP) incelenerek araştırmıştır (66). DMA HA'nın bulunduğu kültürde TRAP aktivasyonunun çok yüksek olduğu ancak YMA HA'nın bulunduğu kültürde TRAP aktivasyonunun olmadığı görülmüştür. Bu durumun nedeni olarak YMA HA'nın TLR4 reseptörü aracılığı ile M-CSF yolağını baskılayarak öncül osteoklastların matür osteoklastlara dönüşümünde rol oynayan RANK metabolizmasını azaltması gösterilmiştir (66). RANKL, preosteoklastların yüzeyinde bulunan RANK reseptörüne bağlanarak osteoklastların maturasyonunda ve fonksiyonel özelliklerini kazanmasında önemli rol alan yolaktır. Ariyoshi ve ark. tarafından yapılan bir diğer in vitro çalışmada DMA HA (800 kDa) ile YMA HA'nın (9000 kDa) RANKL sentezi üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir (65). DMA HA'nın ortamda RANKL olmadan osteoklast diferansiyasyonunda etkili olmadığı ancak ortamda RANKL bulunduğu zaman osteoklast diferansiyasyonunu hızlandırdığı belirtilmiştir. RANKL tek başına TRAP aktivitesini artırmıştır ancak DMA HA ile birlikte bu aktivite 1,5 katına çıkmıştır. YMA HA'nın; RANKL sentezlenmesinde, TRAP aktivitesinde ve osteoklastik diferansiyasyonda rolünün olmadığı belirtilmiştir (65). Ariyoshi ve ark. konu üzerine yaptığı başka bir çalışmada YMA HA'nın (2500 kDa) CD44 reseptörü aracılığı ile RANKL salınımını inhibe ettiğini göstermiştir. Bununla beraber CD44 reseptör antagonistinin bulunduğu kültürlerde RANKL sentezinde azalma olmadığı belirtilmiştir (64). Öte yandan Cao ve ark. YMA HA'nın (2000 kDa) fare femuru kemik iliği kök hücrelerinde 7. haftanın sonunda CD44 reseptörü vasıtasıyla RANKL sentezinde etkili olduğunu görmüş, bu bulguyu HA'nın kemik metabolizması üzerinde ne derecede önemli rol aldığı şeklinde yorumlamıştır (67).

Huang ve ark. yaptıkları çalışmada farklı molekül ağırlığına sahip HA'nın sıçan kalvaryumundan elde edilen ve in vitro ortamda çoğaltılan mezenşimal hücreler üzerine olan etkinliğini karşılaştırmıştır (50). Kùltürlerde 7-20 gün arasında YMA HA'nın (2300 kDa) hücre proliferasyonunu, osteokalsin salınımını, mineralizasyonu ve ALP aktivitesini artırarak etki gösterdiği belirtilmiştir. DMA HA'nın (90 kDa) hücre büyümesini tetiklediği ve osteokalsin salınımını artırdığı ancak mineralizasyon ve ALP aktivitesi üzerine bir etkisinin olmadığı vurgulanmıştır (50).

HA'nın kemik döngüsü üzerine olan etkisi sadece hücresel boyutta değil kemik oluşumunda rol alan proteinler aracılığı ile de olmaktadır. Bu proteinlerin başında KMP gelmektedir. KMP, kemik metabolizması üzerine olan etkisini osteoblast ve osteoklastların diferansiyasyonunu ve proliferasyonunu düzenleyerek gerçekleştirmektedir (75). Bununla beraber mitojenik, kemotaktik, morfojenik ve apoptotik etkileri de vardır (103). Özellikle KMP-2 ve KMP-4'ün kemik dokunun gelişiminde, KMP-7'nin ise kırık dokunun gelişiminde daha etkili olduğu bilinmektedir (12, 29, 107). Luo ve ark. yaptığı çalışmada YMA HA'nın KMP-7'nin etkinliğini CD44 reseptörü aracılığı ile artırdığını belirtmiştir (12). Kawano ve ark. YMA HA'nın, KMP-2 kaynaklı osteoblastik diferansiyasyon üzerine olan etkisini incelemiş, KMP-2 kaynaklı gelişen osteoblastik diferansiyasyonun YMA HA (2000 kDa) varlığında daha hızlı olduğunu bulgulamıştır (75). Sıçan mandibulasında oluşturulan KBD iyileşmesi üzerine KMP-2 ve KMP-4'ün etkisinin karşılaştırıldığı bir araştırmada, YMA HA emdirilmiş süngerler KMP için zemin maddesi olarak kullanılmıştır. HA'nın hücre fonksiyonları için uygun bir ortam yaratarak diğer zemin maddesi olarak kullanılan materyallere göre kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin dönüşümünü daha çok tetiklediği belirtilmiştir (103). Kalsiyum fosfat ve HA'nın zemin maddesi olarak karşılaştırıldığı başka bir çalışmada HA kullanılan grupta kalsiyum fosfat kullanılan gruba göre %30 daha fazla kemik dokusu olduğu görülmüştür. Mezenşimal hücrelerin aktivitelerinde artışa sebep olan HA'nın zemin maddesi olarak kullanılıp esas materyali desteklemesinin yanı sıra osteogenezise direkt katılarak hücrelerin aktivitesini artıran bir faktör olduğu çalışma sonucunda rapor edilmiştir (104). Bernard ve ark. yaptığı çalışmada KMP-2'nin ve beraberinde kullanıldığı zemin maddelerinin (HA veya kollajen sünger) kemik yapımı üzerindeki

etkinliklerini karşılaştırmıştır. Zemin maddesi olarak HA'nın kullanıldığı grupta görülen kemik miktarının ve kemik yoğunluğunun kollajen süngerin kullanıldığı gruptan daha fazla olduğu izlenmiştir (105).

KMP'nin tek başına uygulandığı KBD'de postoperatif 4. haftada sadece yumuşak kallus oluşumunu başlatabildiği ve zemin maddesi ile birlikte kullanılmadığı sürece etkinliğinin yeterli olmadığı belirtilmiştir (99, 106). Çalışmamızda ve HA ile ilgili yapılan pek çok çalışmada HA'nın bir zemin maddesine ihtiyaç duyulmadan kullanıldığı görülmüştür. Sanz ve ark. sıçan kalvaryumunda oluşturdukları KBD'de içine uyguladıkları HA ve/veya KMP-2 etkinliğini kıyaslamışlardır. Postoperatif 8. haftanın sonunda HA'nın tek başına kullanıldığı bütün gruplarda kaliteli kemik oluşumu görülmüştür. HA ve 5 µg KMP-2 kullanılan grupta da benzer görüntülere rastlanmıştır (107). Aksine Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sıçan kalvaryumunda oluşturulan defektte postoperatif 4. haftada HA uygulanan grup ile boş bırakılan grup arasında fark gözlenmezken; HA, KMP-2 ve mezenşimal hücrelerin olduğu grupta oluşan kemik dokusunun diğer gruplardan belirgin şekilde daha fazla olduğu gözlenmiştir. Çalışmacılar bulguları HA'nın tek başına kemik formasyonunda rol alamadığı şeklinde yorumlamıştır (108).

Çalışmamızda yeni oluşan kemik mineralizasyon seviyesi MBT ile incelenmiştir. Yeni oluşan kemik dokusunda DGA değerleri defekt merkezine yakın olan alanda görülür iken YGA değerleri defekt sınırlarına yakın olan alanlarda saptanmıştır.

YGA değeri açısından sadece HA kullanılan grup ile HA ve kemik grefti kullanılan grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Sadece kemik greftinin kullanıldığı grup ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamış olup YGA değeri diğer 2 gruba göre düşük çıkmıştır. Başka bir ifade ile HA kullanılan çalışma grupları YGA değeri açısından diğer 2 gruptan farklı ve daha yüksek değere sahiptir. YGA, defekt sınırlarına yakın alanlardaki mineralizasyon seviyesini gösteren bir değerdir. Bu alanda vaskülerizasyon, defekt merkezine göre daha gelişmiştir. Bununla beraber defekt sınırının çatı alan oluşturması da mineralizasyonu kolaylaştıran diğer faktörlerdendir. Sadece greft materyali kullanılan grup

mineralizasyon seviyesi kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. HA'nın kullanıldığı çalışma gruplarında bu alanda mineralizasyon seviyesinin yüksek çıkmış olmasının pek çok faktör tarafından etkilendiğini düşünmekteyiz. Bernard ve ark. Pirc ve ark. yaptığı çalışmada negatif yüklü HA'nın pozitif yüklü iyonlara karşı affinitesinin olduğunu özellikle kalsiyum iyonunu bağlayarak Ha kristallerinin oluşmasında önemli etkisinin olduğunu belirtmiştir (109). Bu duruma ilave olarak YMA HA'nın, HA sentezini tetiklemesi ile ortamda YMA HA miktarının artacağı öngörülebilir. Bu sayede artmış YMA HA seviyesi ile HA'nın KMP gibi mineralizasyonda etkili proteinleri aktive etmesindeki ve Ha birikimini hızlandırmasındaki etkilerinde de artış görülecektir. YGA değerinin HA kullanılan her 2 grupta da diğer gruplardan daha fazla olmasının nedeni olarak bu faktörler gösterilebilir.

Çalışmamızda, DGA değeri açısından en yüksek değere sadece HA kullanılan grup sahip olmuştur. Sadece kemik grefti kullanılan grup ile HA ve kemik greftinin beraber kullanıldığı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ve sadece HA kullanılan gruptan daha düşük değere sahiptirler. Kontrol grubu ise en düşük DGA değerine sahip gruptur. Yeni oluşan kemik dokunun mineralizasyonu ile ilgili ortak teori; osteoid içinde bulunan matriks vezikülleri içeriğinin salınımına dayanır (84). Merkeze yakın alanlarda görülen mineralizasyon seviyesinin sadece HA kullanılan grupta en yüksek değere sahip olmasında bölgede oluşmuş olan zemin maddesi düşünülebilir. Sadece HA kullanılan grupta oluşan osteoid merkeze yakın alanlarda diğer gruplara göre daha yoğun ise HA'nın etkisi ile bölgedeki mineralizasyon seviyesinin diğer gruplardan yüksek olması beklenen bir durumdur. Bununla beraber tamamen rezorbe olmamış greft materyalinin bulunması bu durumu destekler niteliktedir. Osteokondüktif özellik taşıyan materyallerin yerini kemik dokuya bırakması kemik greftinin rezorbe olması ile mümkün olmaktadır. Greft materyallerinin tamamen rezorbe olmamış olması ile bölgede fiziksel olarak yer tutmaktadır. Bu nedenle henüz tamamen rezorbe olmadığı için mineralizasyon rezorbe olmuş olan boşluklarda gerçekleşmiştir. MBT görüntülerinde sadece greft materyali kullanılan grupta kemik greftlerinin bukkal ve lingual alanlarda bulunduğu merkeze yakın bölgelerde bulunmadığı görülmüştür. HA ve kemik greftinin kullanıldığı grupta ise kemik greftinin homojen olarak dağıldığı görülmüştür. Bu

durum YGA ve DGA değerlerinin gruplar arasındaki farklılığını destekler niteliktedir. Sadece kemik greftinin kullanıldığı grupta merkeze yakın alanlarda rezorbsiyon olmuş olup beraberinde mineralizasyonun da başladığı düşünölebilir. Ancak defekt sınırına yakın alanlarda kemik greftlerinin görölmesi rezorbsiyonun olmadığını göstermektedir. HA ve kemik greftinin beraber kullanıldığı grupta ise greft materyalinin homojen dağılımı ile her alanda eşit rezorbsiyon sağladığı düşünölebilir. DGA değerinin greft materyallerinin kullanıldığı gruplarda daha düşük olmasının nedeni olarak kemik greftinin tam olarak rezorbe olmaması gösterilebilir. Bu bilgiler ışığında HA'nın kan ile temas ettikten sonra jel halini alması ve adeziv özelliği sayesinde greft materyalinin homojen dağılmasını sağladığını söylemek mümkündür.

Tartışmanın önceki bölümlerinde bahsi geçen kemik greftinin rezorbe olarak yerine yeni yapılan kemikle yer değiştirmesi proçesi, defektin ve kullanılan greftin büyüklüğüne bağlı olarak aylar içinde gerçekleşir. Bu süre içerisinde greft materyali bölgede osteokondüktif etki yaratırken bir yandan da uzaysal olarak defektin kolaps olmaması için yer tutucu görevi görmüş olur. Vücutta doğal olarak bulunan HA'nın metabolizması oldukça kısadır (dermiste 1-2 gün, kartilaj dokuda 1-2 hafta). Çalışmamızda kullandığımız lifsi yapıya sahip olan HA, bakterilerden fermente yoluyla üretilmesi takibinde karboksil grubunun esterlenmesi suretiyle bağlanmışır. Yapısında oluşturulan bu değişim ile daha kararlı bir yapı kazanırken lifsi formu ile manöplasyonu daha kolay hale getirilmiştir. Sıvı formda üretilen muadillerine göre daha uzun sürede biodegrade olur. Bu kimyasal bağ sayesinde, dokuya uygulandığında hidrojel forma geçen bu biyomateryal, kademeli ve kontrollü olarak bünyesindeki HA'yı serbestleştirerek ortama salınımını gerçekleştirir. HA molekülünün serbestleşerek tamamen yıkıma uğraması 40 gün içinde olmaktadır. Çalışmamızda YMA HA (1300 kDa molekül ağırlığında) kullanılmışır. Dolayısıyla çalışmamızda kullandığımız formuyla YMA HA'nın uzun süreler ortamda kemik yapımına katkıda bulunduğunu belirtebiliriz. Bu durum, özellikle defekt sınırlarında, yeni kemik yapımının olduğu bölgede sentezlenen YMA HA'nın bulunmasıyla bölgede osteoklastik aktivitenin azalması beklenen bir sonuçtur. Kullandığımız biyomateryalin yüksek molekül ağırlıklı hali ile ortamda uzun süre yer alması osteoblastik aktiviteyi artırmasının yanı sıra, osteoblast kaynaklı sentezlenen

RANKL metabolizmasını da etkileyebildiği düşünülmektedir. Mandibula kaynaklı preosteoklastların sadece osteoblast kaynaklı RANKL kullanarak diferansiye olduğu belirtilmektedir (81).

HA, kan ile temas ettikten sonra jel haline geçip yer tutucu özelliği taşır. Bu nedenle YMA HA'nın etkinliği görülmekte ancak yer tutucu özelliği olduğu için tamamen rezorbe olduktan sonra kemik iyileşmesinde daha etkili bir hal alması beklenebilmektedir. Patterson ve ark. yaptıkları çalışmada yavaş biyodegrade olan YMA HA'nın degrade olduktan sonra kemik iyileşmesi üzerine olan etkisinin artacağını belirtmişlerdir (68). Farklı zamanlarda rezorbsiyonu gerçekleştiren 3 tip HA zemin maddesi olarak KMP-2 ile birlikte sıçan kalvaryumunda oluşturulan KBD'de kullanılmıştır. Bu materyaller hızlı orta ve yavaş degrade olabilen materyaller olup postoperatif 3. ve 6. haftalarda kemik oluşumları üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Bütün gruplarda 6. haftanın sonunda yeni oluşan kemik mineralizasyonu arasında fark görülmemiştir. Ancak hızlı ve yavaş degradasyon gösteren HA gruplarında diğer gruba göre kollajen oluşumunun daha düzenli olduğu görülmüştür. Çalışmacılar hızlı degrade olan HA'nın kemik formasyonunu hızlandırdığı ve erken kollajen oluşumunu tetiklediği, yavaş degrade olan HA'nın ise kemik formasyonunu daha yavaş ama kollajen depolayarak gerçekleştirdiğini düşünmüşlerdir. Yavaş rezorbe olan HA'nın yer tutucu özelliği nedeni ile tamamen rezorbe olmasının ardından boşlukların hızlı bir şekilde kemik dokusu ile dolacağını belirtmişlerdir (68).

Çalışmamızda kullandığımız HA'nın klinik kullanımı ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan biri Ballini ve ark. tarafından yapılmıştır (110). Araştırmacılar kemik içi defektlerde, DMA HA'nın esterlenmiş formunu otogreftler ile beraber kullanılarak kemik iyileşmesindeki etkisini değerlendirmiştir. Postoperatif 9. ayda alınan radyograflar ile kemik kazancının 2,6 mm olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu bulunmayan bu çalışmada sonuçlar, kemik kazancının ancak 0,5 mm olduğu membran ve otogreftin beraber kullanıldığı çalışmacıların benzer vakalarıyla kıyaslanmıştır. Bu sonuca dayanarak, DMA HA ile otogreftin birlikte kullanılmasının osteogenetik etkiyi ciddi oranda artırdığı öne sürülmüştür (110). Çalışmamızda kullandığımız YMA HA'nın kullanıldığı bir diğer çalışma Baldini ve ark. tarafından yapılmıştır (111). Çalışmada HA ile otogreftin

beraber kullanıldığı grup, sadece otogreftin kullanıldığı grup ile karşılaştırılmıştır. Her hastada iki adet ve aynı arka yapılan diş çekimlerini takiben çekim soketlerine HA ve otogreft kombinasyonu ile sadece otogreft uygulanmıştır. Postoperatif 4. ayda çekim soketlerinden alınan biyopsi sonucunda kemik iyileşmesinin HA ve otogreft kombinasyonu uygulanan grupta sadece otogreftin kullanıldığı gruptan daha üstün olduğu belirtilmiştir (111).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın bulguları sonucunda, HA'nın sıçan mandibulasında oluşturulan kemik defektlerinin iyileşmesinde tek başına kullanımında en az kemik grefti kullanımını kadar hızlandırıcı etkisinin olduğu; HA defektlerin mineralizasyon sürecinde kemik greftlerinden daha üstün olduğu görülmüştür. HA, çenelerde oluşan kemik defektlerinin tamirinde, tek başına veya kemik greftleriyle kombine olarak, umut vaat eden bir biyomateryaldir.

HA'nın tek başına uygulanmasında direkt çiğneme kuvvetlerine maruz kalmayacağı sinüs agümentasyonu gibi kavite tarzı defektlerin tamirinde kullanımının yararlı olacağını düşünmekteyiz. Mekanik kuvvetlere maruz kalacağı kret yükseltme ve genişletme gibi girişimlerde ise blok kemik greftlerine emdirilerek greftlerin etkinliğini artırmada uygulama alanı bulabilir.

Literatürde HA'nın çenelerdeki defektlerin tamirindeki etkinliği konusunda oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu bağlamda çalışmamız bulgularının literatüre önemli katkılar sağladığını düşünmekteyiz. Bununla beraber konunun araştırılmayı bekleyen birçok yönü bulunmaktadır. Bunlardan birkaçını sıralayacak olursak;

Bu biyomateryalin kemik defektlerinin tamirinde gerekli olan optimum yoğunluk ve moleküler ağırlığı ile ilgili olarak ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda oluşturulan KBD'de meydana gelen kemik iyileşmesi postoperatif 6. hafta olmak üzere sadece bir zaman periodu kullanılarak incelenmiştir. İncelenen biyomateryallerin kemik iyileşmesi üzerine etkisi farklı zaman aralıklarında ölçümlendirilebilir.

Çalışmamızda OPN, OSX ve ALP kemik iyileşmesini yansıtabilecek belirteçler olarak incelenmiştir. Bununla beraber HA farklı mekanizmalar üzerinde etki ederek kemik iyileşmesinde görev alıyor olabilir. HA ve/veya kemik greftlerinin çene kemiklerindeki defektlerin iyileşmesi üzerine olan etki mekanizması ilave çalışmalarla netlik kazanacaktır.

HA'nın sadece kemik greftleriyle değil diğer biyomateryallerle kombine kullanımının etkileri araştırmaya açıktır. Örneğin, çenelerdeki defektlerin tamirinde popüler olarak kullanılan plateletten zengin plazma (PZP) ile HA'nın bir arada kullanımını üzerine literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. HA'nın PZP içindeki büyüme faktörleri üzerinden farklı mekanizmaları tetikleme ihtimali olabilir.

ÖZET

Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Hyalüronik Asit ve/veya Kemik Grefti Etkinliklerinin Karşılaştırılması

Oral ve Maksillofasial Cerrahide kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu yaygın kullanım alanına sahiptir. Son yıllarda, çeşitli biyomateryallerin tek başına veya greft materyalleri ile beraber kemik iyileşmesini artırma kapasiteleri yoğun araştırma konusu olmuştur. Bu çalışmanın amacı, hyalüronik asit ve/veya kemik greftinin sıçan mandibulasında oluşturulan defektlerde kemik iyileşmesi üzerine olan etkinliğinin değerlendirilmesidir.

Prospektif ve randomize tasarlanan çalışmamıza 40 adet 12 haftalık 450-550 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan dahil edildi. Deney hayvanları her grupta 10 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Genel anestezi altında, ekstraoral yaklaşımla mandibula lateral yüzüne ulaşım sağlanması ardından, trefin frez yardımıyla ramusta 5 mm çapında bikortikal defekt oluşturuldu. Grup 1’de yer alan deneklerde oluşturulan defektler boş bırakıldı. Grup 2’deki deneklerde defektlere sadece kemik grefti; Grup 3’dekilere sadece hyalüronik asit; Grup 4’dekilere ise kemik grefti ve hyalüronik asit karışımı yerleştirildi. Doku katmanları süturlanarak bölge primer olarak kapatıldı. Her bir denekte uygulanan işlem karşı taraf mandibulada tekrar edildi. Postoperatif 6. haftanın sonunda hayvanlara ötenazi uygulandı. Mandibula sağ yarısından alınan örnekler boyanarak mikroskopik düzeyde kemik iyileşmesi açısından ve osteopontin, osteriks ve alkalin fosfataz yoğunluğu açısından incelendi. Mikroskopik kemik iyileşmesi 7’li skala ile immünokimyasal boyanma yoğunlukları 4’lü skala ile ölçümlendirildi. Sol yarıdan alınan örneklerin kemik mineralizasyonu mikrobilgisayarlı tomografi yardımıyla ölçüldü. Veriler Kruskal-Wallis ve Bunferroni-Dunn testleri ile analiz edildi.

Boş bırakılan defektlerde histolojik düzeyde kemik iyileşmesi en yüksek değeri 7 olan skalaya göre 1,25 iken sadece greft ve sadece hyalüronik asit yerleştirilen gruplarda 4,65; greft+hyalüronik asit yerleştirilen grupta ise 5,60 olarak ölçüldü. Boş bırakılan defektlerdeki iyileşme biyomateryal uygulanan defektlerdeki iyileşmeden anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$); ancak biyomateryal kullanılan gruplar arasındaki fark anlamlı düzeyde değildi.

Her bir gruptaki örneklerin osteopontin, osteriks ve alkalin fosfataz belirteçleri için boyanma yoğunlukları orta şiddette pozitif/şiddetli pozitif düzeyde olup gruplar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü. Örneklerde mineralizasyonu ölçümlendiren YGA değerleri en yüksek hyalüronik asit uygulanan (tek başına veya greft ile beraber) gruplara ait idi; diğer gruplarla arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı olarak en yüksek DGA değeri ise sadece hyalüronik asit kullanılan grupta izlendi ($p<0.05$).

Sonuç olarak, hyalüronik asit tek başına veya kemik grefti ile beraber kullanımında çene kemiklerinde oluşan defektlerin iyileşmesine pozitif yönde katkı sağlamaktadır.

Anahtar sözcükler: Hyalüronik asit, sıçan, mandibula, kemik defekti.

ABSTRACT

Evaluation of the Efficiency of Hyaluronic Acid and/or Bone Graft on Healing of Bone Defects

Reconstruction of bone defects is commonly employed in Oral and Maxillofacial Surgery practice. In recent years, several biomaterials, alone or in combination with bone grafts, have been the focus of research for their capacity to enhance bone healing. The aim of this study was to evaluate efficacy of hyaluronic acid with or without bone graft on the healing of bony defects created in the rat mandible.

In our prospective and randomized study, 40 Sprague- Dawley breed, 12-week old, 450-550 gram-weight male rats were included. Animals were divided into 4 groups having 10 rats. Under general anesthesia, following access to the lateral surface of the mandible through extra-oral approach, a 5 mm-diameter bicortical defect was created using a trephine drill. The defects in animals in Group 1 was left empty. Bone graft was placed into defects in animals in Group 2, hyaluronic acid was placed into those in Group 3 and graft and hyaluronic acid mixture was placed into those in Group 4. The wound was primarily closed by suturing tissues in layers. The same procedure was repeated on the other side for each animal. The animals were sacrificed at the end of postoperative 6-week. Samples taken from the right side of the mandible were stained and examined for microscopic bone healing and for the expression of osteopontin, osterix and alkaline phosphatase. Microscopic bone healing was scored using 7-point scale whereas intensity of immunohistochemical staining was scored using 4-point scale. Bone mineralization of samples from the left side was quantified using microcomputed tomography. Data were analyzed by Kruskal–Wallis and Bunnferroni-Dunn tests.

Using the scale in which the highest score is 7, healing in defects that was left empty had a score of 1,25 while those received either of the biomaterials alone had a score of 4,65 and those received both bone graft and hyaluronic acid had a score of 5,60. Healing of the defect that remained empty was significantly poorer than those in each of the groups that received biomaterials ($p < 0.05$); but no significant differences found between those received biomaterials either alone or in combination. Each group had a mean score of moderately positive/ severely positive intensity of staining for osteopontin, osterix and alkaline phosphatase, no difference between groups were obtained. Highest HGA for mineralization was achieved in those groups that received hyaluronic acid (alone or in combination with graft), the difference with the other two groups was significant ($p < 0.05$). Significantly highest LGA was achieved in the group that received hyaluronic acid alone ($p < 0.05$).

In conclusion, hyaluronic acid either alone or in combination with bone graft, positively contributes to healing of bone defects in jaws.

Key words: Hyaluronic acid, rat, mandible, bone defect.

KAYNAKLAR

1. Brydone AS., Meek D., Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Journal of Engineering in Medicine* 2010; 224: 1329-1343.
2. Shapino F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *European Cells and Materials* 2008; 15: 53-76.
3. Amini AR., Laurencin CT., Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: Recent advantages challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 2012; 40(5): 363-408.
4. Kaya A. Kemik defektlerinin iyileşmesinde rifamisin ile allojenik, alloplastik ve heterojen kemik greftlerinin etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi. Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Diyarbakır, (Prof. Dr. Beyza Kaya), 2013; 37-39.
5. Sfeir C., Ho L., Doll BA., Azari K., Hollinger JO. Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications, 2010; 2: 197-200.
6. Kawaguchi H., Nakamura K., Tabata Y., Ikada Y., Aoyama I., Anzai J., Nakamura T., Hiyama Y., Tamura M. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 86(2): 875-880.
7. Çakır O., Kazancıoğlu HO., Ak G. Diş hekimliğinde hyalüronik asidin yeri. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2011; 45(1): 37-41.
8. Aslan M., Simsek G., Dayi E. The effect of hyaluronic acid- supplemented bone graft in bone healing: Experimental study in rabbits. *Journal of Biomaterials Applications* 2006; 20: 209-220.
9. Vigetti D., Karousou E., Viola M., Deleonibus S., De Luca G., Passi A. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 2(1): 2452-2459.
10. Tolg C., McCarthy J. B., Yazdani A., Turley E. A. Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the 'cancerization' of stromal tissues. *Handawi Publishing Corporation BioMed Research International* 2014; 1-18.
11. Pavasant P., Shizari TM., Underhill CB. Distribution of hyaluronan in the epiphyseal growth plate: turnover by CD44-expressing osteoprogenitor cells. *Journal of Cell Science* 1994; 107: 2669-2677.
12. Luo N., Knudson W., Askew EB., Veluci R., Knudson CB. CD44 and Hyaluronan promote the bone morphogenetic protein 7 signaling response in murine chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology* 2014; 66(6): 1547-1558.
13. Necas J., Bartosikova., Brauner P., Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* 2008; 53(8): 397-411.
14. Kutlubay Z., Engin B., Serdaroğlu S., Tüzün Y. Hyalüronik asit dolgular. *Dermatoz* 2011; 2(1): 255-260.

15. Gökçimen A. Kemik Dokusu. İçinde: Genel Tıbbi Histoloji. 60, Isparta: S.D.Ü. Basımevi, 2006; s. 89-101.
16. Aydın BK. Pentoksifilin kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Baltalimanı Metin Sabancı Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Vedat Şahin), 2007; 2-36.
17. Çay HF., Sezer N. Kemik yapısı ve kemik döngüsü üzerine bir derleme. Fiziksel Tıp 2002; 5(3): 177-184.
18. Junqueira LC., Carneiro J. Kemik. İçinde: Temel Histoloji. Yener Aytekin, Seyhun Solakoğlu Editörler. 10. Baskı, İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2006; s. 135-145.
19. Hamdy NA., Papapoulos SE. Management of malignancy-associated hypercalcaemia. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism 2002; 1: 65-76.
20. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. Reviews in Endocrin and Metabolic Disorders. 2010; 11:219-227.
21. Zhou X., Zhang Z., Feng JQ., Dusevich VM., Sinha K., Zhang H., Darnay B. G., Crombrughe B. Multiple functions of osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 2010; 107(29): 12919-12924.
22. Desai B., Rogers ML., Chellaiah MA. Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. Molecular Cancer. 2007; 6(18): 1-16.
23. Gordjestani M., Dermaut L., De Ridder L., Thierens H., De Waele P., De Willy W., Bosman F. Osteopontin. and bone metabolism: a histology and scintigraphy study in rats. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 2005; 34(7): 794-799.
24. Kurban S., Mehmetoğlu İ. Osteoprotegerin, rank ve rankl ligandı. Türk Biyokimya Dergisi. 2007; 32(4): 178-184.
25. Babür C., Özcan G. Opg/rank/rankl'in periodontolojideki yeri. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi. 2010; 27(2): 137-144.
26. Jee WSS. Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology. In: Cowin SC Ed. Bone Mechanics Handbook. 2th. Ed., Florida: CRC Press, 2001; 1-68.
27. Denny HR., Butterworth S. A Guide To Canine and Feline Orthopaedic Surgery. 4th Ed. London: Blackwell Science, 2000; 3-17.
28. Kılıçoğlu SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 55(2): 143-150.
29. Hollinger JO., Buck DC. Applications in maxillofacial surgery and periodontics. In: Tissue engineering Bruder SP. Lynch SE., Genco RJ., Marx RE. London: Quintessence Publishing, 1995; p: 17-53.

30. Ozaki A. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop. Sci* 2000; 5(1): 64-70.
31. Jablanski S. *Illustrated Dictionary of Dentistry*. 2nd Ed. Philadelphia: Saunders Company, 1982.
32. Alfaro F.H., Pages C. M., Garcia E. Palatal core graft for alveolar reconstruction: a new donor site. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2005; 20: 777-783.
33. Kökden A., Türker M. Oral ve maksillofasial cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 1999; 2(2): 134-140.
34. Elsalanty ME., Genecov DG. Bone grafts in craniofacial surgery. *Craniofacial Trauma & Reconstruction* 2009; 2(3-4): 125-134.
35. Ashammakhi N, Chapter 7. In: *Topics in tissue engineering* Ferretti P. 2nd Ed. Volume I (Electronic book), 2003; 1-46.
36. Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2nd Ed., London: BC Decker Inc, 2004.
37. Adam J, Lawrence T., Steven R. Craniofacial Bone Grafting: Wolff's Law Revisited, *Craniofacial Trauma Reconstruction* 2008;1:49-62.
38. Amini AR., Laurencin CT., Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advantages and Challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2012; 40(5): 363-408.
39. Sanrı M. Cerrahi olarak oluşturulan kemik defektlerinde sığır kaynaklı anorganik kemik grefti ve kanama durdurucu bitki ekstresinin kombine kullanımının kemik rejenerasyonuna etkisi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Adana, (Prof. Dr. Mehmet Kürkçü), 2013; 8-9.
40. Şimşek A., Çakmak G., Cila E. Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi* 2004; 3(3-4).
41. Schwartz Z., Mellonig JT., Carnes OL. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J. Periodontol.* 1996; 67: 918-922.
42. Kaya Y., Şahin S. Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftlerinin periodontal kemik defektlerinde uygulanımı ve son gelişmeler. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2010; 34(1-2): 37-45.
43. Misch CE., Dietsch F. Bone grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.* 1993; 2: 158-167.
44. Tomlin E., Beksaç B., Lane JM., Amerika birleşik devletlerinde ortopedik girişimlerde otogreftlerin yerine kullanılan materyallere toplu bakış. *Artroplastik Artroskopik Cerrahi* 2002; 13(2): 114-129.
45. Turunen T., Peltola J., Helenius H., Yli-Urpo A., Happonen RP. Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and

- bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia Clin Oral Impl Res 1997; 8: 96-102.
46. Schepers EJG., Ducheyne P., Barbier L., Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: A new material for the repair of bone defects. Implant Dent 1993; 2: 151-156.
 47. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. J Postgrad Med 2002; 48(2): 142-148.
 48. Barboza E., Caula A., Machado F. Potential of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. Implant Dent 1999; 8(4): 360-367.
 49. Esko DJ., Kimata K., Lindahl U. Chapter 16. Essentials of Glycobiology. 2nd Ed., California: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009 p:16-22.
 50. Huang L., Cheng YY., Koo PL., Lee KM., Qin L., Cheng JC. Y., Kumta SM. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2003; 66(4): 880-884.
 51. Akgün I., Öğüt T. Osteoartrit tedavisinde viskosuplementasyonun yeri. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi 2002; 1(2): 60-65.
 52. Fraser JR. E., Laurent TC., Laurent UBG. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. Journal of Internal Medicine 1997; 242: 27-33.
 53. Meyer K, Palmer FW. The polysaccharide of the vitreous humor. Journal of Biology and Chemistry 1934; 107: 629-634.
 54. Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW. Nomenclature of hyaluronic acid. Biochemical Journal 1986; 242(2): 623.
 55. Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. BMC Musculoskeletal Disorders 2004; 5(12): 1-3.
 56. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. European Journal of Cell Biology 2004; 83: 317-325.
 57. Laurent TC., Robert J., Fraser E. Hyaluronan. FASEB Journal 1992; 6: 2397-2404.
 58. Noble PW., Liang J., Jiang D. Hyaluronan as an immune regulatory in human diseases. Physiological Reviews 2011; 91(1). 221-264.
 59. Dicker KT., Gurski LA., Bhatt SP., Witt RL., Jia X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. Acta Biomaterialia 2014; 10: 1558-1570.
 60. Robert L. Hyaluronan, a truly "youthful" polysaccharide. Its medical applications. Pathologie Biologie 2015; 63(1): 32-34.
 61. Yung S., Chan TM. Patophysiology of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis: the role of the hyaluronan. Journal of Biomedicine and biotechnology 2011; 1-11.

62. Du Souich P. Absorbtion, distribution and machanism of action of SYSADOAS. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 142: 362-374.
63. Suzuki K., Anada T., Miyazaki T., Miyatake N., Honda Y., Kishimoto KN., Hosaka M., Imaizumi H., Itoi E., Suzki O. Effect of addition of hyaluroic acids on the osteoconductivity and biodegradability of synthetic octacalcium phosphate. *Acta Biomaterialia* 2013; 9 (5): 1-13.
64. Ariyoshi W., Okinaga T., Knudson W., Nishihara T. High molecular weight hyaluronic acid regulates osteoclast formation by inhibiting receptor activator of NF-kB ligand through Rho kinase. *Osteoarthritis and Cartilage* 2014; 22: 111-120.
65. Ariyoshi W., Takahashi T., Kanno T., Ichimiya H., Takano H., Koeski T., Nishihara T. Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low moecular weight hyaluronic acid. *Journal of Biology and Chemistry* 2005; 280: 18967-18972
66. Chang EJ., Kim HJ., Ha J., Kim HJ., Ryu J., Park KH., Kim UH., Lee ZH., Kim HM., Fisher DE., Kim HH. Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via toll-like receptor 4. *Journal of Cell Science* 2006; 120: 166-176.
67. Cao JJ., Singleton PA., Majumdar S., Boudignon B., Burghardt A., Kurimoto P., Wronski TJ., Bourguignon YW., Halloran BP. Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through Cd44. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005; 20(1): 30-40.
68. Patterson J., Siew R., Herring SW., Lin ASP:, Guldberg R., Stayton PS. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials* 2010; 31(26): 6772-6781.
69. Rhodes JS., Ford TR., Lynch JA., Liepins PJ., Curtis RV. Microcomputed tomography: a new tool for experimental endodontology. *Int. Endod. J.* 1999; 32: 165-170.
70. Şahin FÜ., Topuz Ö. Diş hekimliği araştırmalarında mikrobilgisayarlı tomografi uygulamaları. *Acta Odontol. Turc.* 2014; 31(2): 114-120.
71. Gambill JM., Alder M., del Rio CE., Bedini R., Pemeijer CH., Somma F. Comparision of nickel titanium and stainless steel hand-file instrumentation using computed tomography. *J. Endod.* 1999; 22: 369-375.
72. Plotino G., Grande NM., Pecci R., bedini R., Pameijer CH., Somma F. three-dimensional imaging using microcomputed tomography for studying tooth macromorphology. *Eur. J. Dent. Educ.* 2006; 10: 52-59.
73. Yıldız ME. Yetişkin erkek haltercilerde ossa antebrachii ve ossa manusun multi dedektör bilgisayarlı tomografi ile üç boyutlu modellenmesi ve bazı biyometrik ölçüm değerleri ile ilişkisi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, (Prof. Dr. Kamil Beşoluk), 2013; 16-17.
74. Bouxsein ML., Boyd SK., christiansen BA., Guldberg RE., Jepsen KJ., Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using microcomputed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010; 25(7): 1468-1486.

75. Özeç İ., Yeler H. Bone morphogenetic proteinler ve osteoindüksiyon. Cumhuriyet Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi. 2013; 6(1): 31-36.
76. Hirsch JS., Ziegler N., Thiele S., Moeller S., Shcnabelrauch M., Hintze V., Scharnweber D., Rauner M., Hofbauer LC. Sulfated glycosaminoglycans support osteoblast functions and concurrently suppress osteoclasts. journal of Cellular Biochemistry, 2014; 115: 1101-1111.
77. Kopaladze RA. The experiments with laboratory animals from a bioethical point of view history, modern time, perspectives. Usp Fiziol 2004; 35: 92-109.
78. Zortuk M., Kıraç E. Laboratuvar hayvanlarının deneysel amaçla protetik diş tedavisi alanında kullanım prosedürleri. Sağlık Bilimleri Dergisi, 2010; 19(3): 226-231.
79. Öztuna V. Ortopedi ve travmatolojide kullanılan deneysel hayvan modelleri (Temel ilkeler, etik unsurlar ve modeller). TOTBID, 2007; 6(1-2): 47-55.
80. İnce N., Pazvant G. Ratlarda (wistar albino) mandibulanın morfometrisi. Istanbul Univ. Vet. Fak. Derg., 2010; 36(1): 51-56.
81. Chaichanasakul T Mandible versus long bone marrow stromal cells. A Dissertation Submitted in partial Satisfaction of The Requirements For The Degree Doctor of philosophy In Oral Biology. 2012; 1-22.
82. Yuehuei H An, Richard Freidman (eds): Animal models in orthopaedic research. CRC, Boca Raton, 1999; p:3-17
83. Gavriil A Ilizarov (ed): Transosseous osteosynthesis. Springer Verlag, Berlin, 1992; p: 10-18.
84. Aydın BK. Pentoksifilin kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. T.C.Sağlık Bakanlığı Baltalimanı Metin Sabancı Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Vedat Şahin), 2007; 2-36.
85. Shapino F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. European Cells and Materials 2008; 15-17
86. Us AK. Kırıklar hakkında genel bilgiler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü Ders Notları, Ankara, 2005.
87. Len Chin VK., Shinagawa A. Bone healing of mandibular criticalsize defects in spontaneously hypertensive rats. Oral Pathology. 2013; 27(5): 423-430.
88. Benedicta E., Anne G., Till K., Florian B., Ralf S., Merc C., Anke J., Jörg W., Thomas S. 3D-Tracking The Regenerative Potential OF Mandible with Micro-CT. Oral and Maxillofacial Surgery. 2014; 22(4): 123-127.
89. Adam S., DeConde M., Lee MK., Douglas S., Tara A., Lee M., Sotirios T., Kyle L., David E., Tristan G., Sepahdari AR. Defining the critical sized defect in a rat segmental mandibulectomy model. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2014; 140(1): 58-65.

90. Hoogeveen EJ., Gielkens PFM., Schortinghuis J., Ruben JL., Vivosorb1 as a barrier membrane in rat mandibular defects. An evaluation with transversal microradiography. *Oral & Maxillofacial Surgery*. 2009; 38: 870-875.
91. Aoboe M., Pinholt EM., Hansen EH. Healing of experimentally created defects: a review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1995; 33: 312-318.
92. Schliephake H., Zghoul N., Jager V., Van Griensven M., Zeichen J., Gelinsku M., Szubtarsky N. Bone formation in trabecular bone cell seeded scaffolds used for reconstruction of the rat mandible. *International Associations of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2009; 38: 166-172.
93. Miguez PA., Terajima M., Nagaoka H., Ferreira JAR., Braswell K., Ko CC. Recombinant biglycan promotes bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *Journal of Dental Research*. 2012; 93(4): 406-411.
94. Streckbein P., Jackel S., Malik CY., Obert M., Kahling C., Wilbrand JF., Zahner D., Heidinger K., Kampschulte M., Kuhnemann JP., Köhler K., Sauer H., Kramer M., Howaldt HP. Reconstruction of critical size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2013; 41: 496-503.
95. Deconde AS., Sidel D., Lee M., Bezouglaia O., Low K., Elashoff D., Grogan T., tetradis S., Aghaloo T., John MS. Bone Morphogenetic Protein-2 Impregnated Biomimetic Scaffolds Successfully Induce Bone Healing In A Marginal Mandibular Defect. *Laryngoscope*, 2013; 123: 1149-1154.
96. Zou, LJ., Zou, XN., Chen, L., Li H., Mygind, T., Kassem M., Bunger, C. The Effect of Hyaluronan on Osteogenic Differentiation of Porcine Bone Marrow Stromal Cells In Vitro. *Annual Meetin of Orthoapedic Research Society*. No: 0500.
97. Segari WAO., Radwan DAK., Hamid MA. The effect of adding hyaluronic acid to octacalcium phosphate on periapical tissue healing following periradicular surgery in dogs. *Tanta Dental Journal*, 2014; 11: 122-129.
98. Reinholt FP., hultenby K., Oldberg A., Heinegard D. Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. *Cell Biology*, 1990; 87: 4473-4475.
99. Nakashima K., Zhou X., kunkel G., zhang Z., Deng JM., Behringer RR., De Crombrugge B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002; 108: 17-29.
100. Yamazaki M., Nakajima F., Ogasawara A., Moriya H., Majeska RJ., Einhorn TA. Spatial and Temporal Distribution of CD44 and Osteopontin in Fracture Healing. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1999; 81(3). 508-515.
101. 105 Piloni A., Berbard GW. The effect of HA on mouse intramembranous osteogenesis in vitro. *Cell Tis. Res.*, 1998; 294: 323-333.
102. Julovi, SM., Yasuda, T., Shimizu, M., Hiramitsu, T., Nakamura, T. Inhibition of interleukin-1beta-stimulated production of matrix metalloproteinases by

- hyaluronan via CD44 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 516-
103. Arosarena O., Collins W. Comparison of BMP-2 and -4 for rat mandibular bone regeneration at various doses. *Orthod Craniofac Res*, 2005; 8(4): 267-276.
 104. Solchage LA., Dennis JE., Goldberg VM., Caplan AI. Hyaluronic acid based polymers as cell carriers for tissue engineered repair of bone cartilage. *J. Orthop. Res.* 1999; 17: 205-213.
 105. Bernard GW., Pilloni A., Kang M., Sison J., Hunt D., Jovanovic S. Osteogenesis in vitro and in vivo with hyaluronan and bone morphogenic protein-2. Elsevier Science, 2000; 12: 215-231.
 106. Issa JPM., Nascimento C., Iyomasa MM., Siessere S., regalo SC., Defino HL., Sebald W. Bone Healing Process In Critical Sized Defect by rhBMP-2 Using Poloxamer Gel and Collagen Sponge As Carriers. *ScienceDirect*, 2008; 29: 17-24.
 107. Van Leeuwen AC., Huddleston SJ., Gielkens PF., de Jong JR., Guided bone regeneration in rat mandibular defects using resorbable poly(trimethylene carbonate) barrier membranes. *Acta Biomaterialia*. 2012; 8: 1422-1429
 108. Kim J., Kim S., Cho TH., Lee BK., Hwang SJ., Tae G., Noh I., Lee HS., Park Y., Sun K. Bone Regeneration Using Hyaluronic Acid- Based Hydrogel With Bone Morphogenic Protein-2 and Human Mesenchymal Stem Cells. *ScienceDirect Biyomaterials*, 2007; 28: 1830-1837.
 109. Pirc ET., Zidar J., Bukovec P. A Computational Study of Calcium (II) and Cpoer (II) Ion Binding to The Hyaluronate Molecule. *Int J. Mol. Sci*, 2012; 13: 12036-12045.
 110. Ballini A., Cantore S., Capodiferro S., Grassi FR. Esterified Hyaluronic Acid and Autologous Bone In The Surgical Correction of The Infra-Bone Defect. *Int. J. Med. SCI*: 2006; 6 (2): 65-71.
 111. Baldini A., Zaffe D., Nicolini G. Bone-defects healing by high-molecular hyaluronic acid: preliminary results. *Annali di Stomatologia*, 2010; 1(1): 2-7.

EKLER

Ek 1.

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
DESTEKLEME PROTOKOLÜ

Toplantı Tarihi : 22.01.2014

Toplantı No: 2014/01

Proje No : 3850-D2-14
Proje Yöneticisi : Doç. Dr. Nurgül KÖMERİK
Yöneticinin Adresi : Diş Hekimliği Fakültesi, Klinik Diş Hekimliği Bilimleri
Proje Başlığı : Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Hyalüronik Asit Ve/veya Kemik Greflerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması
Yayın Şartı : SCI/SSCI/AHCI (Expanded Dahil) İndeksine Giren Yayın
Proje Bütçesi (TL) : 22.480,88
Proje süresi : Başlangıç Tarihi : 31.01.2014 Bitiş Tarihi: 30.09.2014 - 8 ay

Prof.Dr.Mehmet Cengiz KAYACAN
Rektör Yardımcısı
BAP Komisyon Başkanı

İMZA

Doç.Dr.Ahmet ŞAHİNER
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr.Abdullah Şevki DUYMAZ
Güzel Sanatlar Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr.Mustafa KOÇ
Eğitim Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr.Ramazan ERDEM Komisyon Üyesi

İMZA

Yrd.Doç.Dr.S.Zeynep ALPARSLAN GÖK
Komisyon Üyesi

İMZA

Prof.Dr.Süleyman SEYDİ
Sosyal Bilimler Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

İMZA

Prof.Dr.İbrahim DİLER
Su Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi(TZİNLİ)

İMZA

Prof.Dr.Kamil EKİNCİ
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr.Bahattin YAMAN
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr.Nejdet ADANIR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

İMZA

Prof.Dr.Hüseyin YORGANCIGİL
Komisyon Üyesi

İMZA

Prof.Dr.Fevzi BEDİR
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr.Fatma Handan GIRAY
Komisyon Üyesi

PROJE YÖNETİCİSİNE TEBLİGAT

Sayın: **Doç. Dr. Nurgül KÖMERİK**
Süleyman Demirel Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi

Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun yukarıdaki kararı uyarınca sunduğumuz projenin belirtilen şartlarda desteklenmesine karar verilmiştir.

Proje protokolünü imzalamak üzere aşağıda belirtilen tarih ve saatte Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nde hazır bulunmanızı rica eder, başarılarınızın devamını dilerim.

Tarih ve Saat :


Prof.Dr.Mehmet Cengiz KAYACAN
Rektör Yardımcısı
BAP Komisyon Başkanı

TC
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
PROTOKOLU

Proje No: 3850-D2-14

TARAFLAR:

1. Süleyman Demirel Üniversitesi adına hareket eden Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanı ile Proje Yöneticisi sıfatı ile hareket eden Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Diş Hekimliği Bilimleri adresinde çalışan görevli Doç. Dr. Nurgül KÖMERİK aşağıdaki şartlarla bir araştırma projesi destekleme protokolü yapılmıştır.

Protokolde S.D.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Komisyonu'na kısaca "BAP Komisyonu", Doç. Dr. Nurgül KÖMERİK kısaca "Proje Yöneticisi" diye anılacaktır.

PROTOKOLUN KONUSU:

2. Bu protokolün Konusu ekli Bilimsel Araştırma Projesi müracaat formunda ayrıntıları belirtilmiş "Kemik Defektlerinin iyileşmesinde Hyalüronik Asit Ve/veya Kemik Greftlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması ." Adlı projenin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından bu protokole belirtildiği şekilde desteklenmesidir.

PROJE YÖNETİCİSİNİN GÖREVLERİ:

3. Projenin protokole ekli araştırma projesi müracaat formunda belirtilen program içinde protokoledeki süre, amaç ve şartlara uygun olarak yürütülmesi, geliştirilmesi ve sonuçlandırılmasından proje yöneticisi sorumludur.

Desteklenmesi teklif ve kabul edilmiş projenin amaç, kapsam, süre, program ve bütçesinde BAP Komisyonunun yazılı izni alınmadan hiçbir değişiklik yapılamaz.

PROJE YARDIMCI PERSONELİNİN GÖREVLERİ

4. Yüksek lisans, doktora ve tıpta uzmanlık projelerinde yardımcı personel olarak görev alan lisansüstü öğrenciler bu protokolün 3. maddesi 1. paragrafındaki belirtilen şartlar için sorumludur.

ARAÇ GEREÇ VE DONATIM:

5. Proje için Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından sağlanan araç, gereç ve donatımın (kullanılması tamamen tüketilmesine bağlı olanlar hariç) mülkiyeti BAP Koordinasyon Birimine aittir. Projenin bitiminde mülkiyet hakkı saklı kalmak üzere bu türlü araç, gereç ve donatımın proje yöneticisi elinde bırakılması veya geri alınması BAP Komisyonu tarafından ayrıca karara bağlanır. Proje için sağlanmış ve tahsis edilmiş araç, gereç ve donatımın iyi şekilde muhafazasından, gerekli bakım ve onarımlarından proje yöneticisi sorumludur.

RAPORLARI

6. Proje yöneticisi projenin devamı süresince her 6 (altı) ayda bir çalışmalarının gidişi ve harcama durumlarıyla ilgili bir gelişme raporu ve ayrıca istenildiğinde proje ile ilgili ayrıntılı bilgileri BAP Komisyonuna vermekle yükümlüdür. Gelişme raporları 6 ayda bir verilmeyen projelerde harcama yapılmayacaktır.

BAP Komisyonu gerekli görürse projeye ilgili çalışmaların çalışma yerinde inceleyebilir. Bu durumlarda proje yöneticisi projeye ilgili her türlü teknik, idari ve mali bilgileri ve belgeleri incelemeye hazır bulundurmak ve incelemeyi kolaylaştıracak bütün yardımları yapmakla görevlidir.

Gelişme Rapor Tarihleri

I. Gelişme Rapor Tarihi: 31.07.2014	II. Gelişme Rapor Tarihi: 31.01.2015	III. Gelişme Rapor Tarihi: 01.08.2015
IV. Gelişme Rapor Tarihi: 31.01.2016	V. Gelişme Rapor Tarihi: 29.07.2016	VI. Gelişme Rapor Tarihi: 25.01.2017

7. PROJEDE GÖREV ALAN YARDIMCI PERSONELLER

Cansu Gül EFEYOĞLU

KESİN RAPOR

8. Proje yöneticisi projenin bitiminde bütün teknik ayrıntıları ve belgeleri kapsayan kesin raporu hazırlayarak BAP Komisyonu'na vermekle yükümlüdür.

Ayrıca Proje sonuçlarını ihtiva eden ve Süleyman Demirel Üniversitesi bilimsel makale esaslarına uygun biçimde hazırlanmış bir makaleyi de Üniversitenin periyodik yayınlarında yayınlamak üzere kesin rapora birlikte göndermekle görevlidir.

Ayrıca, yönetici isterse makalesini yurtdışında herhangi bir dergide Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklendiği

atıfta bulunularak yayımlanabilir.

GÜVENLİK TEDBİRLERİ:

9. Proje Yöneticisi, proje yerinde kazaları önleme ve sağlık şartları bakımından iş kanunu ve sosyal sigortalar kanunu ve ilgili diğer kanun, lüzük ve yönetmeliklere göre gerekli her türlü güvenlik tedbirlerinin alınmasından sorumludur.

GİZLİLİK:

10. Proje Yöneticisi, projeye ilgili olarak elde edilecek bilgilerin gizliliğinin korunması bakımından BAP Komisyonuna karşı sorumludur.

Proje kesin raporu BAP Komisyonu kabul ve durum tebliğ edilinceye kadar, proje yöneticisi veya projede çalışan diğer personel tarafından BAP Komisyonundan izin alınmadan, projeye ilgili haber veya beyanat verilemez, yayın yapılamaz, rapor açıklanamaz.

PERSONEL VE HARCAMALAR:

11. Projede çalışacak laborant ve teknisyen gibi yardımcı personeli ile tam zamanlı araştırmacılar proje yöneticisi tarafından bulunup seçilir ve proje müracaat formlerinde görevlendirilir.

Bu elamanlara yapılacak ödemeler ve proje bakımından gerekli başka harcamalar proje yöneticisi tarafından, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminden alınacak avansla karşılanabilir. Ücretler ve ödemelerden yapılacak gelir vergisi, sigorta primi, damga vergisi gibi her türlü kesintilerin yapılmasından ve gerekli mercilere yatırılmasından proje yöneticisi sorumludur.

DESTEK MİKTARI:

12. Projeyi desteklemek amacıyla BAP Koordinasyon Biriminden, ayrıntıları protokole ektir araştırma projesi müracaat formunda gösterilen toplam 22.480,88 TL destek sağlanacaktır.

ÖDEMENİN KESİLMESİ:

13. Sözleşme gereğince yapılan ödemelerin, proje amaç ve programına, sözleşme şartlarına uygun olarak kullanılmadığı; gelişme raporlarından istenen ayrıntılı bilgilerden, yapılan incelemelerden veya başka şekillerde anlaşılırsa veya proje gelişme raporları yapılan hatırlatmaya rağmen zamanında verilmez ise, başkaca ihbara lüzum kalmadan sözleşme gereğince yapılan ödemeler durdurulabilir. Başka talepler saklı kalmak üzere verilmiş araç, gereç, donatım derhal geri alınır. O güne kadar yapılmış tüm harcamalar sorumlulara faizi ile birlikte ödetilir.

YÜRÜRLÜK SÜRESİ:

14. Bu Protokol 31.01.2014 tarihinden 30.09.2014 tarihine kadar yürürlüktedir.

PROTOKOLUN UZAMASI:

15. Protokol süresinin uzatılması, uzatmanın proje yöneticisi tarafından protokol süresinin bitimi tarihinden 1 ay önce teklif edilmesine ve BAP Komisyonu tarafından uygun görülerek bu konudaki esaslar gereğince kararlaştırılmasına bağlıdır.

GÖREV YERİNİN DEĞİŞTİRİLMESİ:

16. Bu Protokolle ilgili yazışma ve tebliğat birinci maddede yazılı adrese yapılır. Proje yöneticisi adresini değiştirdiği takdirde bunu en geç 10 gün içinde BAP Komisyonuna bildirmeye mecburdur. Görev yeri değişikliği bildirilmezse eski görev yerine gönderilen yazı ve tebliğat o görev yerinde yapılmış sayılır.

PROTOKOL GİDERLERİ:

17. Protokol giderleri proje yöneticisine aittir.

YETKİLİ MERCİ:


18. Anlaşmazlık halinde yetkili merci, Isparta Mahkeme ve icra müdürlükleridir.



Proje Yardımcı Personeli
Cansu Gül EFEÖĞLU



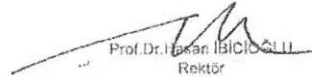
Proje Yöneticisi
Doç. Dr. Nurgün KCMERİK



HYGÜNDUR
27.02.2014

Prof. Dr. Mehmet Cangiz KAYACAN
Rektör Yardımcısı
BAP Komisyon Başkanı





Prof. Dr. Hasan İBİCİOĞLU
Rektör

Ek 2.



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 21438139 - 21
KONU: Etik Kurul Kararı

12/02/2014

SAYIN
Doç. Dr. Nurgül KÖMERİK
(SDÜ Diş Hekimliği Fak. Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D.)

İlgi: 21.01.2014 tarih ve 21 sayılı dilekçenize istinaden, 09.01.2014 tarih ve 04 sayılı karara ek olarak;

“Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Hyalüronik Asit ve/veya Kemik Greftlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması” başlıklı çalışma; değerlendirilmiş ve belirtilen öneriler ışığında kurulumuza tekrar sunulması Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 12 ŞUBAT 2014 tarih ve 06 sayılı kararı ile uygun bulunmuştur. Kararın bir örneği ekte sunulmuştur. Bilgilerinize rica ederim.

Doc. Dr. Etkan UZ
SDÜ-HADYEK Başkanı

Ek: 1 Adet HADYEK Kararı

Doc. Dr. Etkan UZ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
SDÜ-HADYEK Başkanı

ASLI GİBİDİR

02 -06- 2015

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

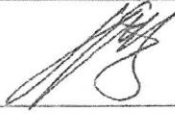
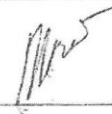
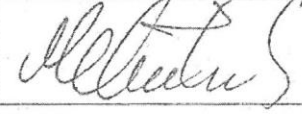
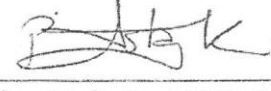


TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
12.02.2014	06	06

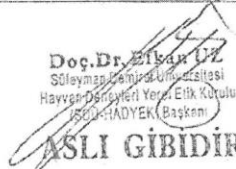
İlgi: 21.01.2014 tarih ve 21 sayılı dilekçenize istinaden, 09.01.2014 tarih ve 04 sayılı karara ek olarak;

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 12 ŞUBAT 2014 tarihinde Saat 14:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nurgül KÖMERİK'in yürütücüsü olduğu Prof. Dr. Özlem ÖZMEN, Prof. Dr. Hakan Hamdi ÇELİK, Yrd. Doç. Dr. Özgür KOŞKAN, Dt. Cansu Gül EPEOĞLU'nun yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Hyalüronik Asit ve/veya Kemik Greftlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması" başlıklı çalışma, değerlendirilmiş ve belirtilen öneriler ışığında kurulumuza tekrar sunulması uygun görülmüştür.

- 1- Mandibulamn her iki tarafında da işlem yapılacağı için, beslenme bozukluğunun etik kurulumuzca gözlenmesi adına pilot çalışma yapılması gerekmektedir. Bunun için 2 sıçan kullanılması, veteriner kontrolünde yapılan işlem sonrası en az 15 gün takip edilmesi uygundur.
- 2- Beslenme problemi olursa jel yemin denenmesi de önerilir.

Doç. Dr. Etkan UZ BAŞKAN	Prof. Dr. Münire ÇAKIR BAŞKAN YARDIMCISI	Doç. Dr. İbrahim. Metin ÇİRİŞ ÜYE
		
Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Gülnur ÖZGÜNER ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
	KATILMADI	KATILMADI
Öğr. Gör. İbrahim ONARAN ÜYE	Vet. Hekim İsmail UZ ÜYE	Ecz. Mustafa Serhan DERYAL ÜYE
		KATILMADI


Doç. Dr. Etkan UZ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
SDÜ-HADYEK (Başkanı)
ASLI GİBİDİR
02 -06- 2015

ÖZGEÇMİŞ

Elazığ'da 1986 yılında doğdum. İlkokulu Evren Paşa İlköğretim Okulu'nda; orta ve lise eğitimimi Elazığ Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden mezun oldum. 2011 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Ağız Diş ve Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimi almaya başladım.