

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

SIÇANLARDA FARKLI ŞİDDETTEKİ DARBELİ
ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMALARININ KEMİK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

DT. ÇAĞRI CAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR

2012-İSPARTA

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

SIÇANLARDA FARKLI ŞİDDETTEKİ DARBELİ
ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMALARININ KEMİK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

DT. ÇAĞRI CAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 2173-D-10 Proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez. No: 82

2012- ISPARTA

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; **Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 03 /09 /2012

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Timuçin BAYKUL

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Çetin KASAPOĞLU

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Zuhale YETKİN AY

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Fehmi ÖZGÜNER

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince benden bilgisini, emeğini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Bilge Çadır'a;

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum ve mesleki gelişimime büyük katkıları olan sayın Prof. Dr. Timuçin Baykul'a;

Eğitimim boyunca bana birlikte çalışma imkanı sağlayan, bilgi ve deneyimlerini aktarmaktan hiçbir zaman kaçınmayan sayın Yrd. Doç. Dr. Gülperi Koçer ve sayın Yrd. Doç. Dr. Müge Çına Aksoy'a;

Manevi desteklerini üzerimde hissettiğim ve birer ağabey gibi benden yardımlarını esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Uğur Burak Temel'e ve sayın Yrd. Doç. Dr. Ruhi Nalçacı'ya;

Doktora tezimi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne;

Tezimin deneysel kısmının gerçekleştirildiği Süleyman Demirel Üniversitesi, Deneysel Araştırma Laboratuvarı ve personeline;

Deneyler sırasında kullanılan cihazın tasarımı ve temini sırasındaki desteği nedeniyle sayın Teknisyen Sadettin Çöleri'ye

Araştırmamın histomorfometrik analizini yapan sayın Prof. Dr. Mustafa Cihat Avunduk'a ve histopatolojik analizini yapan sayın Doç. Dr. Vakur Olgaç'a;

Araştırma verilerimin istatistik analizini yapan sayın Yrd. Doç. Dr. Özgür Koşkan'a ve sayın Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Giriftinoğlu'na;

Birlikte çalıştığım asistan ve uzman arkadaşlarıma ve Ağız, Diş, Çene Cerrahisi AD ameliyathane ve klinik personeline;

Hayatım boyunca bana her bakımdan destek olan sevgili annem Makbule Can'a ve babam Münip Can'a;

Karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmem için bana var gücüyle destek olan, yıllardır iyi kötü her anımı paylaştığım ve ömrümün sonuna kadar yanımda olmasını istediğim Dr. Fatma Selen Özzeybek'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İç Kapak	i
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vi
Şekiller Dizini	viii
Resimler Dizini	ix
Tablolar Dizini	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemik Oluşumu ve Kemik İyileşmesi	4
2.1.1. İntramembranöz ve Endokondral Kemikleşme	5
2.1.2. Şekillenme (Modeling) ve Yeniden Şekillenme (Remodeling)	6
2.1.3. Kalsifikasyon	7
2.1.4. Kırık İyileşmesi ve Mekanizması	7
2.2. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler	9
2.2.1. Lokal Faktörler	10
2.2.2. Sistemik Faktörler	11
2.3. Kırık İyileşmesinin Değerlendirilmesi	12
2.4. Kırık İyileşmesinin Hızlandırılması	14
2.4.1. Kırık İyileşmesinin Hızlandırılmasının Önemi	14
2.4.2. Kırık İyileşmesinin Hızlandırılması Amacıyla Kullanılan Yöntemler	15
2.4.2.1. Medikal Uygulamalar	15
2.4.2.2. Fiziksel Uygulamalar	16
2.5. Kırık İyileşmesinde Elektromanyetik Alan Uygulamaları	18
2.5.1. Kemiğin Elektriksel Özellikleri	19
2.5.2. Elektromanyetik Alan Kavramı	20
2.6. Kırık İyileşmesinin Hızlandırılmasında Darbeli Elektromanyetik Uygulamaları	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Çalışma Planı	24
3.2. Deney Hayvanları	24
3.3. Cerrahi	25
3.3.1. Cerrahi Öncesi Hazırlık	25
3.3.2. Cerrahi Uygulama	28
3.3.3. Cerrahi Sonrası Bakım	32
3.4. Darbeli Elektromanyetik Alan Üretici	33
3.5. Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulaması	37
3.6. Histopatolojik ve Histomorfometrik Analizler	38
3.6.1. Örneklerin Hazırlanması	38
3.6.2. Histopatolojik Değerlendirme	39
3.6.3. Histomorfometrik Değerlendirme	40
3.7. İstatistik	42

4. BULGULAR	43
4.1. Deney Hayvanı ve Femur Örnekleri	43
4.2. Deney Hayvanı Ağırlığı	44
4.3. Histopatoloji	47
4.4. Histomorfometri	55
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
ÖZET	100
ABSTRACT	101
KAYNAKLAR	102
EKLER	118
EK 1: Deney Hayvanları Uygunluk Sertifikası	118
EK 2: SDÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Kararı	119
EK 3: SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolü	120
EK 4: SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı	121
ÖZGEÇMİŞ	122

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

%	: Yüzde
μm	: Mikrometre
μm^2	: Mikrometre kare
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
$^{\circ}\text{C}$: Derece Santigrad
A	: Amper
Ca	: Kalsiyum
cc	: Santimetre küp
cm	: Santimetre
d	: Damar
DEMA	: Darbeli Elektromanyetik Alan
DBM	: Demineralized Bone Matrix (Demineralize Kemik Matriksi)
f	: Fibrozis
FGF-2	: Fibroblast Growth Factor 2 (Fibroblast Büyüme Faktörü 2)
G	: Gauss
gr	: Gram
HADYEK	: Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu
HCl	: Hidroklorür
HE	: Hematoksilen Eozin
Hz	: Herzt
ICNIRP	: International Committe on Non-Ionising Radiation Protection (Non İyonize Radyasyondan Korunma Kuruluşu)
IEEE	: International Electric and Electronic Engineers Enstitute (Uluslararası Elektrik ve Elektronik Mühendisleri Enstitüsü)
IGF	: Insulin Growth Factor (İnsülin Büyüme Faktörü)
IL-1	: İnterlökin - 1
IL-6	: İnterlökin - 6
IM	: İntramuskuler

IP	: İnteraperitoneal
IV	: İntravenöz
i	: İltihap
kg	: Kilogram
kHz	: Kiloherzt
mA	: Miliamper
MANOVA	: Çok Değişkenli Varyans Analizi
mg	: Miligram
mHz	: Miliherzt
mm	: Milimetre
mT	: Militesla
n	: Nekroz
nm	: Nanometre
ob	: Osteoblast
ok	: Osteoklast
OPG	: Osteoprotegerin
PGE2	: Prostaglandin E2
SDÜ	: Süleyman Demirel Üniversitesi
T	: Tesla
TGF - β	: Transforming Growth Factor Beta (Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta)
TNF - α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
V	: Volt
VEGF	: Vascular Endotelial Growth Factor (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)
W	: Watt
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
yk	: Yeni kemik

Şekiller Dizini

Şekil 1	: Titanyum vida ve plak	30
Şekil 2	: Şematik Helmholtz bobinleri (a: yarıçap, b: düzlemlerarası uzaklık, z: elektromanyetik alan yönü, z: bobinlerin merkezi)	35
Şekil 3	: DEMA ölçüm düzeneği	36
Şekil 4	: Histopatolojik olarak iltihap varlığının gruplara göre dağılımı	53
Şekil 5	: Histopatolojik olarak nekrozis varlığının gruplara göre dağılımı	53
Şekil 6	: Histopatolojik olarak fibrozis varlığının gruplara göre dağılımı	54
Şekil 7	: Histopatolojik olarak yeni kemik yapımının gruplara göre dağılımı	55
Şekil 8	: Gruplara göre ortalama osteoblast sayısı	59
Şekil 9	: Gruplara göre osteoklast sayısı rank ortalamaları	59
Şekil 10	: Gruplara göre damar sayısı rank ortalamaları	60
Şekil 11	: Gruplara göre yeni kemik yüzey alanı rank ortalamaları	61

Resimler Dizini

Resim 1	: Genel anestezi için kullanılan ilaçlar (Alfazyne %2, Ketalar)	26
Resim 2	: Deneş hayvanı ağırlığı, kafesi ve numarası ile etiketlenerek içerisinde deneş hayvanını genel anestezi altına almak üzere anestetik solüsyon hazırlanmış insülin enjektörleri	26
Resim 3	: Ketamin ve Xylazin HCl solüsyonları hazırlanmış insülin enjektör ile IP enjeksiyon	27
Resim 4	: Dezenfeksiyonu sağlanan bölgenin tıraşlanması	27
Resim 5	: Deneş hayvanlarının aktarıldığı cerrahi saha	28
Resim 6	: Cilt insizyonu	29
Resim 7	: Tamamen açığa çıkarılan femur ve alüminyum foliyo ile izole edilmesi	29
Resim 8	: Çift taraflı klemplerle sabitlenen femur	30
Resim 9	: Plağın yerleştirilmesi	31
Resim 10	: Osteotomi sonrası kırık parçaların miniplak ve vida ile fiksasyonu	31
Resim 11	: İnsizyonun hattının suture edilmiş hali	32
Resim 12	: Postoperatif uygulanan tramadol hidroklorür ve amikasin sülfat	33
Resim 13	: Darbeli elektromanyetik alan cihazı (EMTS 3005S)	34
Resim 14	: Deneşde kullanılan bobinlerden bir tanesi	35
Resim 15	: Şiddet ölçüm cihazı, Teslametre	36
Resim 16	: Cihaz ve uygulama sırasında kutuların görüntüsü	37
Resim 17	: Farklı şiddetlerde DEMA uygulanan 5'erli gruplar	38
Resim 18	: Osteoblast (ob), osteoklast (ok), damar (d) ve yeni kemik (yk) yapımının işaretlendiği bilgisayar görüntüsü	41
Resim 19	: Yeni kemik yapımı olan bölgeye ait yüzey alanının histomorfometrik analizi	41
Resim 20	: Kontrol grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık kemik hattına komşu yüzeylerde yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X100)	47
Resim 21	: Kontrol grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık kemik uçları arasında fibröz doku (f) ile birlikte kırık hattına komşu yüzeylerde yeni	48

	kemik yapımı (yk) (H-E, X100)	
Resim 22	: 0.2 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Mikro vidanın geçtiği alan siyah kalın oklarla gösterilmiştir. Vidanın geçtiği alanlarda yer yer nekrotik dokular (n) ve iltihabi dokular (i), kırık kemik hattına komşu yüzeylerde yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X40)	48
Resim 23	: 0.2 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık kemik uçları arasında yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X100)	49
Resim 24	: 1 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık parçalar arasında yeni kemiğe (yk) dönüşmekte olan hyalin kırıkta ve fibröz dokular (f) (H-E, X100)	49
Resim 25	: 1 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık parçalar arasında köprü şeklinde yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X100)	50
Resim 26	: 2 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık parçalar arasında yoğun fibröz doku (f) oluşumu (H-E, X100)	50
Resim 27	: 2 mT grubundan alınmış histopatolojik kesit. Yeniden şekillenme alanlarındaki osteoklastik aktivite (H-E, X400)	51
Resim 28	: Kontrol grubuna ait histopatolojik kesit (ob, ok, yk) (H-E, X200)	56
Resim 29	: 1 mT grubuna ait histopatolojik kesit (ob, ok, yk, d) (H-E, X200)	56
Resim 30	: Yeni kemik yapımı gözlenen alanın bilgisayar programındaki görüntüsü	57

Tablolar Dizini

Tablo 1	: Araştırma gruplarını oluşturan kontrol ve çalışma grupları	25
Tablo 2	: EMTS 3005S cihazının teknik zellikleri	34
Tablo 3	: Defekt alanında kemik yapımı değerlendirmesi	40
Tablo 4	: Çalışmada kullanılan deney hayvanı, femur sayısı ve çalışmaya dahil edilen femur sayısı (Deney hayvanı veya femur sayısı (n))	43
Tablo 5	: Çalışma dışı bırakılan femurların gruplara göre dağılımı (Femur sayısı (n))	44
Tablo 6	: Preoperatif ve postoperatif deney hayvanı ağırlıkları	46
Tablo 7	: Histopatolojik bulguların skorlanması	51
Tablo 8	: Gruplara ait histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirmesi (n= deney hayvanı sayısı)	52
Tablo 9	: Gruplara ait histomorfometrik bulguların istatistiksel değerlendirmesi	58
Tablo 10	: Histomorfometrik parametreler arası korelasyon tablosu	62

1. GİRİŞ

Travma ya da patolojik bir olay sonucu, makroskopik veya mikroskopik düzeyde kemik bütünlüğünün bozulmasına kemik kırığı denir. Kırık oluşumunu takiben karmaşık hücresel ve biyokimyasal değişiklikler ile birlikte kemiğin yapısal bütünlüğü ve fonksiyonlarının yeniden kazanılmasına yönelik süreç ise kırık iyileşme sürecidir.

Uygun tedavi protokolleri uygulandığında kırıkların çok büyük bir kısmı sorunsuz bir şekilde iyileşmektedir; ancak yaş, direnç, sistemik hastalıklar, kırığın şekli, lokal ve genel hastalıklar gibi birçok faktör kırık iyileşmesini etkileyebilmekte ve bunların bir kısmında kırığın kaynamaması (nonunion) veya geç iyileşmesi gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Ryaby 1998, Griffin et al. 2008). Sağlıklı bir iyileşme olmaması sonucu hem bireylerin ağrı şikayetleri devam etmekte ve günlük aktivitelerine dönememekte hem de medikal harcamaların artmasıyla toplum üzerinde bir yük oluşturmaktadır. Her yıl dünyada milyonlarca, Türkiye’de de yüz binlerce kırık vakası meydana gelmektedir. Bu sebeple iyileşmeyen veya geç iyileşen kırıkların tedavisi ve normal iyileşme sürecinin hızlandırılması amacıyla araştırmacılar çeşitli tedavi yaklaşımları üzerinde çalışmaktadırlar (Lind et al. 1993, Delgado et al. 1998, Azuma et al. 2001, Hsu et al. 2003, Hannemann 2011). En sık uygulanan tedavi yöntemleri, vitamin ve mineral uygulamaları (Delgado et al. 1998, Borrelli et al. 2003), büyüme faktörü uygulamaları (Lind et al. 1993, Gong et al. 2003), şok dalga tedavisi (Hsu et al. 2003), düşük enerjili lazer uygulaması (Garavello et al. 2003), hiperbarik oksijen tedavisi (Gill and Bell 2004) ve ultrason uygulaması (Azuma et al. 2001) şeklinde sıralanabilir. Sık kullanılan ve üzerinde çalışılan fiziksel yöntemlerden bir diğeri de elektriksel ve elektromanyetik uyarı uygulamalarıdır (Law et al. 1985, Midura et al. 2005, Gupta et al. 2009, Hannemann et al. 2011).

Kırık iyileşmesinde elektriksel uyarı yöntemlerinin kullanımı 1950’li yıllarda kemiğin elektriksel özelliklerinin bulunmasıyla başlamıştır (Fukada and Yasuda 1957). Deformasyona veya uygulanan yük ve gerilime bağlı oluşan elektrik potansiyellerin, kemik onarımında ve yeniden şekillenmesinde hücresel aktiviteleri

düzenleyen temel sinyaller olduğu hipotezi kemiğin elektriksel özelliği varsayımına dayanmaktadır (Bassett et al. 1974, Singh and Saha 1984, Otter et al. 1998, Trock 2000). Bu yöntemler içerisinde elektromanyetik alan uygulamasının kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi olduğu yine birçok çalışmada rapor edilmiştir (Bassett 1984, Ottani 1991, Matsunaga et al. 1996, Midura et al. 2005, Erdem 2006, Gupta et al. 2009). Bununla birlikte söz konusu olumlu etkinin mekanizması halen tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, hücresel ve biyokimyasal düzeyde olmak üzere farklı mekanizmalar ortaya atılmıştır (Binderman et al. 1985, Giugni et al. 1987, Chang et al. 2004, 2006). Elektromanyetik alan uygulamalarının olumlu etkilerinin yanı sıra kemik iyileşmesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı (De Barros Filho et al. 1992) veya olumsuz etkileri olduğuna dair çalışmalar da bulunmaktadır (Muhsin et al. 1991, Leisner et al. 2002). Literatürde, elektromanyetik alan uygulamalarına ilişkin farklı görüşler bulunmasına rağmen, kırık iyileşmesinde düşük frekanslı ve darbeli manyetik alan uygulamalarının tedaviyi hızlandırıcı özelliği genel olarak kabul görmektedir (Bassett et al. 1974, 1984, Pienkowski et al. 1994, Satter et al. 1999, Aaron et al. 2004, Lin and Lu 2010). Bu özelliklere sahip elektromanyetik alan ile tedavinin sadece hedef organa etki etmesi, hasta konforunu artırması, cerrahi müdahale veya anestezi gerektirmemesi ve tedavi giderlerini düşürmesiyle avantaj sağladığı bildirilmiştir (Pienkowski et al. 1994, Aaron et al. 2004).

Elektromanyetik alan uygulamaları yapısında frekans, dalga boyu, süre, tekrarlama sıklığı, uygulama şiddeti gibi birçok farklı etkili parametreler bulundurmaktadır. Bu nedenle her bir parametrenin elektromanyetik alan tedavisi uygulamalarındaki etkisini kesin olarak belirlemek için ne kadar fazla araştırma yapılırsa o kadar etkili ve sabit tedavi protokolleri geliştirmeye yönelik bilgiye ulaşılabılır.

Darbeli elektromanyetik alan (DEMA) uygulamasının kemik iyileşmesi üzerine etkisini araştıran çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte (Sharrard 1990, Midura et al. 2005, Gupta et al. 2009), kırık iyileşmesi üzerinde en olumlu iyileştirici etkiyi sağlayacak frekans, yoğunluk ve süre ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle sunulan çalışmada, sıçanlarda osteotomi yöntemi ile kontrollü olarak oluşturulan femur kemiği kırıklarının 15 Hz sabit frekansta 0.2 mT

(2 Gauss), 1 mT (10 Gauss), 2 mT (20 Gauss) olmak üzere üç (3) farklı şiddette DEMA uygulamasının kemik iyileşmesi üzerindeki etkisinin histopatolojik ve histomorfometrik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Oluşumu ve Kemik İyileşmesi

Kemik vücudun iskelet yapısını oluşturan özelleşmiş mineralize bağ dokusudur. Kemik dokusu vücut ağırlığının taşınması ve kas faaliyetlerinin yapılması için mekanik destek sağlamanın yanında hayati önem taşıyan iç organlar için koruyucu bir kalkan görevi görmektedir. Kalsiyum, fosfat ve diğer iyonlara ait bir depo olarak iş görmesinin dışında, bu önemli iyonların vücut sıvılarındaki konsantrasyonlarının sabit tutulabilmesi için, kontrollü olarak salıverilmelerini ya da tutulmalarını sağlar.

Kemik kesiti makro düzeyde incelendiğinde, dış yüzeyde boşluk içermeyen çok yoğun alanlar (kompakt kemik) ve birbirine açılan boşluklar şeklinde poröz alanlar (kansellöz veya spongios kemik) görülebilir. Mikroskopik olarak da iki tür kemik vardır: Bunlar, olgunlaşmamış (birincil, örgü) kemik ve yetişkin (ikincil, lamelli) kemik olarak adlandırılırlar.

Eklem yüzeyleri dışında tüm kemik yüzeyleri, osteojenik potansiyele sahip olan ve kemiklerin genişlemesine olanak sağlayan periost (periosteum) olarak adlandırılan, özelleşmiş sıkı bir bağ dokusu tabakası ile kaplıdır. Endost (endosteum) ise periosta benzeyen, fakat daha az gelişmiş olan ve kemiğin iç boşluğunu döşeyen diğer bir bağ dokusu tabakasıdır.

Kemik hücreleri; matriks içinde laküna adı verilen boşluklarda bulunan osteositler, matriksin organik kısımlarının sentezini yapan osteoblastlar ve kemik dokusunu eriterek yeniden modellenmesi ile ilgili, çok çekirdekli dev hücreler olan osteoklastlardır. Bunların dışında kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenşim hücre toplulukları vardır. Bu hücrelere osteoprogenitör veya osteojenik hücreler denir.

Kemik, vücutta dış minesinden sonra en sert dokudur. Kemik, kaba şeklienden mikroskopik yapısına kadar tüm organizasyon seviyelerinde, hafifliği, esnekliği ve dayanıklılığı ile çoğu materyalden üstün özellikler gösterir. Bu sertliğine ve dayanıklılığına rağmen hayat boyunca yıkılıp yapılabilen oldukça canlı ve dinamik

bir dokudur. Cerrahi girişimlerde şekil değiştirebilir; hormonal, metabolik ve beslenmeye bağlı olarak belirgin şekilde etkilenir. Basınç uygulandığı zaman rezorpsiyon olabildiği gibi gerilim kuvvetleriyle de yeni kemik oluşumu sağlanabilmektedir. Kemik oluşumu ve kemik iyileşmesi ile ilgili olarak belirtilen tüm bilgiler Gartner and Hiatt (1997), Çetingül (2002), Miloro et al. (2004), Akay (2006), Gökçimen (2006), Junqueira and Carneiro (2009), Yıldırım ve ark. (2009), Weinstein and Buckwalter (2009) 'nin kitaplarından ve Parfitt (1994), Einhorn et al. (1995), Cormack (1997), Einhorn (1998), Marsh and Li (1999), Remedios (1999), Buckwalter et al. (2000), Morley et al. (2001), Cao et al. (2002), Kılıçoğlu (2002), Koivukangas (2002), Katagiri and Takahashi (2002), Cornell (2004), Erdoğan (2007), Cannon (2008), Manolagas and Parfitt (2010)' in yayınlarından elde edilmiştir.

2.1.1. İntramembranöz ve Endokondral Kemikleşme

Kemik her zaman, önceden o bölgede bulunan bir çeşit destek dokusunun değişikliğe uğramasıyla oluşur. Kemik oluşumuna osteogenez denir. Kemik oluşumu için iki yol tanımlanmıştır: İntramembranöz kemikleşme ve endokondral kemikleşme. Her iki yolda da, ortaya çıkan ilk kemik birincil kemiktir. Birincil kemik geçici bir dokudur ve kısa sürede ikincil kemikle yer değiştirir. Kemiğin büyümesi sırasında, birincil kemik alanları, rezorpsiyon bölgeleri ve ikincil kemik alanları yan yana görülür. Kemiğin sentezlendiği ve ortadan kaldırıldığı bu bileşim, büyüyen kemiklerin dışında yetişkinlerde de hayat boyu meydana gelir; ancak yetişkinlerdeki hızı oldukça yavaştır.

Nadiren, patolojik durumlarda kemik dokusu dışındaki dokularda da kemik oluşumu görülebilir. Normal olmayan bu kemik oluşumuna ektopik kemik oluşumu adı verilir.

İntramembranöz kemikleşme, osteoblastların salgıladıkları matrikse doğrudan minerallerin çökmesiyle oluşan kemikleşme tipidir. Yassı kemiklerin çoğu ile maksilla ve mandibulanın bazı kısımları bu tür kemikleşme ile meydana gelir. Mezenşimal hücrelerden farklılaşan osteoblastlar kemik matriksini meydana

getirirler ve trabekül ve spiküller arasında yüzeyinde bu hücrelerin yoğunlaştığı bir ağ meydana gelir. Mezenkim dokusunun yoğunlaştığı tabakada osteogenezisin başladığı noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Kemikleşme merkezinde bu tür birkaç grup neredeyse aynı zamanda ortaya çıkar, bunların duvarları birleştiğinde kemik süngerimsi yapıya kavuşur. Büyüyen kan damarları ve farklılaşmamış mezenşim hücreleri, kemik duvarları arasında kalan bağ dokusu içine girerek kemik iliği hücrelerini oluşturur.

Vücuttaki uzun ve kısa kemiklerin çoğu endokondral kemikleşme ile meydana gelir. Endokondral kemikleşme meydana getirilecek kemiğin şeklini andıran küçük bir hyalin kıkırdak model içinde oluşur.

Endokondral kemikleşme sırasında, başlangıçta ilk kemik dokusu kıkırdak modelin orta kısmını saran içi boş bir kemik silindiri şeklinde ortaya çıkar. Bir sonraki aşamada bu bölgedeki kıkırdakta, hücre büyümesi (hipertrofi) ve matriks mineralizasyonu ile seyreden programlanmış hücre ölümleri ile yıkım süreci başlar. Sonuçta mineralize kıkırdak matriksinden oluşan 3 boyutlu yapı ortaya çıkar.

Hyalin kıkırdak modeldeki ilk göze çarpan belirti, kıkırdağın tam ortasında bulunan kondrositlerin belirgin şekilde büyümesiyle kendini karakterize eden bir kemikleşme merkezinin oluşmasıdır. Bu bölgeye birincil kemikleşme merkezi denir. Daha sonra kıkırdak modelin uçlarındaki şişkinliklerde ikincil kemikleşme merkezleri ortaya çıkar. Bunların genişlemesi ve yeniden biçimlenmesi esnasında, birincil ve ikincil kemikleşme merkezleri zamanla kemik iliği ile dolan boşluklar oluşturur.

2.1.2. Şekillenme (Modeling) ve Yeniden Şekillenme (Remodeling)

Şekillenme, genel olarak önceden meydana getirilmiş dokunun eritilerek yıkılması ve eş zamanlı olarak yeni kemiğin döşenmesi ile ilişkilidir. Bu yöntem kemik büyürken şeklinin korunmasına olanak sağlar.

Yeniden şekillenme, geniş kemik yüzeylerinde kemik yapım ve yıkım olaylarını içine alan bir süreçtir. Yeniden şekillenme sırasında eski kemik osteoklastlar tarafından kaldırılırken osteoblastlar tarafından bu boşluklar yeni kemik

dokusuyla doldurulur. Genç bireylerde, kemik oluşumu rezorpsiyonu aşar; çünkü yeni havers kanal sisteminin gelişimi kemiğin rezorbe olmasına göre çok daha hızlıdır. Yeniden şekillenme hızı çocuklarda, yetişkinlerden 200 kat daha yüksek olabilir. Yetişkinlerde yeniden şekillenme iskeletin birçok yerinde eşzamanlı olarak gerçekleşen devingen bir fizyolojik işlemdir, kemik büyümesi ile ilişki göstermez.

2.1.3. Kalsifikasyon

Kalsifikasyon kollajen fibriller üzerinde kalsiyum fosfat tuzları çökeldiği zaman başlamaktadır. Kalsiyum tuzlarının yığılımı muhtemelen, osteoblastların hücre içi keseciklerinde bu maddeyi depolama yetenekleri ve gerektiğinde bu kesecikleri hücre dışı ortama salıvermeleri ile hızlandırılmaktadır. Fakat halen kemik matriksi üzerine kalsiyum fosfat çökmesi sırasında meydana gelen olayları açıklayan genel kabul görmüş net bir varsayım bulunmamaktadır.

Osteoblastlar tarafından üretilen ve kemikleşme bölgelerinde bulunan alkali fosfataz da, bilinmeyen bir yolla kalsifikasyona yardım etmektedir.

2.1.4. Kırık İyileşmesi ve Mekanizması

Kırık, bir travma sonucu ya da patolojik bir olayın etkisiyle kemiğin bütünlüğünün bozulmasıdır. Kemik bütünlüğündeki bozukluk makroskopik düzeyde görülebildiği gibi mikroskopik ölçüde de olabilir.

Kırık meydana geldiği anda tamir de başlar ve kırık uçlarının lameller kemikle birleşmesine kadar devam eder. Kemik dokusu ciltle kıyaslandığında, onarımdan ziyade rejenerasyonla iyileşen özel bir dokudur. Ayrıca kemik, diğer dokulardan farklı olarak skar dokusu oluşturmadan iyileşme gösterir. Kırık iyileşmesindeki süreç, şu şekilde işler:

- Kırılmış olan kemik uçlarının veya parçalarının periosteum ve endosteum kökenli kallus oluşumu yoluyla kararlı hale getirilmesi.
- Kemik sürekliliğinin ve bütünlüğünün kemikleşme yoluyla sağlanması.

- Damarsız ve ölü sahaların, haversiyen tipi yeniden modellenmeyle ortadan kaldırılması.
- Kırık bölgesindeki açı farklılıkları ve hizalama sorununun, yeniden modellenme yoluyla bir noktaya kadar giderilmesi.
- Kırık iyileşmesinin son basamağında, işlevsel uyumun yeniden temin edilmesidir.

Kemik iyileşmesi temel olarak 4 fazda oluşmaktadır:

1. Hematom ve inflamasyon fazı
2. Granülasyon fazı
3. Kallus fazı
4. Yeniden şekillenme fazı

1. Hematom ve İnflamasyon Fazı: Kırık meydana geldiğinde kemik matriksi yıkılır ve kırığa bitişik kemik hücreleri ölür. Hasara uğrayan kan damarları bölgesel kanamaya yol açar ve bir kan pıhtısı meydana gelir. Bunu takiben kırık aralığını ve komşu yumuşak doku aralarını medüller ve periferik damarlardan gelen kan ve plazma doldurur. Oluşan hematom, kırık iyileşmesinde kritik öneme sahip hücrel faaliyetlerin başlamasını sağlayan sinyal veren moleküller içerir. Mesela IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin salgılanmasını sağlayan inflamasyon hücreleri kırık iyileşmesinin erken fazının düzenlenmesinde önemli yere sahiptir.

İyileşme sürecinde pıhtı, hücreler ve hasar gören kemik matriksi makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır.

2. Granülasyon Fazı: Hematom kitlesi kapillerlerin dilatasyonu ile hiperemi gösteren ve hızla proliferen olan hücrel granülasyon dokusu ile çevrilir. Hematomun sıvı kısımları rezorbe olarak, katı kısımları ise organize olarak kaybolurlar. Kırık etrafındaki periosteum ve endosteum hızlı ve yoğun hücre çoğalması ile yanıt vererek kırığı saran bir doku hazırlar ve kırık uçları arasına göç eder. Böylece genç bir granülasyon dokusu oluşur. Bu doku kaybolan hematomun yerini alarak kırık aralığını doldurur.

3. Kallus Fazı: Bu fazda endokondral ve intramembranöz kemikleşme yoluyla birincil kemik meydana gelir. Birincil kemikten oluşmuş düzensiz şeritler, geçici olarak kırık uçlarını birleştirerek hızlı bir biçimde kemik kallusunu oluşturur. Bu yeni dokuda hücre sayısı azalmaya başlar. Çevresinde ise osteojenik hücreler artmış

ve osteoblastlar halinde farklılaşmıştır. Yüksek düzeyde osteoblastik aktivite ve mineralize kemik matriksi oluşumuyla karakterizedir.

Bir hafta içerisinde kan damarları çevresinde küçük bölgeler halinde genç bir kemik dokusunun yer aldığı görülür. Bu doku osteoblastlar tarafından salgılanan osteoid adı verilen kemik ara maddesidir. Sonrasında biyokimyasal olaylar sonucunda meydana gelen Ca tuzları bu doku üzerine birikerek, ağ şeklinde kırık uçları arasında uzanan köprüler tarzında kallus yapısını oluşturur.

4. Yeniden Şekillenme Fazı: Yeniden şekillenme fazı, kemiğin optimal fonksiyon ve gücünü tekrar kazanabilmesi için morfolojik adaptasyon gösterdiği son aşamadır. Kırık uçlarının çok iyi şekilde karşı karşıya gelmediği olgularda subperiostal bölgede aşırı derecede oluşan yeni kemik dokusu da geçen süre içinde rezorbe edilecektir. Bunun sonucunda kemik normal anatomik şekil ve görünüşünü yeniden kazanacaktır.

Kemik onarım sürecinde kemik üzerine gelen kuvvetler kemik kallusunun yeniden şekillendirilmesine yarar. Eğer bu kuvvetler kemik büyümesi sırasında gerçekleşen ve dolayısıyla kemiğin yapısını etkileyen kuvvetlerle aynıysa kallusun birincil kemik dokusu kademeli bir şekilde rezorbe olup emilerek ikincil doku ile yenilenir ve kemik yeniden şekillendirilerek ilk yapısına kavuşur. Bu düzen içinde oluşan kırık iyileşmesine sekonder kırık iyileşmesi denir. Eğer kırık uçları basınç yaratılarak birbirine yaklaştırılmışlar ve bu şekilde fikse edilmişlerse kallus oluşmadan bir iyileşme meydana gelir. Bu tür iyileşmeye de primer kırık iyileşmesi denir.

2.2. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kemik iyileşme süreci içerisinde birçok faktör iyileşmeyi etkilemektedir. Bireyin yaşı, direnci, sistemik hastalıkları, kırığın şekli, lokal ve genel hastalıklar iyileşmeye etki etmektedir. Kemik iyileşmesini etkileyen faktörler ile ilgili belirtilen tüm bilgiler Çetingül (2002), Weinstein and Buckwalte (2009)' nin kitapları ile Maeda et al. (1988), Dogan et al. (2001), Kalfas (2001), Morley et al. (2001), Kılıçoğlu (2002), Luppen et al. (2002) Cao et al. (2002), Elmali et al. (2002),

Feitelson et al. (2003), Harder and An (2003), Erdoğan (2007), Cannon (2008), Manolagas and Parfitt (2010)' in yayınlarından elde edilmiştir. Kemik iyileşmesine etki eden faktörler lokal ve sistemik faktörler başlıkları altında toplanabilir.

2.2.1. Lokal Faktörler

Kırık iyileşmesinin süresini ve kalitesini etkileyen lokal faktörlerden bir tanesi kırığın tipidir. Travma sonrası kırık bölgesinde kemik kaybı olması, gelen kuvvetin yönüne ve kasların çekme kuvvetine bağlı olarak kırığın istenilmeyen şekilde yer değiştirmesi, çok parçalı kırık oluşu, kırık çizgisinin özelliği, dış ortamla ilişkide olması veya kırık hattında dişlerin bulunması gibi nedenler iyileşmeyi olumsuz etkilemektedir.

Uygulanacak tedavi ne olursa olsun prensiplere uyulmadığı takdirde kırık iyileşmesinin gecikeceği bir gerçektir. Hatalı fiksasyon yapılması ve kırık bölgedeki aralığın fazla olması iyileşmeyi geciktirebildiği gibi hiç kemikleşme oluşmayabilir. Kırık uçlar her zaman anatomik formuna en yakın şekilde karşı karşıya getirilip fiksasyonu yapılmalıdır.

Lokal patolojik durumlar kırık bölgesinde kemiği zayıflatarak spontan kırık oluşumuna neden olabildiği gibi kırık oluştuktan sonra da iyileşmeyi zorlaştırmaktadır. Kemik ve çevre dokularda oluşan çeşitli neoplaziler dışında kırık bölgesindeki akut veya kronik enfeksiyonlar da kemik iyileşmesi sürecinde engel teşkil etmektedir. Maksillofasiyal bölge düşünüldüğünde çenelerde oluşan kırıklarda, kırık hattında enfeksiyon kaynağı oluşturan dişlerin bulunması ya da cilt veya yumuşak doku yaralanmalarıyla birlikte görülen travmalarda bölgede enfeksiyona açık durumların oluşması sayılabilecek sebepler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yüksek dozda radyasyon da kemik iyileşmesinde olumsuz etkiler ortaya çıkarmaktadır. Radyoterapi gören hastalarda kemiğin mineral metabolizması baskılanmakta, kemik yapısal olarak zayıflamakta ve damarsal yapı bozularak kanlanma azalmaktadır.

2.2.2. Sistemik Faktörler

Kırık iyileşmesinde etkili olan sistemik faktörler; yaş, genel tıbbi durum, hormonal denge, kullanılan ilaçlar, beslenme durumu ve alışkanlıklar olarak sayılabilir.

Yaş arttıkça osteoblastik aktivitede azalma meydana gelmektedir. Yaşla orantılı olarak mezenşimal hücre farklılaşması, yeni kemik dokusu oluşumu ve yeniden şekillenme genç bireylerde yaşlılara göre daha hızlıdır. Aynı zamanda yaşlılarda spontan kırık oluşumu ve kırık iyileşmesinde gecikmeler olması ihtimali daha yüksektir.

Diyabet, anemi, tüberküloz gibi hastalıklarda kırık iyileşmesi sekteye uğramaktadır. Kronik hastalıklarda iltihabi olaylar meydana gelmesi nedeniyle kalsiyum metabolizması da etkilenmektedir. Artan lökositlerin proteolitik enzimleri matriksin bozulmasına sebep olur ve bu şekilde osteoid oluşumunu engeller.

Kalsitonin ve parathormon kemik metabolizmasına etki eden polipeptid yapıdaki hormonlardır. Kalsitonin plazmadaki kalsiyum ve fosfor düzeylerini düşürüp kemik yapımını artırırken, antagonisti olan parathormon doğrudan kemiğe etki ederek rezorpsiyonu artırır. Östrojen eksikliğinde osteoporoz ortaya çıkar. Overektomi yapılmış hayvanlarda östrojen sentezinin de durmuş olmasından dolayı kırık iyileşmesinin geciktiği bildirilmiştir. Büyüme hormonu ve diğer anabolizan hormonlar, proteine bağlı Ca artışını etkileyerek kırık iyileşmesine yardımcı olmaktadır. Kortizon osteoblast gelişimi ve matriks oluşumu için gerekli yapıtaşlarının sentezini yavaşlattığından kırık iyileşmesini geciktirir.

Uzun süreli kortikosteroid ilaçların kullanıldığı hastalıklarda kırık iyileşmesinin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir. Non-steroid antiinflamatuar ilaçların prostoglandinlerin osteoblastik aktiviteyi artırıcı etkisini ortadan kaldırması nedeniyle kırık iyileşmesine olumsuz etkisi olduğu düşünülmektedir.

Kırık oluşan hastalarda metabolik gereksinim de artmaktadır. Kalsiyum ve fosfor kayıpları ya da vitamin eksiklikleri matriks mineralizasyonunu azaltarak kırık iyileşmesini olumsuz etkiler.

Sigara ve kronik alkol kullanımının vücutta gösterdiği birçok olumsuz etkinin yanında kemik yapımını azalttıkları da bildirilmiştir. Sigarada bulunan nikotinin

vazokonstrüktör etkisi kırık bölgesine giden kan akımını azaltarak beslenmeyi bozar. Alkol ise kırık iyileşmesindeki olumsuz etkisini osteoblast aktivitesini bozarak göstermektedir.

2.3. Kırık İyileşmesinin Değerlendirilmesi

Kırık iyileşmesinde başlangıçtan itibaren her aşama birbiriyle ilişkili hücrel ve biyokimyasal olayları içermektedir (Cornell 2004). Marcs and Li (1999), kırık iyileşmesinin temelini oluşturan olayları; 1) kırık sahadaki hücrel olaylar, 2) kırık kemiğin ve çevre yumuşak dokuların revaskülarizasyonu 3) kırık ortamının mekanik durumu olarak sınıflandırmıştır. Bu durumda yapılan deneysel çalışmalarda kırık sahadaki hücrel aktivite, damarlanma ve kırık hattının mekaniksel direnci ölçülebilirse kırık iyileşmesi hakkında bilgi sahibi olunarak yorum yapılabilir.

Tüm iyileşme safhalarını nelerin kontrol ettiği günümüzde hala karmaşıklığını korumaktadır. Kırık iyileşmesinin ilk fazı olan hematoma ve inflamasyon safhasındaki hematoma hücrel faaliyetlerin başlamasını sağlayan sinyal veren moleküller içerir ve kırık iyileşmesinin erken döneminde çok önemlidir. İnflamasyon hücreleri interlökinler gibi çeşitli sitokinler salgılar ve kırık iyileşmesinin erken fazını düzenler (Grundnes and Reikeras 1993). Histopatolojik olarak iltihabın dolayısıyla inflamasyonun ölçülmesi bize hem kırık iyileşmesinin aşaması hakkında hem de deneysel olarak uygulanan yöntemin inflamasyona etkisi hakkında bilgi verecektir.

Kırık oluştuğu anda kırık fragmanları arasındaki damarsal düzen bozulacaktır. Kırık uçları bir araya geldiği takdirde normal şartlarda çevresel damarlardan yeni kapillerler ortaya çıkarak damarlanmayı sağlayacaktır. Bu olaya angiogenezis denir (Marcs and Li 1999). Histomorfometrik olarak kırık oluşumu sonrası herhangi bir aşamada yeni damar sayıları ölçülebilmesi mümkündür. Çevresel olarak iyi bir kanlanmanın olması angiogenezisi dolayısıyla osteogenezisi etkileyecektir. Sistemik sebeplerle veya cerrahi olarak oluşturulan kırıklardaki vidalardan ya da osteotomidan kaynaklanan doku beslenmesinin bozulduğu durumlarda nekrotik kemik odakları ortaya çıkabilir. Nekrotik dokular ya rezorbe olarak yeni kemikle dolacak ya da

kapillerler tarafından beslenerek iyileşecektir. Bu dokuların histolojik olarak görüntülenmesi ise bize kemik iyileşmesi sırasında dokunun beslenmesindeki aksaklığı gösterecektir.

Kırık iyileşmesinin granülasyon safhasında hızlı hücre proliferasyonu ile damardan zengin fibröz dokuların oluşumu artacaktır. Fibrozisin deneysel olarak artması 2 farklı durumu ortaya çıkarabilir. Rijit fiksasyonu yapılmayan kırıklarda fibröz doku artışı immobilizasyonu olumsuz etkileyerek kırık iyileşmesini geciktirebilir. Fakat damardan yoğun bir doku olması nedeniyle hareketsizlik sağlandığı takdirde kırık aralığını dolduran bu dokunun hızlıca kallus formasyonu oluşturacağı bilinmektedir (Junqueira and Carneiro 2009). Bu sebeplerden kırık hattındaki fibrozis oranının değerlendirilmesi kırık iyileşmesi açısından önemli bilgiler vermektedir.

Hüresel düzeyde mezenşimal hücreler lokal ve sistemik ajanlara proliferasyon, diferansiyasyon ve hücre dışı matriks sentezlenmesi olarak cevap verir. Granulasyon dokusunun kallusa dönüştürülmesinde ve oluşan kemiğin yeniden şekillendirilmesinde kemik formasyonunda etkili hücreler görev alır (Marcsch and Li 1999). Osteoblastik aktivite ile mineralize kemik matriksi oluşacak ve sonrasında kırık sahada osteoid denilen kemik ara maddesi oluşacaktır. Kademeli bir şekilde rezopsiyonu oluşan kemiğin yeniden şekillenme ile son halini almasında osteoklastlar etkili olacaktır. Osteoblastlar ve osteoklastlar kemik onarım sürecinde dengeli bir şekilde çalışarak görev alırlar. Bu dengenin osteoklastik aktivite yönünde bozulması kemik iyileşmesini olumsuz etkileyecektir (Cormack 1997, Çetingül 2002). Histomorfometrik olarak kemik iyileşmesi sırasında bu hücrelerin sayıları kemik iyileşmesi ile ilgili yapılan deneylerde kırık iyileşmesinin değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Yeni kemik yüzey alanı ise kemik iyileşmesi deneylerinde kullanılan kantitatif veri elde edilmesini sağlayan bir parametredir (Parfitt et al. 1987). Kemik iyileşmesinin herhangi bir döneminde mikroskop ve ona bağlı bilgisayar yazılımı vasıtasıyla ölçümü yapılarak kemik iyileşmesindeki kesin sonuç elde edilir ve kemik iyileşmesi hakkında objektif yorum yapabilmek imkanı sağlar.

2.4. Kırık İyileşmesinin Hızlandırılması

Kırık iyileşmesi, kemiğin yapısal bütünlük ve fonksiyonlarının yeniden sağlanmasında çeşitli hücre tipleri, büyüme faktörleri ve genlerin birlikte uyumlu çalışmasını gerektirmektedir (Cornell 2004). Bu faktörlerin birbiriyle ilişkili olarak kırık iyileşme sürecinin farklı aşamalarında farklı görevler üstlenmesi, komplike metabolik bir süreç ortaya çıkarmaktadır (Childs 2003). Bu tamir sürecini sağlamak veya hızlandırmak amacıyla araştırmacılar kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen sistemik ve yerel faktörlerin önüne geçmeye çalışmakta ve böylece kırık tedavisini daha kısa sürede bitirip hastanın normal günlük hayatına kavuşmasını sağlamak amacı ile yeni girişimler ve tedaviler uygulamaktadır.

2.4.1 Kırık İyileşmesinin Hızlandırılmasının Önemi

Her yıl dünyada milyonlarca kırık vakası görülürken, Türkiye’de de bu sayı yılda yüzbinlerle ifade edilmektedir (Temel ve Baysal 2009). Toplumda yaşlı birey sayısının gün geçtikçe artması, kırık vaka sayılarını arttırmakta ve iyileşmede gecikmeleri de beraberinde getirmektedir. Aynı zamanda osteoporozla bağlı meydana gelen kırıklar da önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (Shen and Zhao 2010).

Kırıkların büyük çoğunluğu uygun tedavi protokolü sağlandığında problemsiz bir şekilde iyileşmektedir. Ancak meydana gelen kırıkların %5 ila %10 gibi bir oranında bu süreç kaynamama veya iyileşmede gecikme şeklinde ortaya çıkar (Ryaby 1998, Griffin et al. 2008). Geç iyileşen kırıklar veya kaynamama görülen durumlarda sebepler bazen tam olarak bilinmemekle birlikte iyileşme basamaklarından birinde görülen biyolojik veya biyokimyasal aksamalardan kaynaklanabilir (Victoria et al. 2010). Bu durumda hastalar günlük aktivitelerini yerine getirmekte zorlanmakta ve ağrı şikayetleri devam etmekte ve medikal harcamaların artması toplum üzerinde ekonomik bir yük oluşturmaktadır (Griffin and Bayat 2011).

Kırık iyileşmesinin hızlandırılması, toplumsal açıdan hastaların iş hayatlarına daha erken dönmelerini sağlayarak iş gücü kaybını ve ekonomik giderleri azaltmaktadır. Bireysel açıdan ise tedavi süresinin kısılması hastalara daha rahat ve acısız bir tedavi olanağı sunmakta aynı zamanda iş hayatlarına ve sosyal hayatlarına daha erken dönen bireyler hem fiziksel hem de psikolojik açıdan kendilerini daha iyi hissetmektedir (Einhorn 1995). Bu sebeplerden dolayı kırık iyileşmesini hızlandırmada etkili yöntemlerin bulunması amacıyla yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

2.4.2. Kırık İyileşmesinin Hızlandırılması Amacıyla Kullanılan Yöntemler

Kemik iyileşmesini uyarmak amacıyla, medikal uygulamalar ve fiziksel uygulamalar olarak ayrılabilen farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır.

2.4.2.1. Medikal Uygulamalar

İlaç uygulamaları kırık iyileşmesini hızlandırdığı düşünülen bir maddenin sistemik veya lokal uygulanması şeklinde yapılabilmektedir. Bu konudaki araştırmacıların yaptığı deneyler daha çok D vitamini (Delgado et al. 1998) ve kalsiyumun (Borrelli et al. 2003) ağırlıkta olduğu vitamin ve mineraller ve büyüme faktörleri (Lind et al. 1993, Gong et al. 2003) üzerine yoğunlaşmıştır.

Delgado et al. (1998) yaptıkları çalışmalarında, olgun sıçanların femur kemiklerine kontrollü olarak osteotomi uygulamış sonrasında da subkutan yolla D vitamini vermişlerdir. D vitamini uygulanan deney hayvanlarında kontrol grubuna göre 5. haftada mekanik direncin anlamlı derecede artmış olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda deney grubunda kandaki D vitamini seviyelerinin oluşan kallusun mekanik direnciyle doğru orantılı olduğu bulunmuştur. D vitamininin kalsiyum metabolizmasında önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Kemik üzerindeki etkisinin ise indirekt olarak mineral döngüsüne olan tetikleyici etkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Arnaud and Naja 2011).

Borelli et al. (2003) kırık tedavileri başarısız olan hastalarda kalsiyum sülfat kullanarak otojen iliak kemik greftinin hacmini artırmayı amaçlamışlardır. Hastaların uzun kemiklerindeki kırıklara kalsiyum sülfatın uygulandığı bu çalışmada kullanılan yöntemle kemik yapımının hızlandırılabilirdiği belirtilmiştir. Bunun dışında kalsiyum sülfatın kemik oluşumu sırasında gerekli olan kalsiyum iyonları için depo görevi gördüğü bildirilmiştir.

Büyüme faktörlerinin de kırık iyileşmesini düzenlediği geçmişte yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Lind et al. 1993, Bostrom et al. 2000). TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü), IGF (insülin benzeri büyüme faktörü), FGF (fibroblast büyüme faktörü) gibi büyüme faktörleri hücrel proliferasyon, diferansiyasyon ve protein sentezleme mekanizmalarında tetikleyici rol oynayarak kırık iyileşmesinin hızlandırılmasına katkıda bulunurlar (Bodamyali et al. 1998). Lind et al. (1993) yaptıkları çalışmalarında tavşan tibiasında osteotomi uygulamışlar ve deney grubundaki sıçanlara lokal olarak TGF- β enjeksiyonu yapmışlardır. Elde edilen bulgulara göre deney grubundaki tavşanlarda yeni kemik yapımı 6. haftada kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Deney hayvanlarına IGF enjeksiyonu yapılan bir başka çalışmada (Stewart et al. 1999) araştırmacılar tavşan mandibulasına distraksiyon uygulamışlar ve IGF enjeksiyonu yapılan grupta osteoblastik aktivitenin anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir. İskelet sisteminde bulunan bir büyüme faktörü olan IGF, özellikle kortikal kemik oluşumu ve kemik matriksi sentezini tetikler. Kırık iyileşmesinin angiogenesis safhasında etkili olan bir diğer büyüme faktörü FGF, vaskülarizasyonu ve kanlanmayı artırarak kırık iyileşmesini olumlu etkilemektedir (Tepper et al. 2004). Gong et al. (2003)' da çalışmasında deney hayvanlarının mandibulalarına kontrollü olarak osteotomi yapmışlar ve dışarıdan lokal olarak FGF uygulandığında deney grubunda mikrovasküler yapıların kontrol grubuna göre artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Böylece kanlanmanın arttığı kırık sahasında iyileşme daha hızlı olmaktadır.

2.4.2.2. Fiziksel Uygulamalar

Günümüzde kemik iyileşmesinin hızlandırılması amacıyla en sık kullanılan fiziksel yöntemler düşük yoğunluklu ultrason uygulaması ve elektriksel stimülasyon

olmakla birlikte şimdikiye kadar birçok farklı yöntem önerilmiştir (Victoria et al. 2009). Şok dalga tedavisi (Hsu et al. 2003), düşük enerjili lazer uygulaması (Garavello et al. 2003) ve hiperbarik oksijen tedavisi (Gill and Bell, 2004) uygulanan diğer yöntemlerdir.

Şok dalga tedavisi genellikle ürolojide, üriner sistemdeki taşların tedavisi amacıyla yüksek frekans ve enerjide kullanılan bir yöntemdir (Wang 2012). Kemik iyileşmesindeki etkinliği tartışmalı olmakla birlikte üzerinde çalışılan bir konudur. Şok dalgalarının kemik hacminde ve direncinde artışa neden olduğu anlaşılmış ve kırık iyileşmesini stimule edebileceği düşünülmüştür (Elster et al. 2010). Delius et al. (1995) şok dalgası uyguladığı tavşan femurlarında kortikal kemikte apozisyonun sağladığını ve trabeküllerin arttığını bildirmişlerdir. Kusnierczak et al. (2000) yaptıkları çalışmalarında yüksek enerjide iletilen şok dalgalarının osteoblastların tip-I kollajen sentezini azalttığını ve olumsuz etki yarattığını dile getirmişlerdir. Hsu et al. (2003) ise şok dalga tedavisinin kırık iyileşmesinin sadece erken fazında etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu uygulama kemik iyileşmesinde kullanılan standart bir yöntem haline gelmemiştir ve üzerinde daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir (Birnbaum et al. 2002).

Diğer bir fiziksel tedavi şekli olan düşük enerjili lazer uygulamalarında sıklıkla He-Ne (Helyum-Neon) lazerler kullanılmaktadır. Kırık iyileşmesi stimülasyonu için uygulanan dozlar 0.03 ile 4 Joule arasında değişmektedir. Fakat bu uygulama için de yeteri kadar çalışma olmamakla birlikte yapılan çalışmalarda da çelişkiler söz konusudur. Sıçanların tibialarında bilateral osteotomi yapıldıktan sonra 2-6 hafta süren He-Ne uygulamasının kırık iyileşmesine etkisi olmadığına dair sonuç elde edilen bir çalışma yapılmıştır (David et al. 1996). Garavello et al. (2003) ise aynı uygulamanın sıçanların tibialarında kemik iyileşmesini stimule ettiğini bildirmişlerdir.

Muhonen et al. (2002), hiperbarik oksijen tedavisini kullanarak radyoterapi uygulanmış tavşan mandibulalarında distraksiyon sonrası kemikleşme miktarını değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar hiperbarik oksijen uygulamasının distraksiyon sahasındaki kemikleşmeyi anlamlı derecede arttırdığını gözlemlemişlerdir. Yüksek basınçlı oksijen altında plazmada çözülmüş oksijen miktarı artmaktadır. Damarsal yapıların ve kanlanmanın bozulduğu durumlarda hiperbarik oksijen tedavisi yara

iyileşmesi üzerinde olumlu etkiler göstermektedir. Kırık iyileşmesi açısından da hücrel aktiviteyi arttırmaları, protein sentezini arttırmaları ve yaralanmış dokularda damarların oluşumunu tekrar sağlamaları nedeniyle olumlu etkileri bildirilmiştir (Gill and Bell 2004).

Düşük yoğunluklu ultrason uygulaması kırık iyileşmesinin hızlandırılması amacıyla kullanılan diğer bir tedavi alternatifidir. Ultrason bir çeşit mekanik enerji tipidir ve dokuların içerisinden akustik dalgalar halinde iletilir. Tıpta uzun zamandır teşhis ve tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Kırık iyileşmesindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla Azuma et al. (2001), çift taraflı femur osteotomisi yaptıkları sıçanları 4 gruba ayırmış ve farklı dönemlerde düşük yoğunluklu ultrason uygulaması yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre tüm gruplarda kontrol tarafına göre kemikleşmede artış olduğunu göstermişlerdir. Bu sebeple düşük yoğunluklu ultrason uygulamasının kırık iyileşmesinin tüm aşamalarında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ancak tavşan tibiasında distraksiyon sonrası düşük yoğunluklu ultrasonun uygulandığı başka bir çalışmada distraksiyon sahasındaki kemikleşmede olumlu etkilerin gözlenmediği bildirilmiştir (Tis et al. 2002)

2.5. Kırık İyileşmesinde Elektromanyetik Alan Uygulamaları

Kırık iyileşmesinde güvenli ve etkili bir tedavi metodu olduğu FDA (Food and Drug Administration) tarafından da onaylanan düşük frekanslı elektromanyetik stimülasyon kırık iyileşmesinde noninvaziv ve düşük komplikasyon oranına sahip bir metottur (Bassett 1989).

Elektrik ve elektromanyetik alanlar kemik iyileşmesinde, mekanik kuvvet uygulamalarıyla benzer prensiplerle rol oynamaktadır. İlk olarak mekanik uyaran ile kemikte bir elektriksel polarizasyon meydana gelmesi elektrik ile tedaviyi gündeme getirmiştir (Fukada and Yasuda 1957).

2.5.1. Kemiğin Elektriksel Özellikleri

Kemik dokusunun da diğer biyolojik dokular gibi elektriksel özellikleri vardır. Uzun kemiklerin diyafizleri istirahat halindeyken pozitif, taze kırık bölgeleri ve büyümekte olan canlı kemik dokuları ise negatif yüklüdürler (Freidenberg and Brighton 1966, Hastings and Mahmud 1988).

Kemikte mekanik güçlere bağlı olarak endojen elektriksel sinyaller oluşması ve sonrasında kemik hücrelerinin aktiviteleri sonucu yapım ve yıkım olayları meydana gelmesi uzun yıllardan beri kabul görmüştür (Singh and Saha 1984). Bu tip yükler sonucu oluşan potansiyellerden birincisi olan piezoelektrik potansiyel, kollajen matriks üzerindeki baskıya bağlı deformasyon sonucu oluşur. İkincisi ise elektriksel potansiyeldir ve yük taşıyan kemiklerdeki sürekli iyon akışından kaynaklanır (Hastings and Mahmud 1988).

Mekanik güçlere bağlı olarak meydana gelen elektriksel değişimler ilk defa Fukada and Yasuda (1957)'nin piezoelektrik üzerine yaptığı çalışmayla ortaya konmuştur. Sonrasında bu teori geliştirilerek kemiğin, üzerine gelen yükler ile yeniden şekillendiğini savunan Wolff Kanunu ile ilişkilendirilmiştir (Friedenberg and Brighton 1966). Böylece biyofiziksel anlamda Wolff kanununu esas alarak kemiğin elektromekanik özelliklerinin tanımlanması sağlanmıştır (Singh and Saha 1984). Aktif remodeling olan veya mekanik güçlere bağlı olarak oluşan kemik formasyonu ile elektriksel uyarıların uyumlu olduğu daha sonraki çalışmalarla da anlaşılmıştır (Spadaro 1997).

Kemiğin pyroelektrik özelliği ısındığında yüzeyinde elektrik yüklerinin oluşmasıdır. Ancak sıcakkanlı organizmalarda ısı değişiminin elektrik potansiyeli üretecek kadar fazla olup olmadığı şüphelidir. Kemikteki ferroelektrik özellik ise kemiğin büyüme sürecinde değişimler oluşturan, spontan elektrik dipol hareketlerine sahip olmasıdır (Erdem 2006).

Kemik içindeki ekstrasellüler sıvının deforme edilen kemikte, sıkışma bölgesinden gerilme bölgesine doğru aktığı tespit edilmiştir. Bu akım sırasında sıvı içindeki iyonik yüklerin transferiyle düşük şiddetli elektriksel akım oluşmaktadır (Erickson 1974, Aaron et al. 1989, Erdem 2006). İlk defa strese maruz kalan kemiklerde konkav taraftan konveks tarafa doğru gelişen bir elektrik potansiyeli

oluşmaktadır. Bu elektrik potansiyel, piezoelektrik potansiyellerle birlikte, kırık iyileşme fazlarını kontrol eden mekanizmalar arasında kabul edilmektedir (Isaacson and Bloebaum 2010).

2.5.2. Elektromanyetik Alan Kavramı

Manyetik alan elektrik yüklü parçacıklar hareket ettiğinde ortaya çıkar (Paul and Nasar 1987). Manyetik alan bir gözlemciye göre düzgün doğrusal (ivmesiz) hareket eden yüklerin (parçacıkların) oluşturduğu bir alan olarak tarif edilirken, elektrik alanı ise bir gözlemciye göre duran yüklerin oluşturduğu bir alan çeşidi olarak tanımlanabilmektedir (Çınar 2006). Elektromanyetik kuvvet elektrik yüklü bir parçacığın manyetik alandan geçerken üzerine etki eden kuvvettir.

Manyetik alan şiddet birimi Oersted`dir ancak manyetik alan daha yaygın olarak manyetik akı yoğunluğu olarak tanımlanmaktadır ve daha çok Gauss veya Tesla birimleriyle ölçülmektedir. Manyetik alan içindeki 1cm`lik bir yüzeyden bir kuvvet çizgisi geçiyorsa o noktadaki manyetik kuvvete sahip manyetik alanın şiddeti 1 Oersted yani 1 Gauss olarak kabul edilmekle birlikte 1 Gauss ise 10^{-4} Tesla`dır (Durmuş 1999). Manyetik alan, günlük yaşamımızda her yerde karşımıza çıkmaktadır. Akım geçiren her şey, manyetik alan oluşturur. Mıknatıslar manyetik alan oluşturur, hatta dünyanın akışkan olan iç kesimleri dahi dünyanın manyetik alanını oluşturur (Çınar 2006). Dünyanın; yeryüzündeki bütün canlıların yaşam fonksiyonlarını düzenli bir şekilde devam ettirebilmesi için gerekli olan bir manyetik alanı vardır (Durmuş 1999).

Eğer bir gözlemciye göre yüklü parçacıklar hareket etmiyorsa, orada sadece elektrik alan vardır. Eğer yükler hareket halindeyse, gözlemciye göre yüklü parçacıkların hareketinden ötürü gözlemci elektrik alanın yanı sıra bir de manyetik alanın etkilerini hissedecektir. Faraday ve Maxwell, bu olguların yüklerin gözlemcilere göre hareketlerinden kaynaklandığını ve zamana bağlı olarak değişen manyetik alanın bir elektrik alan oluşturacağını ve aynı zamanda, zamana bağlı olarak değişen elektrik alanın bir manyetik alan oluşturacağını buldular ve

formülleştirdiler. Elektromanyetik alan, aslında manyetik alanla elektrik alanın birleştirilmiş asıl halidir (Çınar 2006).

Elektrik ve manyetik alan uygulamaları sağlık alanında teşhis ve tedavi amaçlı karşımıza çıkmaktadır. Yumuşak doku yaralarının iyileşmesinin (Ulukut ve ark. 2005) ve kemik kırıklarının kaynamasının hızlandırılması amacıyla (Sharrard 1990, Midura et al. 2005, Gupta et al. 2009) kullanılmasının yanında vücudun çeşitli bölgelerinin görüntülenmesi ve sinir sisteminin değerlendirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Paul and Nasar 1987).

2.6. Kırık İyileşmesinin Hızlandırılmasında Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulamaları

Kemiğin piezoelektrik özelliklerinin bulunmasıyla birlikte (Fukada and Yasuda 1957) kemik iyileşmesinde elektromanyetizmanın kullanılmasına olan ilgi artmıştır. İlk olarak Bassett (1964), elektriksel uyarılmayla kemik formasyonu olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalardan sonra kemiğe elektrotların yerleştirilmesiyle uygulanan direk stimülasyon tekniği ilgi uyandırmış ve uygulanmaya başlanmıştır (Friedenberg et al. 1971). Paterson ve ark. tarafından 1980 yılında bu sisteme ait bir çalışma yayınlanmıştır. Gerçekleştirdikleri çalışmada kaynamayan uzun kemik kırıklarında bu yöntemden yararlanarak %86'lık bir başarı elde ettiklerini bildirmişlerdir (Paterson et al. 1980). Her ne kadar direk elektrik stimülasyonu bazı çalışmalarda başarılı olarak bildirilmiş olsa da (Dwyer 1974, Paterson 1980) zamanla dışarıdan elektrot uygulamasının birçok dezavantajları ortaya çıkmıştır. Çoğu kırık açık redüksiyona gerek kalmadan, spontan olarak iyileşecektir ve daha hızlı iyileşmesi için elektrot yerleştirilmesi yanında enfeksiyon riskini de getirmektedir. Bu elektrotların çıkarılması için ikinci bir cerrahi işlem gerekmektedir. Aynı zamanda, tüm elektrotların uygulama sırasında bir miktar elektrolize uğraması nedeniyle ortaya çıkan bazı elektrokimyasal ürünlerinin osteogenez üzerinde zararlı etkileri olabileceği diğer bir dezavantajdır. Ayrıca kırık alanına göre elektrotların küçük olması nedeniyle ister doğru akım, isterse de atımlı uygulansın, elektrotların stimülasyonu ile kemik formasyonu sınırlıdır. Bu nedenle yeterli etki elde etmek için

uzun kemiklerde birden fazla elektrot kullanımı gereklidir (Bassett 1984, Otter 1998, Erdem 2006). Bu sebeplerden dolayı bu uygulama terk edilmiş ve cihazları üretimden kalkmıştır. Sonrasında kaynama olmamış kırık vakalarında kırık sahaya dışarıdan uygulanan ve ilk olarak Bassett (1974) tarafından kullanılmaya başlanmış elektromanyetik alan poplarite kazanmıştır. Bu yöntem, kırık yüzeyine temas eden ve bir bobini içeren bağlantı parçası aracılığıyla elektrik akımının iletildiği indirek stimulasyondur. Elektrik, bobin içerisinden geçerek ortamda bir elektromanyetik alan yaratır. Bu şekilde verilen elektrik dozları bazen değiştirilerek sürekli ya da kesikli elektromanyetik alan elde edilebilmektedir.

Kırık iyileşmesinde, direk ve indirek stimulasyonun ortaya çıkardığı etkiler için değişik mekanizmalar tarif edilmiştir. Direk stimulasyonda kemiğin katot tarafında oksijen basıncının azalması, pH artması ve hidrojen peroksit gibi kimyasal madde üretiminin gerçekleşmesi gibi değişimlerin osteoprogenitör hücrelerin mitozunu arttırarak osteoblastlara dönüşümlerini hızlandırdığı, dolayısı ile kemik yapımını hızlandırdığı bildirilmiştir (Bozic et al. 1999). Darbeli elektromanyetik alan uygulanan kemiklerde ise parathormon ve osteoblast aktive edici faktörlerin bloke olduğu belirtilmiştir (Luben et al. 1982). Aynı zamanda darbeleri elektromanyetik alan endotel hücre proliferasyonlarını ve kapiller oluşumunu arttırmakta, TGF- β ve IGF salınımlarını tetiklemektedir. Ortaya çıkan bu etkiler kırık iyileşmesinin tüm fazlarında rol oynamakta ve kırık iyileşmesini stimule etmektedir (Patton et al. 1988, Bodamyali et al. 1998)

Kemik iyileşmesi üzerinde etkili konulardan birisi uygulanacak elektromanyetik alan frekansıdır. Kemik üzerine olumlu etki sağlayan frekans aralığı, kemikte normal fonksiyonel aktivite sırasında oluşan frekans seviyesine en yakın olanıdır. Kemikte endojen üretilen frekanslar 1 – 100 Hz arasında değişim gösterebilmektedir (Otter 1998). Diğer bir çalışmacıya göre hücre membranlarındaki proteinleri etkileyen elektromanyetik alan uygulamasının yapısal değişikliklere neden olmasıyla metabolik etkiler ortaya çıkmaktadır ve bu değişikliklere neden olabilecek frekans aralıkları iskelet sisteminde normal fonksiyonel aktiviteler sonucu oluşan frekans aralıklarının dışında kalan frekanslardır (Brighton 1981).

Kemik iyileşmesine etkili bir diğer faktör DEMA yoğunluğudur. Günümüze kadar yapılan DEMA prosedürlerinde manyetik alan şiddeti çeşitlilik göstermektedir

(Bassett 1984, Darendeliler et al. 1997, Satter et al. 1999, Atay ve ark. 2003, Midura et al. 2005, Gupta et al. 2009). Ancak 0.2- 0.3 mT'lık düşük manyetik alan şiddetinin kemik formasyonu için yeterli olduğu bildirilmiştir (Atay ve ark. 2005). Bassett et al. (1982)'da 0.2 mT'lık manyetik alan şiddetinin uygulandığı çalışmada kemik formasyonundaki artışı anlamlı bulmuştur. Literatürde manyetik alanın kısa süre de olsa yoğun uygulanmasının tedavi üzerinde negatif etkisi bildirilmiştir (Ulukut ve ark. 2005). Bununla birlikte tedavi edici özelliğe sahip manyetik alanın ise düşük frekanslı ve atım özellikli olması gerektiği belirlenmiştir. Bu özelliğe sahip darbeli elektromanyetik alan ile tedavinin ilaç tedavisine göre avantajları;

- 1) sadece hedef organa etki ve ideal doz uygulaması,
- 2) ağrı ve acı hissini azalmasına yardımcı olmasıyla hasta konforunu arttırması,
- 3) tedavi giderlerini ve süresini azaltması,
- 4) cerrahi müdahale ve anestezi gerektirmemesi şeklinde sıralanabilir (Temel ve Baysal 2009).

Yıllık yaklaşık iki milyon gecikmiş veya kaynamamış kırık vakası meydana gelmektedir (Einhorn 1995). Bu prevelans bu tip inatçı kırıkların iyileşmesine yardımcı olacak daha etkili tedavileri geliştirmek için araştırmaların devam etmesine neden olmaktadır. Bunun dışında elektromanyetik alan uygulamaları deri ile temas etmemesi, kontraendikasyon ve komplikasyonlarının az olması, termal etkinin ortaya çıkmaması ve terapistin zamanını almaması gibi bazı avantajlara sahiptir. Bu yüzden elektromanyetik alan uygulamaları alternatif ve etkili bir tedavi seçeneği olmaktadır (Külcü 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Planı

Prospektif, rastgele ve tek kör olarak planlanan bu çalışmanın, Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Ankara, Türkiye) tarafından üretilmiş 40 adet, 12 aylık 386-534 gram (gr) (ortalama 454 ± 42) ağırlığında erkek Wistar Albino sıçan üzerinde gerçekleştirilmesi planlandı (Ek 1). Sunulan araştırma, Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'u (HADYEK) tarafından değerlendirildi ve çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna dair 18/05/2010 tarihli 03 sayılı belge alındı (Ek 2). Çalışma, SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından 2173-D-10 proje numarası ile desteklendi (Ek 3).

Çalışma sırasıyla; deney hayvanlarının gruplandırılması, cerrahi uygulama aşamaları, DEMA uygulaması, örneklerin hazırlanması, histopatolojik inceleme ve histomorfometrik inceleme şeklinde planlandı ve gerçekleştirildi.

3.2. Deney Hayvanları

Deney hayvanları, tabanı talaş ile kaplı 8 adet Eurotype-4 polikarbon kafese (Radon®, Ankara, Türkiye) her birinde 5 adet sıçan olacak şekilde yerleştirildi. Deney hayvanlarının bakımı, $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, %55 bağıl nem oranı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyodu standardını sağlayacak ortamda gerçekleştirildi. Araştırma süresince sıçanların standart pelet formdaki sıçan yemine (Poyraz Zirve® S-2, Kütahya, Türkiye) ve musluk suyuna ad libitum olarak ulaşmaları sağlandı.

Sıçanlar, DEMA uygulanmayan kontrol grubu ($n=10$) ve 15 Hz sabit frekansta, farklı şiddetlerde (0,2 mT ($n=10$), 1 mT ($n=10$), 2 mT ($n=10$)) DEMA uygulanması planlanan üç çalışma grubu olmak üzere rastgele dört gruba ayrıldı ve 4 hafta süre ile takip edildi (Tablo 1). 2 mT grubunda sakrifikasyon sonrası beklenmedik bir şekilde

hemen hemen bütün plaklarda kırılmaların görülmesi nedeniyle bu grup için deneyler tekrar edilmiştir.

Tablo 1: Araştırma gruplarını oluşturan kontrol ve çalışma grupları

Gruplar	N	DEMA uygulaması (hafta)	Deney süresi (hafta)	Su ve Yem (ad libitum)
Kontrol	10	-	4	+
0.2 mT	10	3	4	+
1 mT	10	3	4	+
2 mT	10	3	4	+

3.3. Cerrahi

3.3.1. Cerrahi Öncesi Hazırlık

Tüm deney hayvanlarının, cerrahi operasyon öncesi ve sakrifiye edildikleri 4. haftada olmak üzere iki kez ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Femur osteotomisinin ve plakla fiksasyon işleminin cerrahi invaziv bir girişim olması ve sıçanların tamamen hareketsizliğinin sağlanması gerektiği için çalışmanın genel anestezi altında yapılması planlandı.

Genel anestezi verilmesi gereken deney hayvanları için kullanılması planlanan ilaç miktarları, sıçan ağırlıkları göz önünde bulundurularak hesaplandı. Bu amaçla kullanılan anestezi maddelerden (Resim 1), ketamin hidroklorür (HCl) (Ketalar®, Pfizer, Türkiye) 90 mg/kg, xylazin HCl (Alfazyne®, Alfasan, Hollanda) 10 mg/kg olarak 1 cc'lik insülin enjektörlerine her sıçanın ağırlığı ile orantılı hazırlanarak (Resim 2), intraperitoneal (IP) enjekte edildi (Resim 3).



Resim 1: Genel anestezi için kullanılan ilaçlar (Alfazyne %2, Ketalor)



Resim 2: Deney hayvanı ağırlığı, kafesi ve numarası ile etiketlenerek içerisinde deney hayvanını genel anestezi altına almak üzere anestetik solüsyon hazırlanmış insülin enjektörleri



Resim 3: Ketamin ve Xylazin HCl solüsyonları hazırlanmış insülin enjektörü ile IP enjeksiyon

Penset ile ayak sıkıştırıldığında refleks vermediği ve kornea refleksi görülmediği için yeterli anestezî derinliğine ulaştığı anlaşılan sıçanların sağ ve sol arka bacak üst yüzeyleri %10'luk povidon iyot solüsyonu (Poviodeks®, Kimpa, Türkiye) ile silinip dezenfekte edilerek tıraşlandı (Resim 4). Cerrahi girişime hazır hale getirilen sıçanlar, cerrahi işlemin uygulanacağı sahaya taşındı (Resim 5).



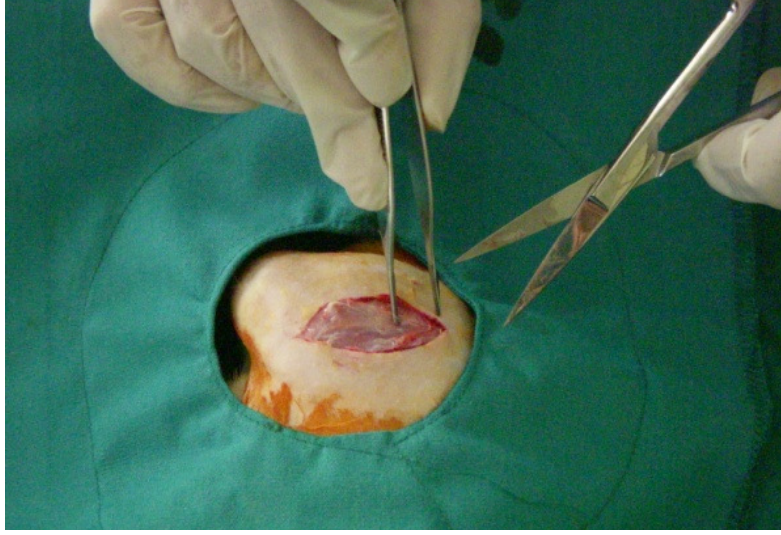
Resim 4: Dezenfeksiyonu sağlanan bölgenin tıraşlanması



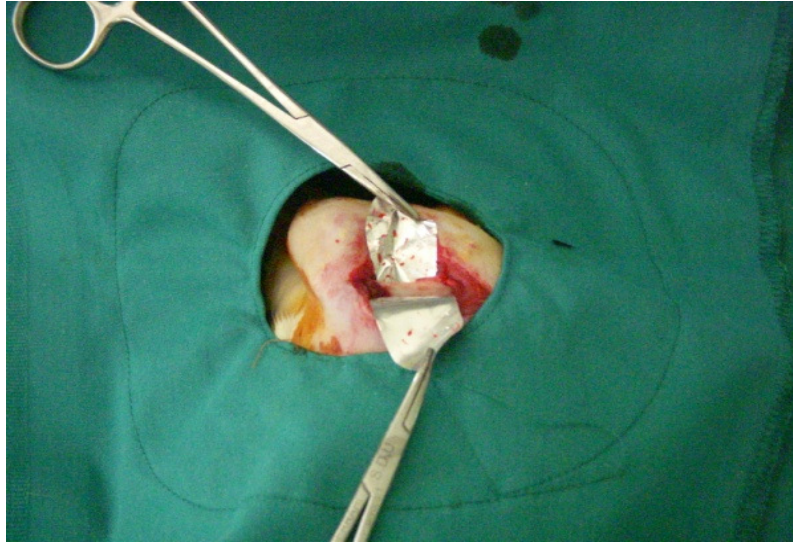
Resim 5: Deney hayvanlarının aktarıldığı cerrahi saha

3.3.2. Cerrahi Uygulama

Sıçan femur kemiklerinin distal yüzeylerine ulaşmak amacıyla 15 no'lu bistüri ile 30 mm uzunluğunda insizyon yapıldı (Resim 6). Cilt insizyonu yapıldıktan sonra, küt disseksiyon ile cilt ve cilt altı yumuşak dokular (fasiya, kas) geçilerek femura ulaşıldı. Femuru çevreleyen kas ve periost tamamen disseke edildikten sonra osteotomi alanını dokulardan izole hale getirmek için araya alüminyum foliyo yerleştirildi (Resim 7). Klempler yardımıyla femur, çift taraflı olarak sabitlendi (Resim 8).



Resim 6: Cilt insizyonu

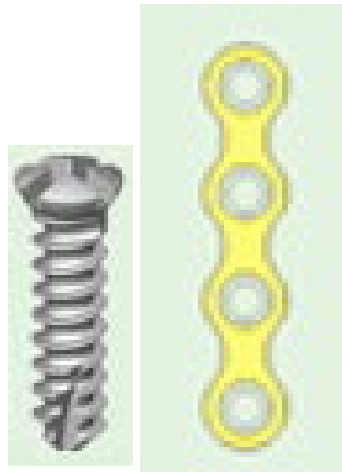


Resim 7: Tamamen açığa çıkarılan femur ve alüminyum foliyo ile izole edilmesi



Resim 8: Klempler ile çift taraflı sabitlenen femur

Femurda osteotomi ile oluşturulacak kırık parçalarını rijit olarak fikse etmek için öncelikle dört delikli titanyum mini plağın (Trimed®, Ankara, Türkiye) (Şekil 9) femur kemiği üzerindeki yeri belirlendi. Delici çelik frez kullanılarak dışarıdan enjektör yardımıyla uygulanan serum fizyolojik soğutma ile vida delikleri açıldı. Osteotomi yapılmadan önce 7 mm uzunluğunda, 1,6 mm çapındaki titanyum mikro vidaların (Trimed®, Ankara, Türkiye) (Şekil 1) iki tanesi osteotomi sonrası rijit fiksasyonu kolaylaştırmak için kırık hattının bir tarafında kalacak şekilde yerleştirildi (Resim 9).

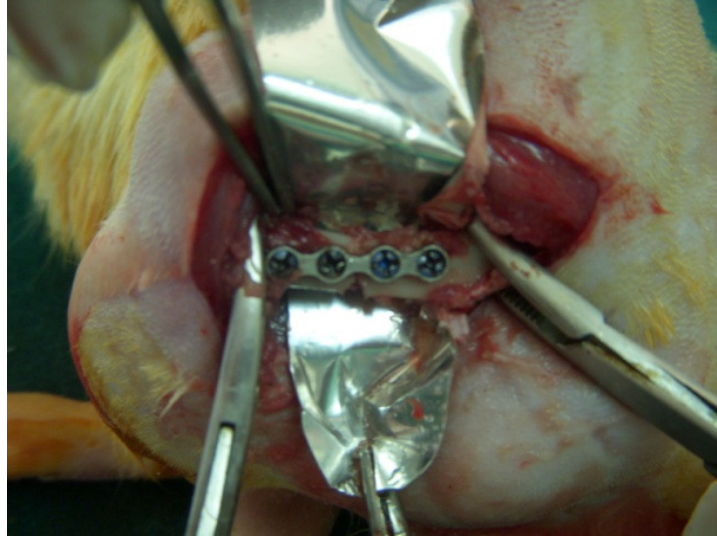


Şekil 1: Titanyum vida ve plak



Resim 9: Plağın yerleştirilmesi

Sonrasında 0.5 mm çapındaki çelik fissür frezler kullanılarak, irrigasyon altında osteotomi yöntemi ile kırık hattı oluşturuldu. Kırık parçalar arada boşluk kalmayacak şekilde uç uca getirilerek titanyum mini plağın rijit fiksasyonu sağlandı (Resim 10).



Resim 10: Osteotomi sonrası kırık parçaların miniplak ve vida ile fiksasyonu

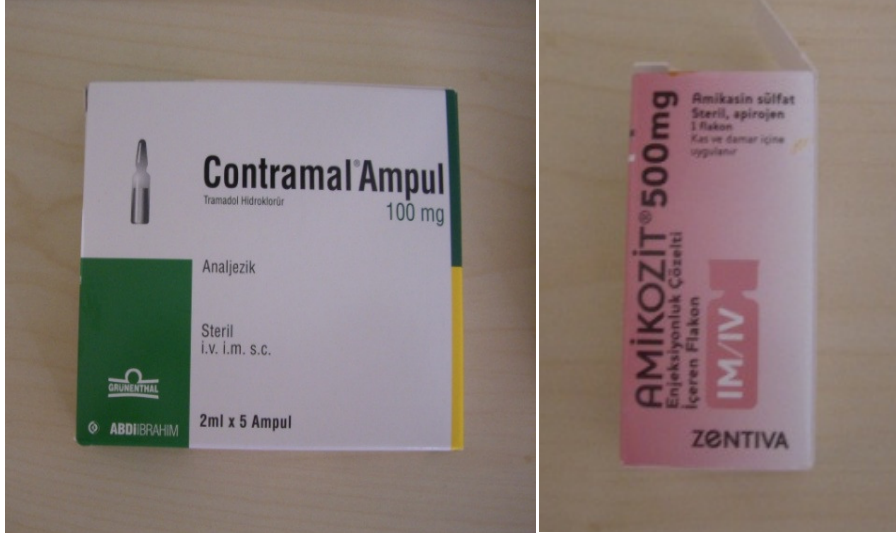
Rijit fiksasyon sonrası cerrahi alan serum fizyolojik ile irrigé edilerek atık dokular uzaklaştırıldı. Kemik yüzeyinden disseke edilen kas ve cilt birlikte 3/0 ipek sutur (Doğsan®, Trabzon, Türkiye) kullanılarak primer yara iyileşmesinin sağlanmasında uygun şartları hazırlamak amacıyla suture edildi (Resim 11).



Resim 11: İnsizyon hattının suture edilmiş hali

3.3.3. Cerrahi Sonrası Bakım

Cerrahi işlem sonrasında suture edilmiş olan operasyon sahası povidon iyot solüsyonu ile dezenfeksiyon amacıyla, yara bölgelerine dikkat edilerek silindi. Özenli bir şekilde kafeslere yerleştirilen sıçanların postoperatif dönemde birbirlerine zarar vermeleri engellendi. Ağrı kontrolü amacı ile operasyondan hemen sonra ve takip eden 2 gün boyunca 1mg/kg/gün IP tramadol HCl (Contramal® 100mg ampul, Abdiibrahim, Türkiye) ve enfeksiyon kontrolü amacı ile aynı şekilde operasyondan hemen sonra başlanarak 3 gün boyunca 5 mg/kg/gün amikasin sülfat (Amikozit® 500 mg flakon, Eczacıbaşı, Türkiye) (Resim 12) intramusküler (IM) olarak verildi.



Resim 12: Postoperatif uygulanan tramadol HCl ve amikasin sülfat

Günlük yapılan kontrollerde sıçanların genel sağlık durumları (genel güçsüzlük, yem ve su alımında azalma, dispne, cilt ve tüy değişikliği vs.) takip edildi. Kayıt döneminde hiçbir sıçanda, çalışma dışı bırakılmasını gerektirecek genel sağlık durumunda kötüleşme veya aşırı ağırlık kaybı (> %20) gibi bulgular izlenmedi.

3.4. Darbeli Elektromanyetik Alan Üretici

Elektromanyetik alanın kemik iyileşmesi üzerindeki etkinliğini araştırmak için, farklı şiddetlerde uygulama yapabilen DEMA üretici EMTS 3005S (BioMedsa, SDÜ-KOSGEB, Isparta, Türkiye) kullanıldı (Resim 13).



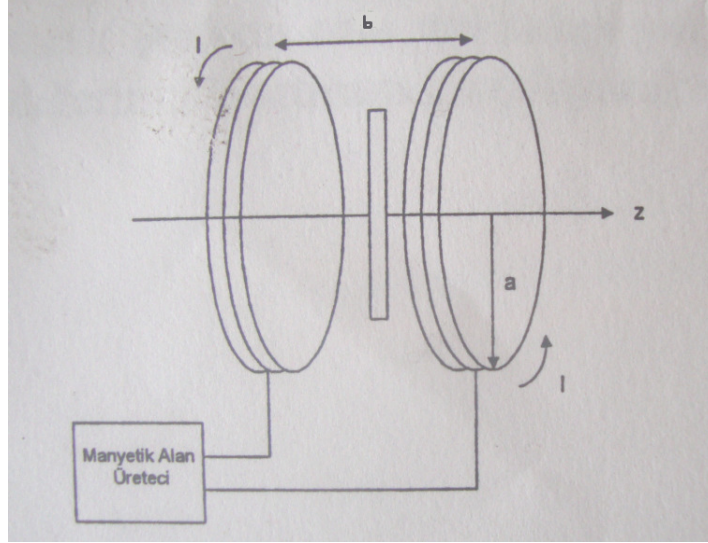
Resim 13: DEMA cihazı (EMTS 3005S)

Kullanılan cihazın teknik özellikleri tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2: EMTS 3005S cihazının teknik özellikleri

AC Besleme	220 V – 15 Hz
DC Besleme	+ 12 V
Güç Harcaması	15 W
Sigorta 1	1 A
Sigorta 2	150 mA
Çıkış	(0,2 V) – (+12 V) 2 Gauss, 10 Gauss, 20 Gauss
Çalışma Sıcaklığı	-10 °C, +40 °C
Çalışma Süresi	15 saat

EMTS 3005S cihazı, üç farklı şiddette (0,2 mT, 1 mT ve 2 mT) DEMA uygulayacak şekilde tasarlandı. Cihazda manyetik alanı oluşturmak için Helmholtz bobinleri kullanıldı (Şekil 2, Resim 14). Bu bobinler yarıçapları a olan, birbirine paralel ve düzlemleri arasındaki uzaklıkları b kadar olan karşılıklı bobinlerden oluşmuş bir sistemdir. Bu sistemde elektromanyetik alan yönü z , bobinlerin merkezi ise z ile gösterilmiştir (Şekil 2).



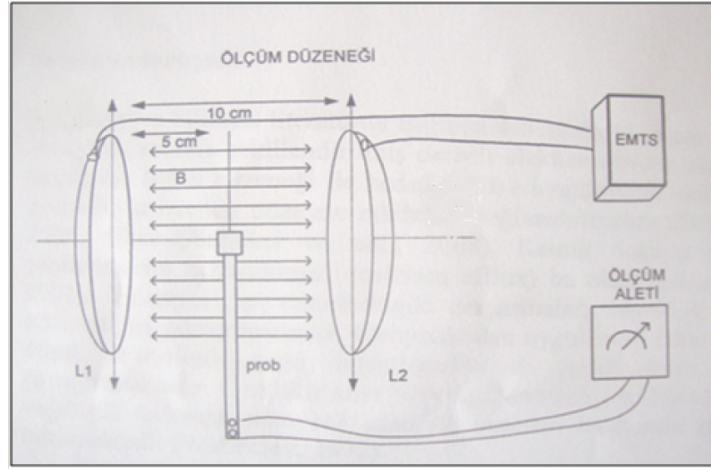
Şekil 2: Şematik Helmholtz bobinleri (a: yarıçap, b: düzlemlerarası uzaklık, I : elektromanyetik alan yönü, z: bobinlerin merkezi)



Resim 14: Deneyde kullanılan Helmholtz bobinlerinden bir tanesi

Bobinlerin her biri, 1 mm çapında yalıtılmış bakır tellerden 180 sarım olacak şekilde hazırlandı. Dairesel sarmal şeklindeki her bir bobinin çapı 6 cm'dir.

Çalışmada uygulanması planlanan frekans ve şiddet ölçümleri, EMTS3005S cihazının güvenilirliğini kontrol etmek için SDÜ-KOSGEB BioMedsa ve uygulamanın yapılacağı SDÜ Deney Hayvanları laboratuvarlarında deneyler öncesinde ve sırasında olmak üzere üç kez teslametre ve frekans ölçer cihazı ile (Şekil 3; Resim 15) tekrarlandı.



Şekil 3: DEMA ölçüm düzeneği



Resim 15: Şiddet ölçüm cihazı, Teslametre

Cihazdan çıkan kutup başları içerisinde deney hayvanlarını barındıran dikdörtgen kutuların karşılıklı kısa kenarlarına, 2'şer tane dairesel şekilli sarmal bobin gelecek şekilde adapte edildi (Resim 16). Helmholtz bobinlerin sarım sayısı ve

apı arttıkça karşılıklı iki bobin arasında DEMA uygulanabilecek mesafe artmaktadır. Dairelerin çapları kutunun tamamını DEMA'ya maruz bırakacak Şekilde hazırlandı. Bu sebeple sıçanların plastik kutu içerisinde nerede olursa olsun DEMA'dan etkilenmesi sağlandı ve herhangi bir hareket kısıtlaması uygulanmadı.



Resim 16: Cihaz ve uygulama sırasında kutuların gruntüsü

3.5. Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulaması

Operasyon tarihlerine göre her grup 5'erli olarak ikiye bölünerek DEMA uygulamasına maruz bırakıldı. İşlemler sırasında cihaz ve deney hayvanları gözlenerek herhangi bir aksamanın olmaması sağlandı ve kesintisiz olarak uygulama yapıldı.

Kontrol grubu, operasyonu takiben 3 hafta boyunca herhangi bir DEMA uygulaması yapılmadan gözlendi. Deney gruplarına ise 3 hafta boyunca günde 1 saat süreyle, 15 Hertz sabit frekansta, 0.2 mT, 1 mT ve 2 mT olmak üzere 3 farklı Şiddette DEMA uygulandı (Resim 17). Deney gruplarına DEMA uygulamasını takiben tüm gruplarda 1 hafta süreyle beklenip sakrifikasyon işlemleri yapıldı. Çalışma süresince deney grubundaki hayvanların uygulama için cihaza ve sonrasında kafese transferleri sırasında, osteotomi ve fiksasyon yapılmış olan femur kemiklerine ağırlık gelmemesi amacıyla arka bacakları üzerine bırakılmamalarına zen gösterildi.



Resim 17: Farklı şiddetlerde DEMA uygulanan 5'erli gruplar

DEMA uygulanırken şiddeti etkileyebilecek çevresel faktörlerin elimine edilmesi amacıyla; cihazın ve kutuların üzerinde bulunduğu masa metal parçası olmayan tamamen ahşaptan ve sıçanların içerisinde bulunduğu kutular şeffaf plastikten seçildi. DEMA uygulanan oda içerisindeki metal kafes ve rafların yeterince uzakta olmasına ve bilgisayar, cep telefonu gibi elektronik cihazların bulunmamasına özen gösterildi.

3.6. Histopatolojik ve Histomorfometrik Analizler

3.6.1. Örneklerin Hazırlanması

Postoperatif 4. hafta sonunda inhalasyon yoluyla yüksek dozda dietil eter anestezisinin letal etkisi sağlandıktan sonra tüm deney ve kontrol gruplarının sakrifikasyon işlemleri yapıldı. Sakrifikasyon tarihlerine göre toplam 4 aşamada 10'arlı gruplar halinde tüm deney ve kontrol hayvanlarının operatif işlemleri tamamlandı. Sıçanların yumuşak dokuları disseke edildi ve femurları mini plakların 2'şer mm uzağından kesilerek alındıktan sonra vida ve plaklar hassas bir şekilde çıkarıldı. Materyaller %10'luk tamponlanmış formalin (Merck®, Darmstadt,

Almanya) içeren tüplere yerleştirildi. Kesitlerin hazırlanması ve histopatolojik değerlendirmeler için materyaller İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi Bilim Dalı'na gönderildi.

Gönderilen materyaller %10'luk tamponlu nötral formalin içerisinde 1 hafta süreyle fikse edildikten sonra dokuları formalini uzaklaştırmak için örnekler önce akan çeşme suyunda, sonra tamponlu fosfat solüsyonunda (Merck®, Darmstadt, Almanya), en son ise distile suda yıkandı. Bu işlemler sonunda dokular formalinden tamamen arındırılmış oldu. Sonra tüm materyal %50'lik formik asit ve %20'lik sodyum sitrat çözeltilerinden birer ölçek alınarak hazırlanan solüsyonda dekalsifiye edildi. Dekalsifiye parçalar rutin doku takibinden geçirildikten sonra hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5-7 µm (mikrometre) kalınlığındaki kesitler hematoksilen-eozin yöntemiyle boyandı.

3.6.2. Histopatolojik Değerlendirme

İncelememiz sırasında Olympus Soft Imaging System Analysis FIVE (Olympus, Münster, Almanya) görüntü analiz sistemi kullanıldı. Tüm mikroskopik incelemeler Olympus BX50 (Olympus, Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunda yapıldı. Elde edilen sonuçlardan Nikon E4500 (Nikon, Tokyo, Japonya) dijital kamera kullanılarak, 1024x768 piksel alan ve yüksek çözünürlük modunda yapılan fotoğraflama ile resim örnekleri alındı. İncelenen kesitlerde 400 büyütme altında tüm görüntü alanını kaplayan üçer saha esas alınarak dijital görüntüler elde edildi ve bu alanlarda iltihap, nekroz, fibrozis, membranöz ve kondral kemik yapımı göz önünde bulundurularak yeni kemik yapımının kapladığı alanlar hesaplandı. Bu bulgulara bir büyük büyütme alanında kapladıkları bölgenin yüzdesine göre %0-5 (0), %5-30 (1), %30-60 (2) ve >%60 (3) olmak üzere değer verildi.

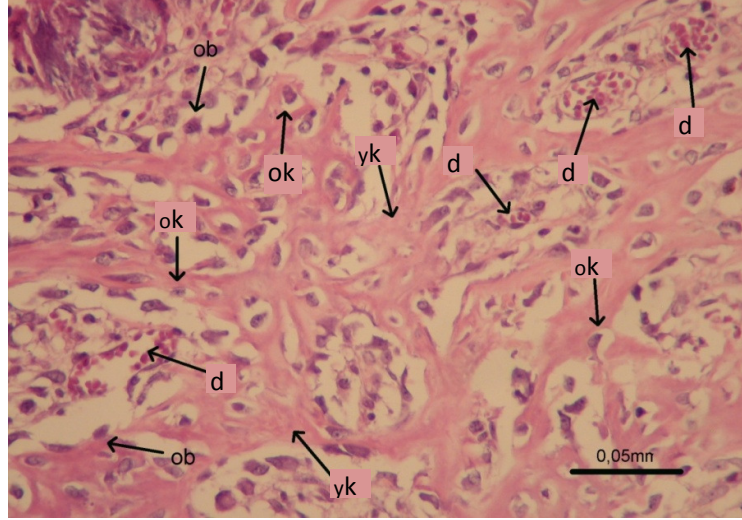
Kemik yapımı değerlendirmesinde defekt alanında hiç kemik yapımı yoksa (0), defektin %5-30'u membranöz ya da kondral kemik ile dolmuşsa (1), %30-60'ı membranöz ya da kondral kemik ile dolmuşsa (2) , >%60'ı membranöz ya da kondral kemik ile dolmuşsa (3) değerleri verilerek skorlandı (Tablo 3).

Tablo 3: Defekt alanında kemik yapımı değerlendirmesi

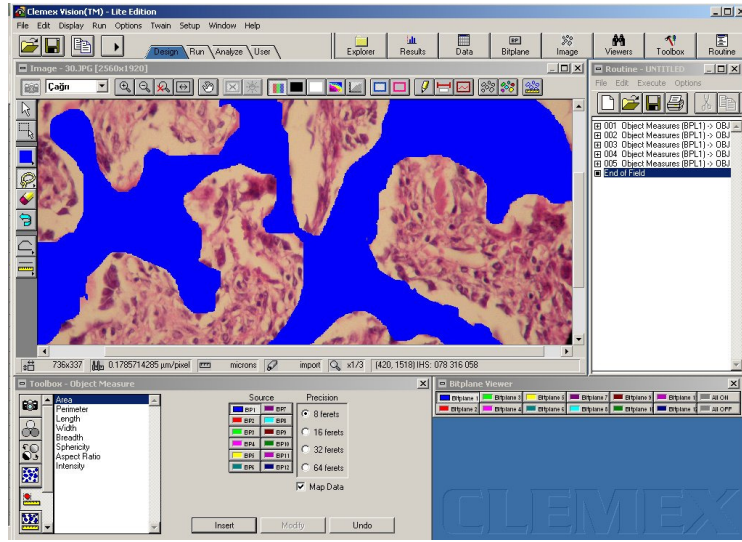
Membranöz veya kondral kemikleşme alanı yüzdesi	Kemikleşme alanı skoru
%0-5	0
%5-30	1
%30-60	2
%60-100	3

3.6.3. Histomorfometrik Değerlendirme

Hematoksilen–eozin ile boyanarak hazırlanmış preparatlar Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu (Nikon, Tokyo, Japonya) ile değerlendirildi. Bu değerlendirme esnasında ışık mikroskobuna bağlı bulunan Nikon Coolpix 5000 (Nikon, Tokyo, Japonya) dijital fotoğraf makinası ile her preparatta aynı alanın fotoğrafları çekildi. Fotoğraflar çekilirken aynı mikroskop büyütmesinde Nikon micrometer microscope slide (MBM11100 Stage Micrometer Type A) görüntüsü de dijital olarak kaydedildi. Tüm görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı ve Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis programı (Clemex Technologies, Quebec, Kanada) ile değerlendirmeye başlandı. Değerlendirme başlangıcında Nikon micrometer microscope slide görüntüsü uzunluk kalibrasyonu yapıldı. Ölçümler Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis programı ile 139345,5 μm^2 'lik bir alanda yapıldı. Osteoblastlar, osteoklastlar ve damarlar, aynı görüntü analiz program kullanılarak 139345,5 μm^2 'lik alan içerisinde işaretlendi (Resim 18). Bunların dışında yeni kemik formasyonu bulunan yüzey alanı da bu program kullanılarak ölçüldü (Resim 19).



Resim 18: Osteoblast (ob), osteoklast (ok), damar (d) ve yeni kemik (yk) yapımının işaretlendiği bilgisayar görüntüsü



Resim 19: Yeni kemik yapımı olan bölgeye ait yüzey alanının histomorfometrik analizi

Ölçümler sırasında, zarar görmüş hücreler değerlendirilmeye alınmadı. İşaretlenmiş hücreler aynı görüntü analiz programını kullanarak otomatik olarak sayıldı. Görüntü analizini yapan kişi, grupları ve olguları bilmeden değerlendirdi; böylece çalışmanın tek kör yapılması sağlandı.

3.7. İstatistik

Sunulan araştırmada istatistik analizler SPSS (Statistical Package for Social Science) 18.0 (Chicago, IL, 2010) yazılım paket programı kullanılarak yapıldı. Analiz sonuçları ortalama $(\bar{x}) \pm$ standart sapma (SS) olarak verildi ve $p < 0.05$ istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

Deney hayvanları ağırlıkları analizinden önce varyans-kovaryans matrisinin homojenliğini test etmek için Box's testi kullanıldı. Varyans-kovaryans matrisinin homojen olmadığı tespit edildiği için nonparametrik metodlardan faydalandı. Grup içi ameliyat öncesi ve sakrifiye edildiği dönemdeki sıçan ağırlıkları arasındaki fark Wilcoxon işaret metodu ile, ameliyat öncesi ve sakrifiye edildiği dönemde ayrı ayrı olmak üzere deney hayvanı ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılması ise Kruskal Wallis metodu kullanılarak analiz edildi.

Histopatolojik olarak elde edilen sınıflandırılmış veriler ile gruplar arasında iki yönlü tablolar oluşturularak G testi (likelihood ratio) uygulandı. İki yönlü tablolarda hücrelerdeki gözlem adedinin 5'in altına düşmesi istenmez. G testi, 5'in altında değer alan hücre sayısının, toplam hücre sayısının %20'sini geçtiği durumlarda Ki-kare testi yerine kullanılır.

Histomorfometrik analiz parametrelerinden osteoblast sayısı, osteoklast sayısı, damar sayısı ve yeni kemik yüzey alanı verileri $\sqrt{(x + 3/8)}$ transformasyonuna tabi tutuldu. Kolmogrov – Smirnov testi ile normal dağılıma uyum kontrolü, Levene testi ile varyansların homojenliği kontrolü yapıldıktan sonra, osteoblast sayısı verilerinin parametrik testlerin ön şartlarını sağladığı anlaşıldığından grupların osteoblast sayısı ile ilgili istatistik analizde tek yönlü varyans analizi tekniği (One way ANOVA) kullanıldı. Grup ortalamaları arasındaki farkların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Bonferroni testi kullanıldı. Osteoklast sayısı, damar sayısı ve yeni kemik yüzey alanı parametrelerine ait verilerin ise parametrik testlerin ön şartlarını sağlamadıkları görüldü. Bu nedenle bu üç parametrenin grup rank ortalamaları (medyanlar) arasındaki farkların belirlenmesinde Kruskal Wallis metodu kullanıldı. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Bonferroni-Dunn's testi kullanıldı. Ayrıca grup içi histomorfometrik parametrelerin kendi aralarında korelasyonları Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanı ve Femur Örnekleri

Sunulan araştırmada 50 adet deney hayvanı (100 femur) kullanılmıştır (Tablo 4). Bunların 48'inden (96 femur) iyileşen kırık kemik hattını içeren femur örnekleri elde edilebilmiş (Kontrol grubu= 10, 0.2 mT grubu= 10, 1 mT grubu= 9 (dokuz), 2 mT grubu= 19), 1(bir) deney hayvanı (1 mT grubu) (2 femur) genel anestezi komplikasyonuna bağlı olarak, diğeri ise (2 mT grubu) (2 femur) postoperatif bakım döneminde ölmüştür. 2 mT grubunda plak kırılmalarının yüksek oranda görülmesi nedeniyle bu grup için deneyler tekrarlanmıştır. Titanyum plakların bir kısmının daha önce de fiksasyon amacıyla kullanılmış olması plaklarda metal yorgunluğu meydana getirmiştir.

Tablo 4: Deney hayvanı ve femur örneklerinin gruplara göre dağılımı

Gruplar	Deney Hayvanı	Femur	çalışmaya dahil edilen femur
Kontrol	10	20	10
0.2 mT	10	20	14
1 mT	10	20	12
2 mT	20	40	14
Toplam	50	100	50

48 deney hayvanına ait 96 femurun 44'ü kemik iyileşme sürecinde meydana gelen kaynamama (Kontrol= 10, 0.2 mT= 5 (beş), 1 mT= 4 (dört), 2 mT= 23), abse (2 mT= 1 (bir)) veya osteomyelit (1 mT= 1 (bir)) nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır (Tablo 5).

Kemik iyileşme sürecinde, kemik bütünlüğünün hiç oluşmadığı 44 femur kemiğinin 29'unda ağırlıklı olarak fiksasyon amacıyla kullanılan plaklardaki metal yorgunluğuna bağlı plak kırılması (Kontrol= 3 (üç), 0.2 mT= 3 (üç), 1 mT= 4 (dört) ve 2 mT= 19); 15'inde ise plaklarda bükülme (Kontrol= 7 (yedi), 0.2 mT= 2 (iki), 1 mT= 1 (bir) ve 2 mT= 5 (beş)) meydana geldiği anlaşılmıştır. Ayrıca histopatolojik preparatların hazırlanması sürecinde, iki örnek (0.2 mT= 1 (bir) ve 1 mT= 1 (bir)) zarar gördüğü için histopatolojik ve histomorfometrik incelemede değerlendirme dışı bırakılmıştır (Tablo 5).

Aynı deney hayvanında çalışma dışı bırakmayı gerektiren anomali gösteren femurlar araştırma dışı bırakılırken, herhangi bir sıra dışı seyir göstermeyen diğer femur çalışmaya dahil edilmiştir. Sonuç olarak Kontrol grubunda 10, 0.2 mT grubunda 14, 1 mT grubunda 12 ve 2 mT grubunda 14 olmak üzere 50 femur çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 4).

Makroskopik olarak Kontrol grubunda 1 (bir) ve 0.2 mT grubunda 2 (iki) femurda kırık iyileşmesinin geniş kallus dokusu oluşumu ile gerçekleştiği görülmüştür. Diğer kemik örneklerinde geniş kallus dokusunun meydana gelmediği gözlenmiştir.

4.2. Deney Hayvanı Ağırlığı

Ameliyat öncesi ve sakrifiye edildikleri postoperatif 4. haftadaki sıçan ağırlığı bulguları incelendiğinde (Tablo 6), tüm gruplarda deney hayvanlarının preoperatif ve postoperatif ağırlıkları arasında azalma olduğu (Kontrol ($p= 0.083$), 0.2 mT ($p= 0.241$) ve 1 mT ($p= 0.051$)) ancak bunun sadece 2 mT grubunda istatistik olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p= 0.008$).

Hem preoperatif hem postoperatif dönemde ayrı ayrı gruplar arası deney hayvan ağırlıkları bakımından ise istatistik olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür (Preoperatif 1. gün, $p= 0.152$; Postoperatif 4. hafta, $p= 0.261$).

Tablo 5: Çalışma dışı bırakılan femurların gruplara göre dağılımı (Femur sayısı (n))

Gruplar	Genel anestezi komplikasyonu sonucu ölüme bağlı kaybedilen femur	Postoperatif takipte ölüme bağlı kaybedilen femur	İyileşmeyen Femur				Laboratuvar Aşamasında Kaybedilen Femur	Toplam Femur
			Kaynamama		Osteomyelit	Apse		
			Plak kırılmasına bağlı	Plak bükülmesine bağlı				
Kontrol	-	-	3	7	-	-	-	10
0.2 mT	-	-	3	2	-	-	1	6
1 mT	2	-	3	1	1	-	1	8
2 mT	-	2	19	4	-	1	-	26
Toplam Femur	2	2	28	14	1	1	2	50

Tablo 6: Preoperatif ve postoperatif deney hayvanı ağırlıkları

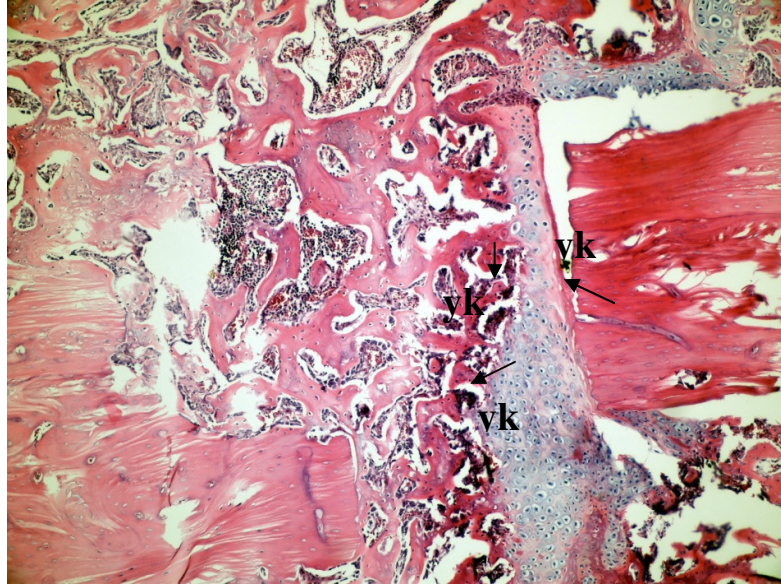
Gruplar	Preoperatif 1. Gün		Postoperatif 4. Hafta		p
	$\bar{x} \pm SS$	<u>%95 Güvenilirlik Aralığı</u> (Alt Sınır - Üst Sınır)	$\bar{x} \pm SS$	<u>%95 Güvenilirlik Aralığı</u> (Alt Sınır - Üst Sınır)	
Kontrol	444.70±47.48	(417.17 - 472.23)	435.90±48.60	(413.04 - 458.76)	0.083
0.2 mT	439.60±49.22	(412.07 - 467.13)	420.10±22.62	(397.24 - 442.96)	0.241
1 mT	447.56±35.75	(418.54 - 476.57)	413.11±37.34	(389.01 - 437.21)	0.051
2 mT	479.11±35.48	(450.09 - 508.13)	446.00±27.39	(421.90 - 470.10)	0.008*

*= İstatistik olarak anlamlılık düzeyi ($p < 0.05$)

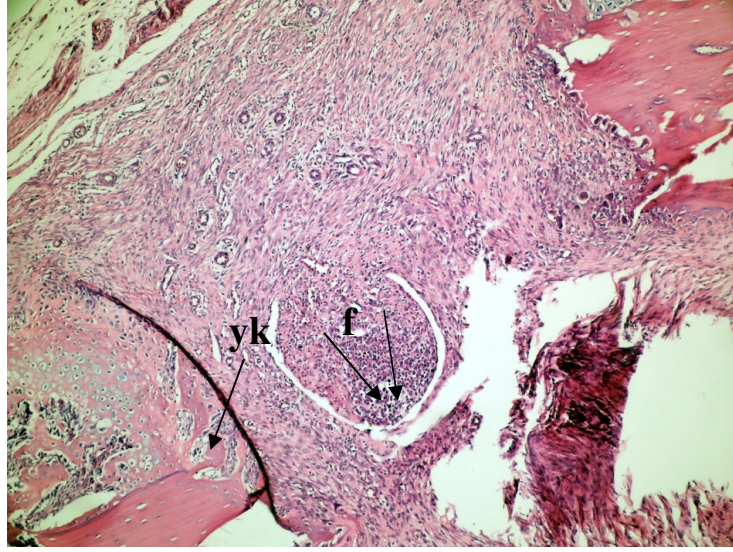
4.3. Histopatoloji

Deney hayvanlarının femur kemiğinde osteotomi yöntemiyle oluşturulan kırık hattından elde edilen histopatolojik kesitlere ait resimlerde (Resim 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27) yeni kemik yapımı alanı (yk), nekroz alanı (n), fibrozis alanı (f) ve iltihabi özellik gösteren alan (i) işaretlenerek gösterilmiştir. Sunulan tez kapsamında araştırmaya ait kullanılan resimlerde; pembe renkli bölgeler 'yk', boşluklar içeren siyah renkli görünen bölgeler 'n', açık pembe-gri renk içeren bölgeler 'f' ve yuvarlak mikroabseleşme gösteren pembe iltihabi alanlar 'i' olarak işaretlenmiştir.

Kontrol grubuna ait kesitlerde kırık kemik hattına komşu yüzeylerde yeni kemik yapımı alanlarıyla birlikte yoğun fibröz doku oluşumlarının da bulunduğu ve normal kemik iyileşmesinin bir parçası olarak bu dokuların da kemikleşmekte olduğu görülmüştür (Resim 20, 21).

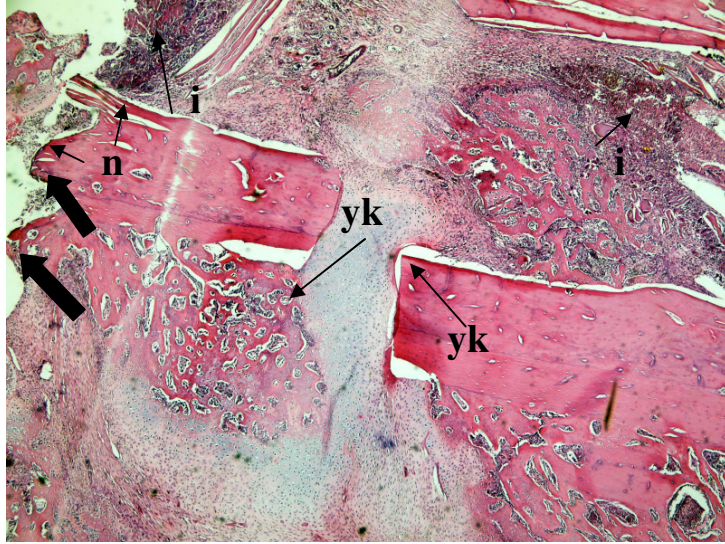


Resim 20: Kontrol grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık kemik hattına komşu yüzeylerde yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X100)

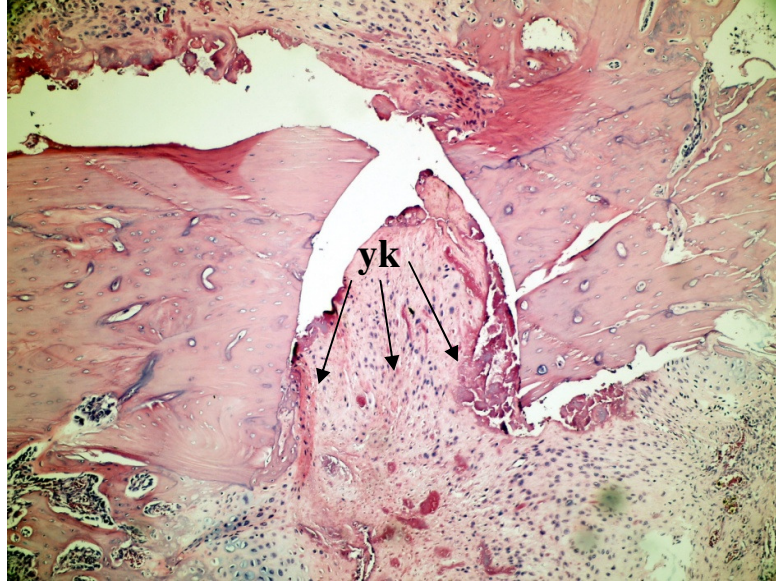


Resim 21: Kontrol grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık kemik uçları arasında fibröz doku (f) ile birlikte kırık hattına komşu yüzeylerde yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X100)

0.2 mT grubunda hiç iltihap olmayan örnekler görülmüştür. Bu durum sadece 0.2 mT grubu için geçerlidir ve diğer gruplardaki örneklerin hepsinde mutlaka farklı oranlarda iltihap alanları bulunmaktadır.

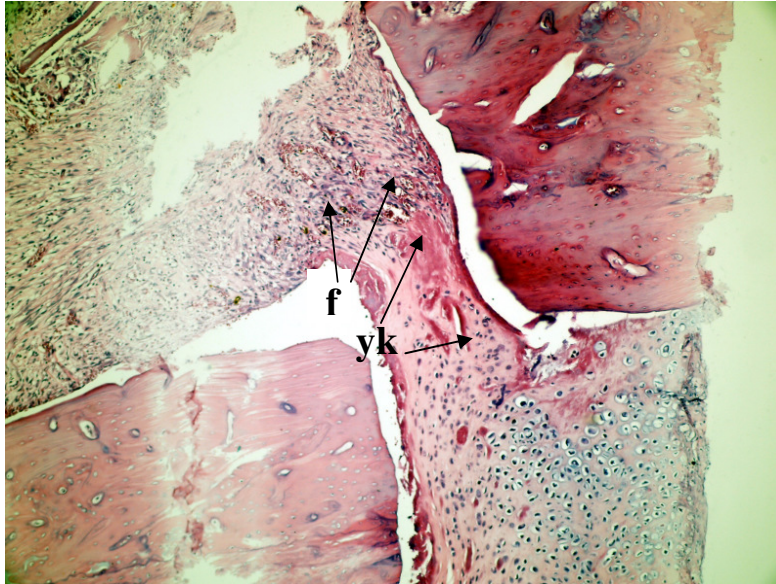


Resim 22: 0.2 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Mikrovidanın geçtiği alan siyah kalın oklarla gösterilmiştir. Vidanın geçtiği alanlarda yer yer nekrotik dokular (n) ve iltihabi dokular (i), kırık kemik hattına komşu yüzeylerde yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X40)

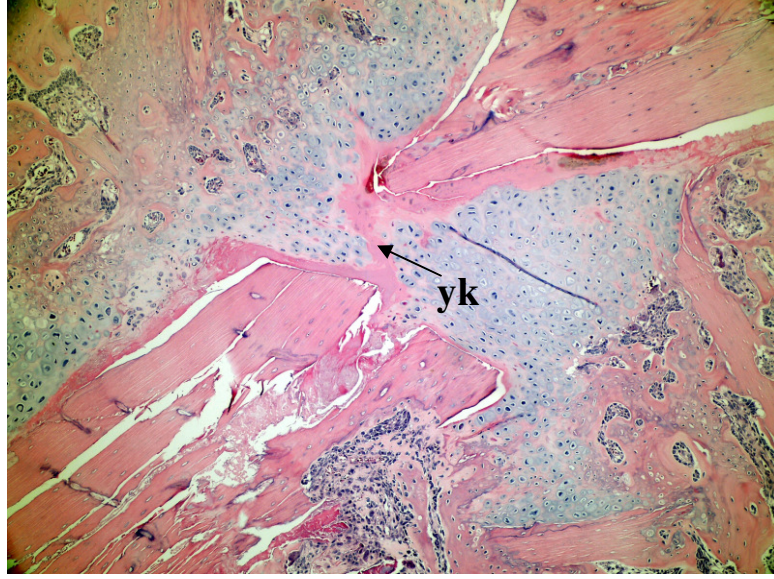


Resim 23: 0.2 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık kemik uçları arasında yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X100)

1 mT grubundan elde edilen kesitlerde yeni kemik yapımı alanları görülmüştür. Aynı zamanda iyileşme alanlarında kemikleşmekte olan fibröz dokular görülmüştür.

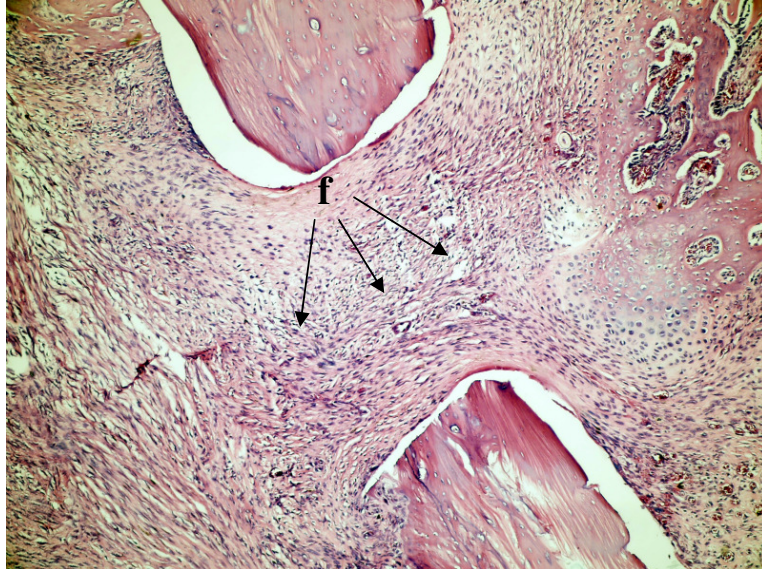


Resim 24: 1 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık parçalar arasında yeni kemiğe (yk) dönüşmekte olan hyalin kıkırdak ve fibröz dokular (f) (H-E, X100)

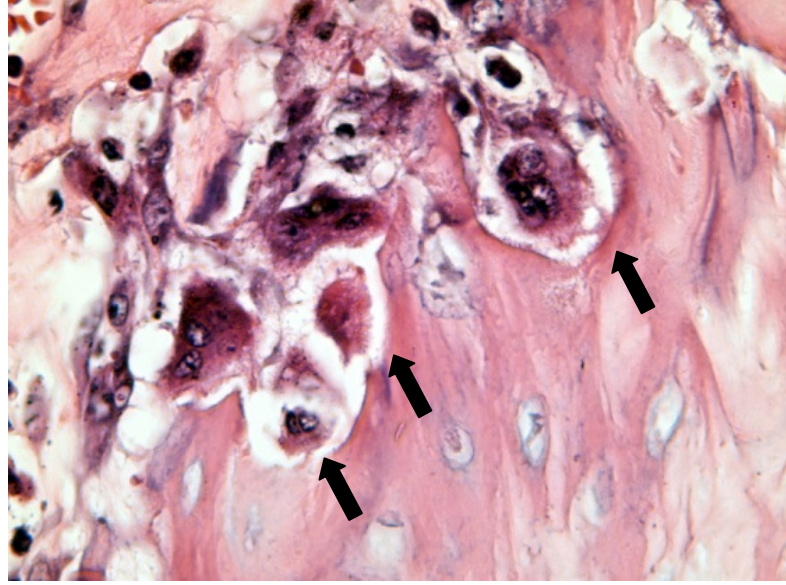


Resim 25: 1 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık parçalar arasında köprü şeklinde yeni kemik yapımı (yk) (H-E, X100)

2 mT grubuna ait kesitlerde nekrozis oranının azalmasıyla birlikte fibrozis oranının yüzde olarak arttığı görülmüş fakat bu iki parametre için de yapılan G testi sonucunda elde edilen skorların DEMA uygulama şiddetlerinden bağımsız olduğu belirlenmiştir.



Resim 26: 2 mT grubuna ait histopatolojik kesit. Kırık parçalar arasında yoğun fibröz doku (f) oluşumu (H-E, X100)



Resim 27: 2 mT grubundan alınmış histopatolojik kesit. Yeniden şekillenme alanlarındaki osteoklastik aktivite (H-E, X400)

Sunulan araştırmada histopatolojik bulgulara karşılık gelen yüzdelik oranların 0-3 arası skora metoda (Erdem 2006) göre aldığı değerler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Histopatolojik bulguların skorlanması

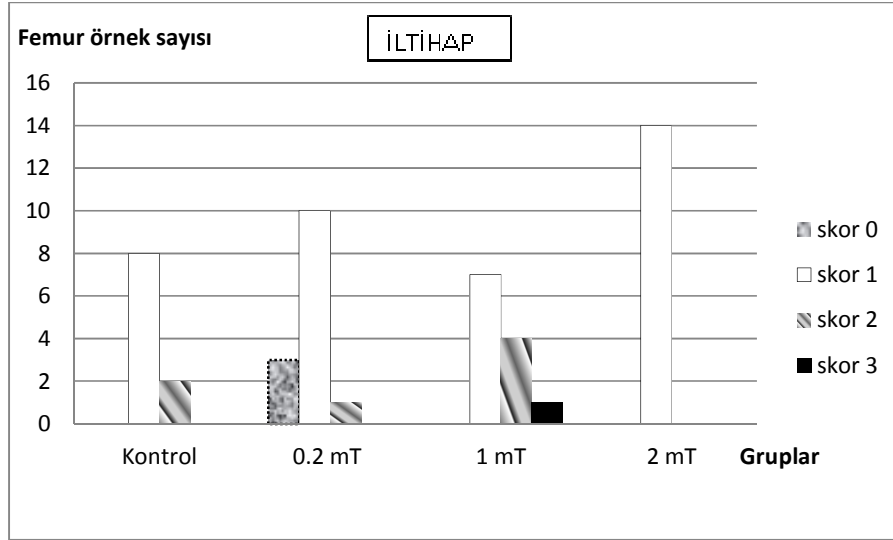
	%0-5	%5-30	%30-60	> %60
İltihap	0	1	2	3
Nekrozis	0	1	2	3
Fibrozis	0	1	2	3
Yeni Kemik Yapımı	0	1	2	3

Belirtilen skora göre, gruplardaki deneklerin iltihap varlığı düzeyleri ($p=0.025$) ve yeni kemik yapımı parametresi ($p=0.019$) değerlendirildiğinde yapılan G testi sonucunda skorların gruplara uygulanan DEMA şiddetlerinden bağımsız olmadığı görülmüştür. Nekroz varlığı ($p=0.088$) ve fibrozis ($p=0.075$) parametreleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise bu iki parametrenin skorları DEMA uygulama şiddetlerinden bağımsızdır. Araştırmada elde edilen histopatolojik bulgular ve istatistik değerlendirme sonuçları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8: Gruplara ait histopatolojik bulguların istatistik değerlendirmesi (n= femur örnek sayısı)

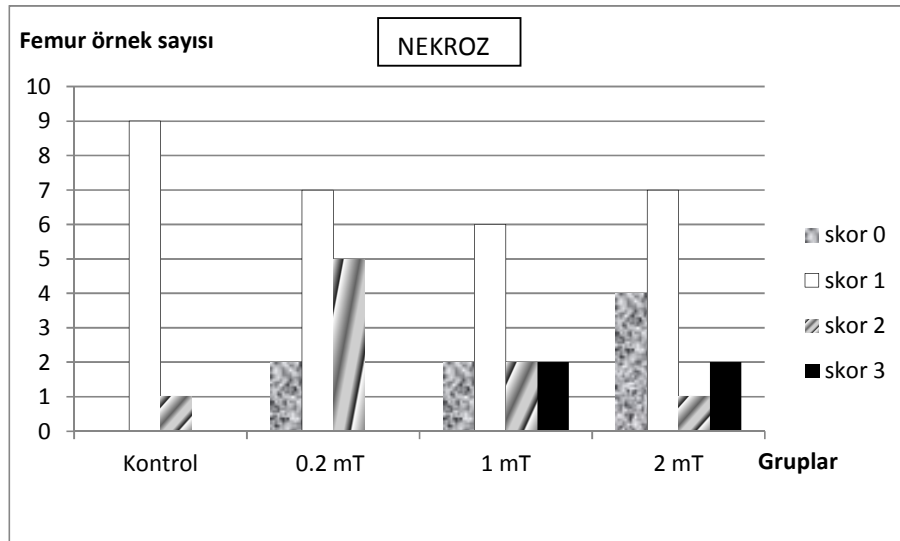
Skor Gruplar	İltihap				Nekrozis				Fibrozis				Yeni Kemik Yapımı				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Kontrol	n	0	8	2	0	0	9	1	0	0	0	5	5	0	1	8	1
	%	%0	%80	%20	%0	%0	%90	%10	%0	%0	%0	%50	%50	%0	%10	%80	%10
0.2 mT	n	3	10	1	0	2	7	5	0	0	5	8	1	0	5	6	3
	%	%21.4	%71.4	%7.1	%0	%14.3	%50	%35.7	%0	%0	%35.7	%57.1	%7.1	%0	%35.7	%42.9	%21.4
1 mT	n	0	7	4	1	2	6	2	2	0	3	6	3	0	8	2	2
	%	%0	%58.3	%33.3	%8.3	%16.7	%50	%16.7	%16.7	%0	%25	%50	%25	%0	%66.7	%16.7	%16.7
2 mT	n	0	14	0	0	4	7	1	2	0	2	10	2	3	6	3	2
	%	%0	%100	%0	%0	%28.6	%50	%7.1	%14.3	%0	%14.3	%71.4	%14.3	%21.4	%42.9	%21.4	%14.3
		$\chi^2 = 19.047$ $p = 0.025^*$				$\chi^2 = 15.095$ $p = 0.088$				$\chi^2 = 11.453$ $p = 0.075$				$\chi^2 = 19.876$ $p = 0.019^*$			

* = İstatistik olarak anlamlılık düzeyi (p < 0.05)



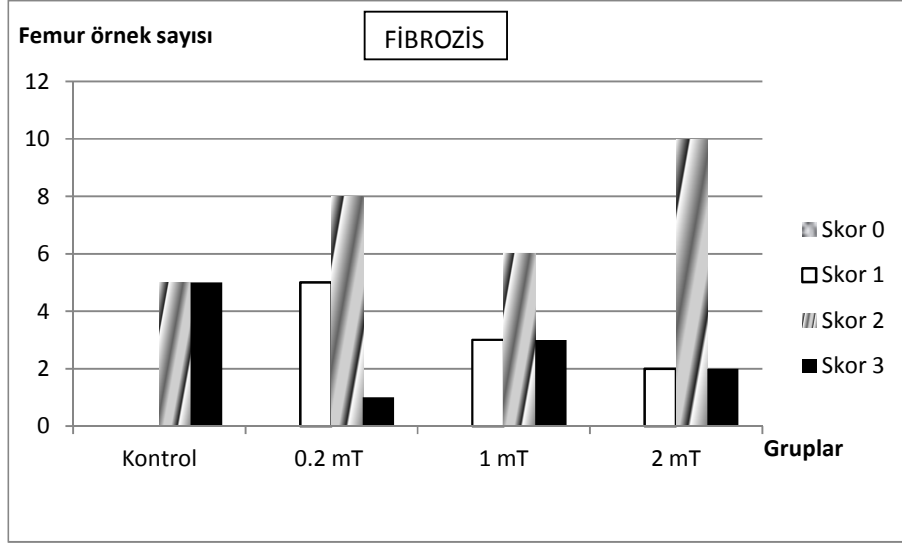
Şekil 4: Histopatolojik olarak iltihap varlığının gruplara göre dağılımı

Grafik incelendiğinde kontrol grubu, 0.2 mT, 1 mT ve 2 mT grubuna ait örneklerde 1 skorunda iltihap oranı tüm örneklerin %78'inde gözlenmiştir. 0.2 mT grubunda 0 skorunda iltihap %21.4 oranında, 1 mT grubunda 3 skorunda %8.3 oranında iltihap varlığı görülürken bu oranlar diğer grupların hiçbirinde görülmemektedir. 2 mT grubunda ise örneklerin hepsinin 1 skorunda iltihap varlığı gösterdiği dikkat çekmektedir.



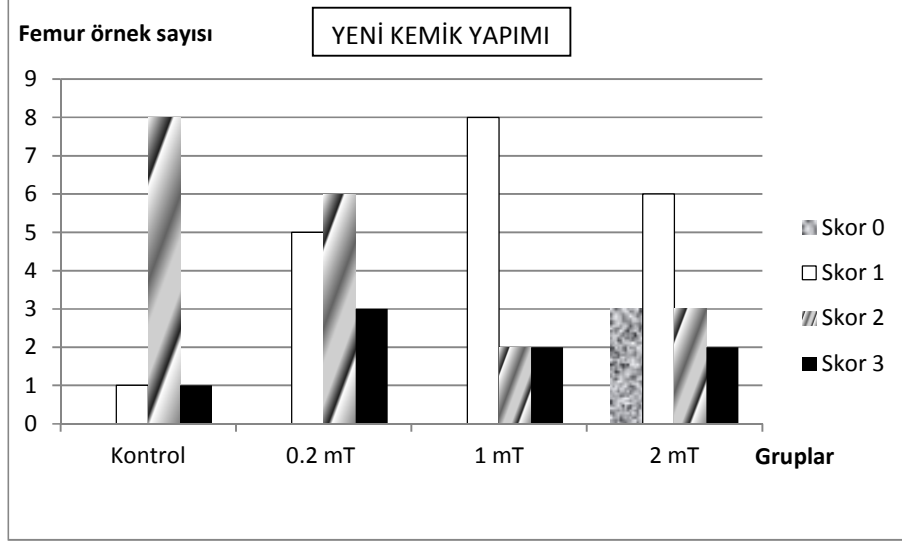
Şekil 5: Histopatolojik olarak nekrozis varlığının gruplara göre dağılımı

Şekil 5 incelendiğinde kontrol grubuna ait örneklerde 1 skorunda nekroz varlığı %90 oranında gözlenirken bu oranın 0.2 mT, 1 mT ve 2 mT gruplarında %50 oranına düştüğü izlenmektedir. 1 mT ve 2 mT gruplarında 3 skorunda nekroz varlığı %16.7 ve %14.3 oranında görülürken bu oran diğer gruplarda görülmemektedir.



Şekil 6: Histopatolojik olarak fibrozis varlığının gruplara göre dağılımı

Grafik incelendiğinde kontrol grubuna ait örneklerde %50 oranında 2 skorunda ve %50 oranında 3 skorunda fibrozis varlığı izlenmektedir. 0.2 mT, 1 mT ve 2 mT gruplarında fibrozis varlığı oranı daha çok 2 skorunda izlenmektedir. Tüm gruplar karşılaştırıldığında 3 skorunda fibrozis varlığı oranının kontrol grubunda %50 seviyesinde olması dikkat çekicidir.

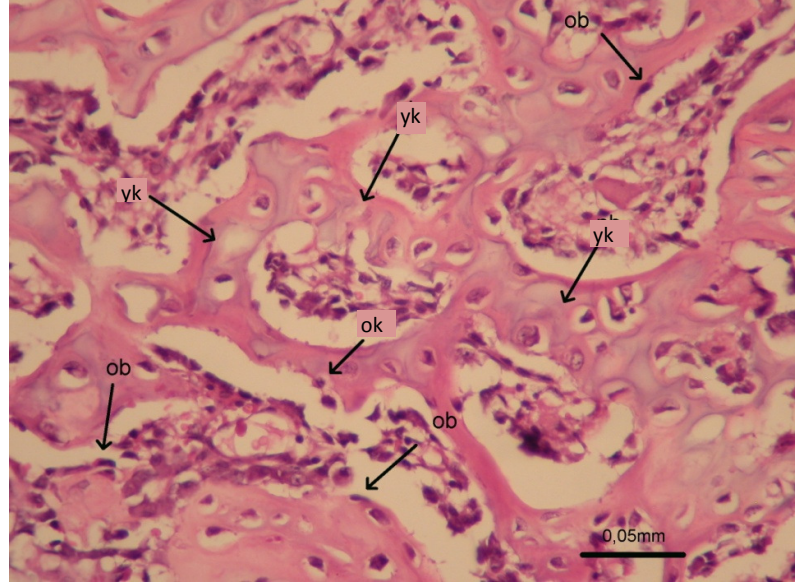


Şekil 7: Histopatolojik olarak yeni kemik yapımının gruplara göre dağılımı

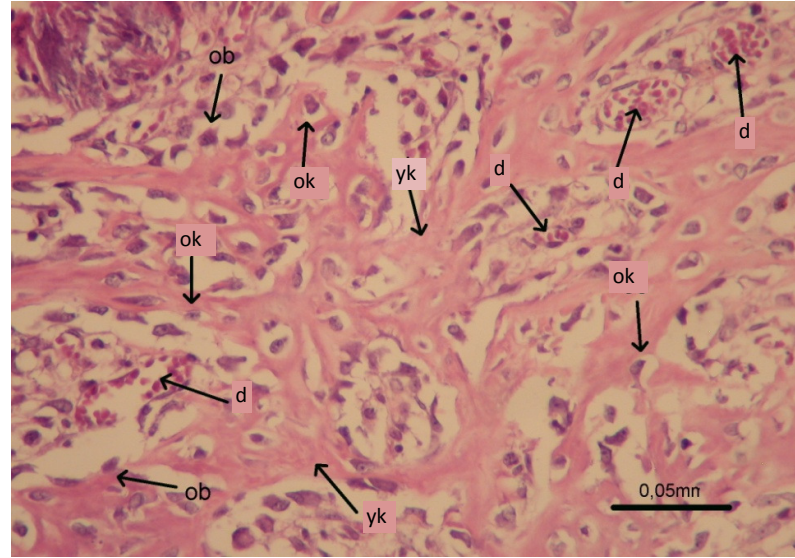
Yeni kemik yapımı parametresine ait grafik incelendiğinde kontrol grubuna ait örneklerin %80'inde 2 skorunda yeni kemik yapımı izlenmektedir. 0.2 mT grubunda 3 skorunda yeni kemik yapımı %21.4 seviyesindedir. 1 mT grubunda %66.7 gibi bir oran 1 skorunda görülürken, 2 mT grubunda ise hiç yeni kemik yapımının olmadığı 0 skorunun %21.4 oranında gözlenmesi dikkat çekicidir.

4.4. Histomorfometri

Gruplardan alınan histopatolojik kesitlere ait resimlerde (Resim 28, 29) osteoblastlar (ob), osteoklastlar (ok), damarlar (d) ve yeni oluşan kemik (yk) işaretlenerek gösterilmiştir. Resimlerde koyu renkli tek katlı yassı epiteli andıran oval şekilli hücrelerin bulunduğu yerler ob, koyu renkli ve kenarında rezorpsiyonda etkili kıvrımlı yüzey barındıran hücrelerin bulunduğu yerler ok, yan yana dizilmiş pembe boyanmış çeperli görüntüsü olan damarların bulunduğu yerler d, açık pembe boyanmış yeni kemik oluşumunu gösteren alanlar yk olarak temsil edilmektedir.

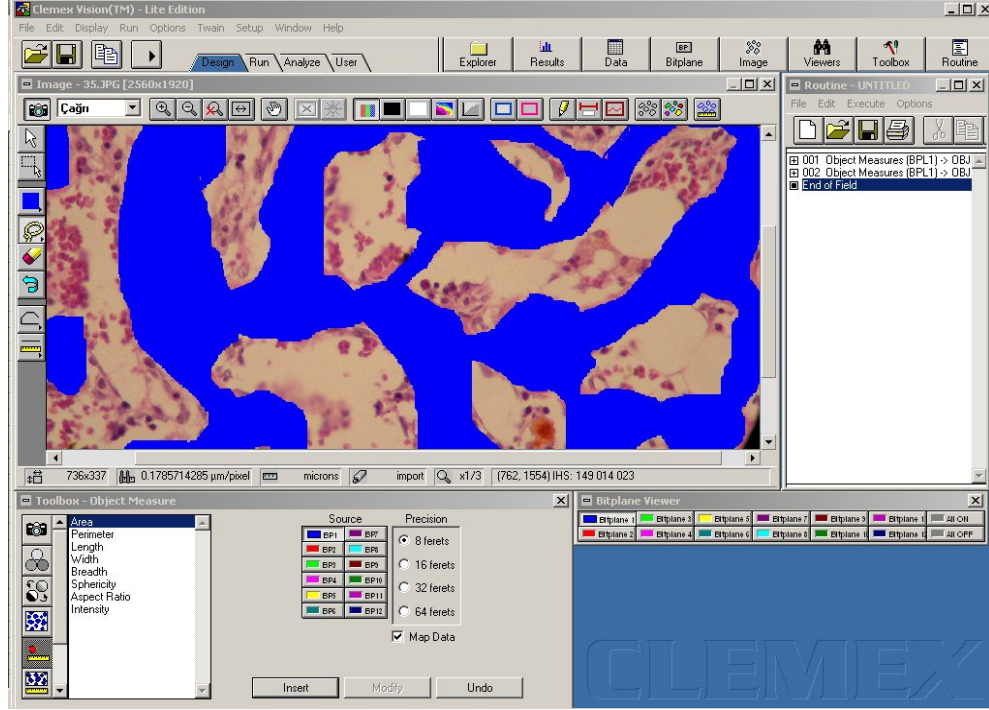


Resim 28: Kontrol grubuna ait histopatolojik kesit (ob, ok, yk) (H-E, X200)



Resim 29: 1 mT grubuna ait histopatolojik kesit (ob, ok, yk, d) (H-E, X200)

Histopatolojik kesite ait resimde (Resim 30), kemik yapımı gözlenen pembe alanların bilgisayar programı vasıtasıyla maviye boyanarak ölçülmesi sonucu elde edilen mavi alan yeni kemik yapımı yüzey alanını temsil etmektedir.



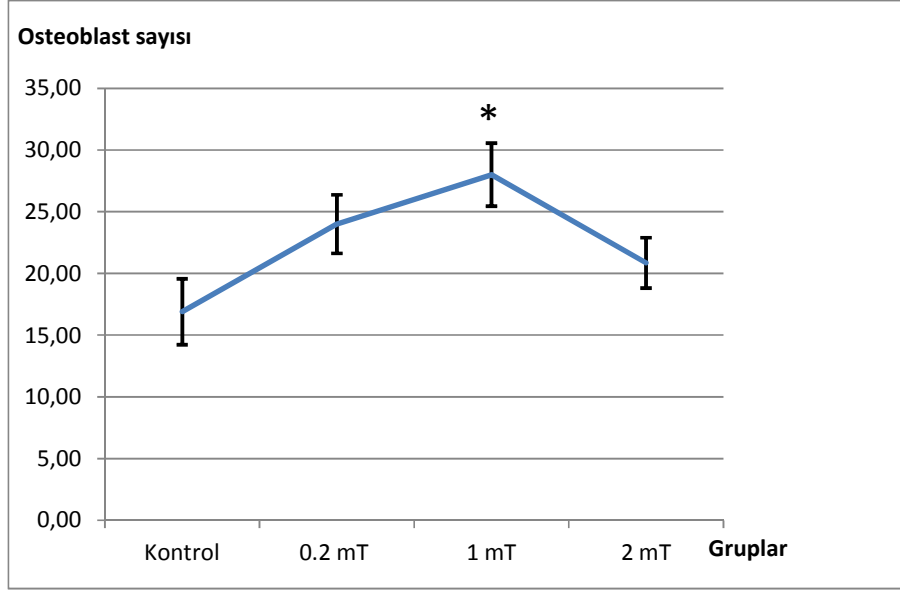
Resim 30: Yeni kemik yapımı gözlenen alanın bilgisayar programındaki görüntüsü

Araştırmada elde edilen histomorfometrik bulgular ve istatistik değerlendirme sonuçlarına göre, osteoblast sayısı parametresi bakımından yapılan analiz sonucunda kontrol grubu ile 1 mT grubu arasında istatistik olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p= 0.018$). Osteoklast sayısı ($p= 0.101$), damar sayısı ($p= 0.101$) ve yeni kemik yüzey alanı ($p= 0.303$) parametreleri için gruplar arasındaki farkların istatistik olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Histomorfometrik bulgulara ait istatistik değerlendirme sonuçları Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 9: Gruplara ait histomorfometrik bulguların istatistik değerlendirmesi

	Gruplar	n	$\bar{x} \pm SS$	Medyan	Rank ortalaması	<i>p</i>
Osteoblast sayısı	Kontrol	10	16.90 \pm 8.44	13.50	-	0.018*
	0.2 mT	14	24.00 \pm 8.88	22.50	-	
	1 mT	12	28.00 \pm 8.84*	30.50	-	
	2 mT	14	20.86 \pm 7.61	20.50	-	
Osteoklast sayısı	Kontrol	10	3.00 \pm 1.70	2.50	30.70	0.101
	0.2 mT	14	1.71 \pm 0.10	2.00	18.14	
	1 mT	12	2.25 \pm 0.87	2.00	25.42	
	2 mT	14	2.57 \pm 1.34	3.00	29.21	
Damar sayısı	Kontrol	10	1.40 \pm 0.10	1.50	16.45	0.101
	0.2 mT	14	2.57 \pm 1.70	2.00	26.29	
	1 mT	12	2.50 \pm 1.57	2.00	25.75	
	2 mT	14	3.00 \pm 1.84	3.00	30.96	
Yeni kemik yüzey alanı (μm^2)	Kontrol	10	54106.40 \pm 22822.64	60743	19.50	0.303
	0.2 mT	14	66160.29 \pm 13196.37	66419	23.86	
	1 mT	12	70646.12 \pm 11340.24	73857	30.92	
	2 mT	14	68295.92 \pm 12565.13	69692	26.79	

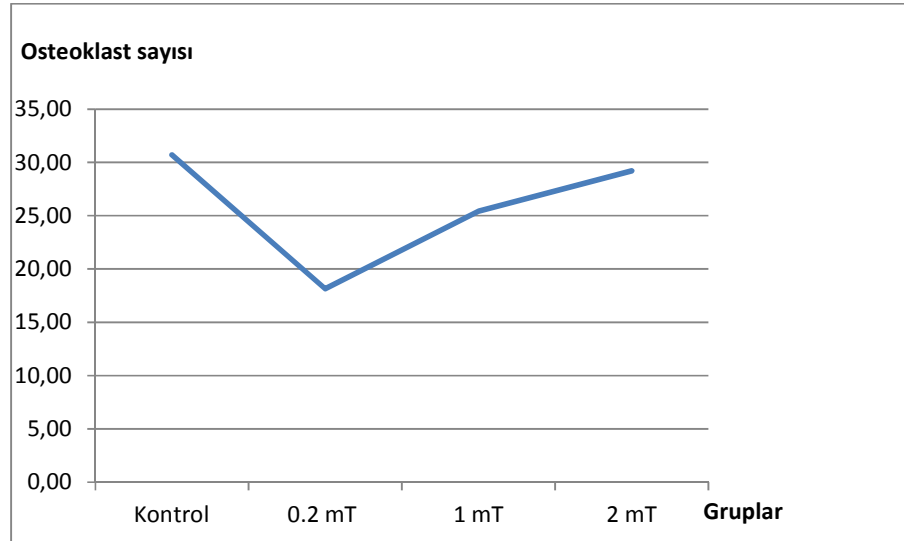
*= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlılık ($p < 0.05$)



*= Kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistik olarak anlamlı ($p= 0.018$)

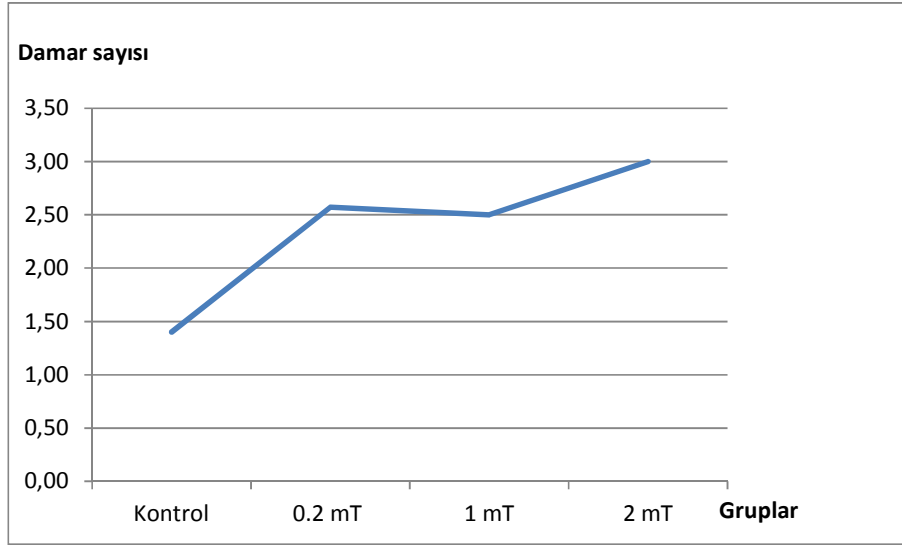
Şekil 8: Gruplara göre osteoblast sayısı ortalamaları

Grafik incelendiğinde en düşük osteoblast sayısı ortalamasının 16.9 ± 8.44 ile kontrol grubunda olduğu görülmektedir. Diğer bütün gruplar da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında osteoblast sayılarında artış görülmekle birlikte sadece 1 mT grubundaki artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.018$).



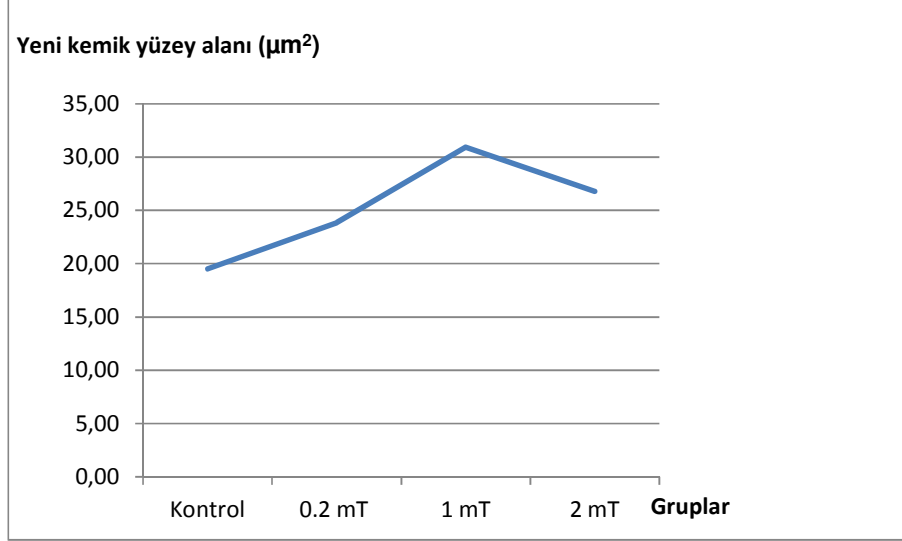
Şekil 9: Gruplara göre osteoklast sayısı rank ortalamaları

Şekil 9 incelendiğinde en yüksek osteoklast sayısı rank ortalamasının kontrol grubunda, en düşük rank ortalamasının ise 0.2 mT grubunda bulunduğu görülmektedir. Ancak gruplar arasında osteoklast sayısı rank ortalamaları bakımından istatistik olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.



Şekil 10: Gruplara göre damar sayısı rank ortalamaları

Grafik incelendiğinde en düşük damar sayısı rank ortalamalarının kontrol grubunda bulunduğu görülmektedir. Diğer gruplarda kontrol grubuna göre damar sayısı rank ortalamalarında artış gözlenmekle birlikte, bu farklar istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 11: Gruplara göre yeni kemik yüzey alanı rank ortalamaları

Grafik incelendiğinde en düşük yeni kemik yüzey alanı rank ortalamalarının kontrol grubunda bulunduğu görülmektedir. Diğer gruplarda kontrol grubuna göre yeni kemik yüzey alanı rank ortalamalarında artış gözlenmekle birlikte, bu farklar istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır.

Her bir grupta histomorfometrik parametrelerin korelasyonu değerlendirildiğinde; kontrol grubunda, 1 mT grubunda ve 2 mT grubunda parametreler arasında istatistik olarak anlamlı derecede korelasyonlar tespit edilmiştir. Kontrol grubunda osteoblast sayısı artarken, osteoklast sayısının da arttığı gözlenmiştir ($p= 0.006$). 0.2 mT grubunda parametreler arasında istatistik olarak anlamlı derecede bir korelasyona rastlanmamıştır. 1 mT grubunda osteoblast sayısı artarken, osteoklast sayısının düştüğü görülmüştür ($p= 0.03$). Aynı zamanda 1 mT grubunda osteoblast sayısı artarken, damar sayısının azaldığı tespit edilmiştir ($p= 0.032$). 2 mT grubunda ise osteoklast sayısı artarken damar sayısının da arttığı görülmüştür ($p= 0.038$). Her bir grupta parametreler arası korelasyon verileri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10: Histomorfometrik parametreler arası korelasyon tablosu

Gruplar	Kontrol			
	ob	ok	d	yk
Kontrol	ob	$r=0.793$ $p=0.006^*$	$r=-0.177$ $p=0.624$	$r=0.393$ $p=0.262$
	ok	$r=0.793$ $p=0.006^*$	$r=0.174$ $p=0.631$	$r=0.402$ $p=0.249$
	d	$r=-0.177$ $p=0.624$	$r=0.174$ $p=0.631$	$r=0.477$ $p=0.164$
	yk	$r=0.393$ $p=0.262$	$r=0.402$ $p=0.249$	$r=0.477$ $p=0.164$
0.2 mT				
	ob	ok	d	yk
0.2 mT	ob	$r=0.407$ $p=0.148$	$r=0.203$ $p=0.486$	$r=-0.192$ $p=0.511$
	ok	$r=0.407$ $p=0.148$	$r=0.320$ $p=0.264$	$r=0.353$ $p=0.215$
	d	$r=0.203$ $p=0.486$	$r=0.320$ $p=0.264$	$r=0.058$ $p=0.845$
	yk	$r=-0.192$ $p=0.511$	$r=0.353$ $p=0.215$	$r=0.058$ $p=0.845$
1 mT				
	ob	ok	d	yk
1 mT	ob	$r=-0.625$ $p=0.030^*$	$r=-0.619$ $p=0.032^*$	$r=0.231$ $p=0.471$
	ok	$r=-0.625$ $p=0.030^*$	$r=-0.398$ $p=0.200$	$r=0.233$ $p=0.466$
	d	$r=-0.619$ $p=0.032^*$	$r=-0.398$ $p=0.200$	$r=-0.195$ $p=0.544$
	yk	$r=0.231$ $p=0.471$	$r=0.233$ $p=0.466$	$r=-0.195$ $p=0.544$
2 mT				
	ob	ok	d	yk
2 mT	ob	$r=0.016$ $p=0.957$	$r=-0.445$ $p=0.111$	$r=0.053$ $p=0.856$
	ok	$r=0.016$ $p=0.957$	$r=0.557$ $p=0.038^*$	$r=-0.232$ $p=0.424$
	d	$r=-0.445$ $p=0.111$	$r=0.557$ $p=0.038^*$	$r=-0.250$ $p=0.389$
	yk	$r=0.053$ $p=0.856$	$r=-0.232$ $p=0.424$	$r=-0.250$ $p=0.389$

* = İstatistik olarak anlamlılık düzeyi($p<0.05$)

5. TARTIŞMA

Farklı dozlardaki darbeli elektromanyetik alan uygulamasının, sıçan femurlarında kırık iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız çalışmada 15 Hz sabit frekansta; 0,2 mT, 1 mT ve 2 mT darbeli elektromanyetik alan şiddetlerinin osteoblastları uyardığı ve istatistik olarak anlamlı olmamakla birlikte yeni kemik oluşumunu artırdığı gözlemlendi. Fakat ICNIRP (Non-iyonize radyasyondan korunma kuruluşu) ve IEEE (Uluslararası elektrik ve elektronik mühendisleri enstitüsü)'nin bilimsel tavsiyeleri üzerine WHO (Dünya Sağlık Örgütü)'nun düşük frekanslı alanların biyolojik değişiklik oluşturma sınırı olarak belirlediği 1 mT dozu aşıldığında olumlu etkilerin azalmaya başladığı görüldü.

5.1. Deney Hayvanları

Darbeli elektromanyetik alan kullanarak yaptığımız deneysel çalışmamızda, deney hayvanı olarak sıçan seçilmiştir. Kemik iyileşmesini elektromanyetik alan kullanarak hızlandırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Bassett et al. 1981, Sharrard 1990, Pienkowski et al. 1994, Darendeliler et al. 1997, Midura et al. 2005, Gupta et al. 2009). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar bulunmakla birlikte (Sharrard 1990, Gupta et al. 2009), özellikle yakın dönemde çoğu çalışmanın deney hayvanları üzerinde yapıldığı anlaşılmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan hayvan modelleri; köpek (Hanaoka 1983), hindi (McLeod et al. 1992), at (Cane et al. 1993), tavşan (Matsunaga et al. 1996, Frederics et al. 2003), domuz (Darendeliler et al. 1997), sıçan (Ottani et al. 1991, Midura et al. 2005, Prucelli et al. 2009, Shen and Zhao 2010) gibi geniş bir yelpazede çeşitlilik göstermektedir. Organizma büyüdükçe deney modelinde de zorlukların artacağı bir gerçektir. Aynı zamanda büyük hayvanların pahalı olması ve bakımının zor olması da genellikle kemik iyileşmesi deney modellerinde dezavantaj oluşturmaktadır. Bu sebeple laboratuvar hayvanı olarak sıçanların veya tavşanların kullanıldığı deneyler ağırlık kazanmaktadır (Ottani et al. 1991, Takano et al. 1992, Matsunaga et al. 1996, Frederics et al. 2003, Midura

et al. 2005, Prucelli et al. 2009, Shen and Zhan 2010). Çalışmamızda sıçan kullanılmasının nedenleri arasında; kolay temin edilebilmeleri, ucuz olmaları, büyük hayvanlara göre daha kolay manipüle edilebilmeleri, daha fazla örnek alabilme imkanı sunmaları, fizyolojileri ve anatomileri hakkında yeterli bilgi ve kaynak bulunması ve enfeksiyona ve diğer dış çevre faktörlerine karşı yüksek bir direnç göstermeleri gibi avantajlar sayılabilir (Egermann et al. 2005).

Kemik iyileşmesi genç bireylerde olduğu gibi immatür hayvanlarda da normale göre daha hızlı olmaktadır. Hayvan deney modelleri üzerine kurulu klinik çalışmalar ve araştırmalar, kırık sonrasındaki iyileşme periyodunun yaş ilerledikçe uzadığını göstermektedir (Meyer et al. 2003, Lu et al. 2005). Katano et al. (2011) yaptıkları çalışmalarında düşük yoğunluklu darbeli ultrason uygulayarak 8 haftalık genç farelerde ve 40 haftalık farelerde kemik iyileşme süreçlerini radyolojik olarak ve histolojik analizlerle kıyaslamışlardır. Araştırmalarında 8 haftalık ve 40 haftalık grupların her ikisinde de femur kırığı oluşturulmasını takiben 7-10 günlük sürede kırık formasyonu meydana geldiğini görmüşlerdir. Fakat 8 haftalık genç farelerde kırık fragmanlar arası sert kallus köprüsü 14. günde gözlenirken 40 haftalık farelerde bu sürenin 28 güne uzadığını rapor etmişlerdir. Bulgulara dayanarak genç farelerde daha hızlı bir kemik iyileşmesi olduğunu net bir şekilde belirtmişlerdir. Bu nedenle DEMA'nın kemik iyileşmesi üzerine hızlandırıcı etkisini de değerlendirmeyi hedeflediğimiz çalışmamızda 12 aylık olgun sıçanlardan faydalanılmıştır.

Literatürde dişi sıçanlar üzerinde elektromanyetik alan uygulanarak osteoporozdaki etkisini inceleyen çalışma bulunmaktadır (Shen and Zhao 2010). Fakat menstrüel siklus ve hormonal değişikliklerin kemik döngüsünü etkilemesi nedeniyle kemik iyileşmesini inceleyen çalışmalarda erkek sıçanların kullanılması daha uygundur (Midura et al. 2005, Prucelli et al. 2009). Bu sebepten dolayı çalışmamızda erkek sıçanların kullanılması tercih edilmiştir.

Yaptığımız çalışma sürecinde preoperatif 1. gün ve postoperatif 4. haftada ölçülen deney hayvanlarının ağırlıkları, tüm gruplarda bir miktar azalma gösterirken, kontrol grubu, 0.2 mT grubu ve 1 mT grubunda postoperatif 4. haftada ölçülen ağırlıklardaki azalma preoperatif 1. günde ölçülene göre istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 6). Darbeli elektromanyetik alan şiddetinin daha yüksek olduğu 2 mT grubunda ise postoperatif 4. haftada yapılan ağırlık ölçümlerinin

preoperatif 1. güne göre olan azalmasının istatistik olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (Tablo 6). Gonzales et al. 1996 yılında yaptıkları çalışmada, elektromanyetik alanların gelişmekte olan sıçanlarda kemik kütlelerine ve büyümesine olan etkilerini incelemişler, 30 gün süreyle 24 saat boyunca 100 Hz, 3 mT elektromanyetik alan uygulamasına maruz bıraktıkları sıçanların vücut ağırlıklarını da gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak istatistik olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Yine genç fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, günde 10 saat 50 mT elektromanyetik alana tabi tutulan farelerin ağırlıkları her gün düzenli olarak ölçülmüş ve elektromanyetik alanın ağırlığa olan etkisinde istatistik olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Abbasi et al. 2007). Çalışmamızda DEMA uygulamasının yanı sıra postoperatif olarak sıçanların ağırlıklarına etki etmesi beklenen invaziv cerrahi bir işlem uygulanmıştır. Şimşek (2011), alendronat ve K1 vitamininin sıçan femurlarında kırık kemik iyileşmesi üzerine etkisini incelediği çalışmasında, femur osteotomi yöntemiyle oluşturulan ve mini plak-vida yöntemiyle fikse edilen kırık modeli uygulanan sıçanların ağırlıklarında, cerrahi sonrası 2. haftada preoperatif 1. güne göre istatistik olarak anlamlı bir azalma tespit etmiş ve tüm gruplarda görülen bu azalmayı yapılan cerrahi işlemin invaziv oluşu nedeniyle sıçanların genel vücut direncinin zayıflamasına bağlı ağırlık kaybı olarak yorumlamıştır. Sıçan tibiasına Kirschner teli uygulamasını takiben cerrahi sonrası ilk haftada tüm sıçanların ağırlıklarında azalma (Lucke et al. 2005) ve bilateral tibial osteotomi sonrası tüm gruplarda deney hayvanı ağırlıklarında azalma (Struermer et al. 2010) gözlenen çalışmalarda da, araştırmacılar deney hayvanı ağırlıklarındaki azalmanın cerrahi girişim ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanında Şimşek (2011) çalışmasında, postoperatif 9. haftada da deney hayvanlarının ağırlıklarını ölçmüş, osteomyelit ve abse formasyonu sıklığı gözlenen iki grupta ağırlıklarda preoperatif duruma göre azalma gözlerken diğer iki grupta deney hayvanlarının ağırlıklarının tekrar operasyon öncesi değerlere ulaşabildiğini saptamıştır. Ağırlıklarda azalma gösteren gruplardaki durum enfeksiyonun yan etkisine bağlanmıştır. Çalışmamızda deney hayvanı ağırlıkları preoperatif 1. gün ve postoperatif 4. haftada ölçülmüştür. Kontrol grubunda, 0.2 mT ve 1 mT grubunda 4. haftada ölçülen ağırlık değerlerinin preoperatif duruma göre istatistik olarak anlamlılık göstermemesi, invaziv işlemi takiben düşük doz DEMA uygulamasının deney hayvanlarının 4 hafta sonra

preoperatif ağırlık değerlerini geri kazanmasında herhangi olumsuz bir etkide bulunmadığını göstermektedir. Ancak, DEMA uygulama şiddetinin arttığı ve kemik iyileşmesinde olumlu etkilerin azalmaya başladığının gözlemlendiği 2 mT grubunda, deney hayvanlarının ağırlıklarının preoperatif ağırlıklarına göre 4. haftada istatistik olarak anlamlı derecede azalma gösterdiği anlaşılmıştır.

Cerrahi işlem uygulanmadan elektromanyetik alan uygulandığında gelişmekte olan ratlarda vücut ağırlığındaki farkın anlamlı olmadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Gonzales et al. 1996, Abbasi et al. 2007). Bu çalışmalarda uygulanan elektromanyetik alan şiddetleri de çalışmamızdaki değerlerden yüksektir. Fakat osteotomi uygulanan sıçanların femurlarındaki iyileşmenin olumlu etkilerinin azalmaya başladığı ve Dünya Sağlık Örgütü' nün düşük frekanslı alanların biyolojik değişiklik oluşturma sınırı olarak belirlediği 1 mT dozunun aşıldığı 2 mT grubunda deney hayvanı ağırlıklarının da istatistik olarak anlamlı derecede düşük olması, cerrahi işlemi takiben uygulanan DEMA dozunun artmasının postoperatif dönemde kaybedilen ağırlığın tekrar cerrahi öncesi değerlere ulaşabilmesinde olumsuz etkisi olduğunu gösterebilir. Yani kısaca, çalışmamızda tek başına uygulandığında vücut ağırlığına etkisinin olmadığı bildirilen (Gonzales et al. 1996, Abbasi et al. 2007) elektromanyetik alanların, cerrahi sonrası uygulandığında şiddet arttıkça, kaybedilen ağırlığın geri kazanılmasında olumsuz etki meydana getirdiği görülmüştür.

5.2. Deney Modeli

Kemik iyileşmesini incelemek amacıyla şimdiye kadar çeşitli kırık modelleri kullanılmıştır (Fredericks et al. 2000, Leisner et al. 2002, Midura et al. 2005, Selvi 2008). Deney hayvanlarının kullanıldığı çalışmalarda uygulama zorluğu nedeniyle kırık modeli olarak nadiren intramembranöz kemikleşme gösteren mandibula veya diğer kraniyofasiyal kemikler kullanılmıştır (Schmitz and Hollinger 1986, Özçelik et al. 2004, Selvi 2008). Bunun yanında cerrahi olarak rahat ulaşılabilirlikleri ve diyafizyel osteotomi tekniğinin daha kolay olması nedeniyle endokondral kemikleşme gösteren uzun kemiklerin kullanıldığı araştırmalar çoğunluktadır. Literatürde elektromanyetik alan kullanılarak kırık iyileşmesinin incelendiği

çalışmalarda radial (Chiristel et al. 1982), tibial (Sarker et al. 1993, Fredericks et al. 2000), ulnar (Leisner et al. 2002) ve femural (Grace et al. 1998, Midura et al. 2005) kırık modellerinin kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda uzun kemiklerin tercih edilmesindeki etkenlerden bir diğeri olan manipülasyon kolaylığı sayesinde kırık fiksasyonları kraniyofasiyal kemiklere göre daha rahat yapılabilenkte, histopatolojik örnekler daha kolay hazırlanabilmektedir. Mandibula kırık modelinin kullanıldığı bir çalışmada (Selvi 2008), postoperatif dönemde kırık bölgesinin periodontal nedenlerle ağız ortamı ile ilişkili hale geçmesi durumunda bölgede enfeksiyon gelişme riskinin ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bunun yanısıra mandibulaya uygulanacak cerrahi işlem, ciddi bir beslenme zorluğuna yol açarak hayvanlarda genel güçsüzlüğe neden olabilmektedir (Erdoğan 2007). Bahsedilen avantajları nedeniyle femural kırık modelini kullandığımız çalışmamızda sıçanlara bilateral standart osteotomi sonrası 4 delikli mini plak ve 7 mm uzunluğunda titanyum mini vidalar uygulanmıştır.

Literatürde deney hayvanlarında kontrollü olarak meydana getirilen osteotomi veya defekt sonrasında kemik iyileşmesini sağlamak amacıyla kullanılan plak osteosentezi dışında eksternal fiksasyonun uygulandığı ve kemik iliği içinden geçen Kirschner telleri ile fiksasyonun sağlandığı çalışmalar da sıklıkla karşımıza çıkmaktadır (Johnson et al. 1996, Tuominen et al. 2001, Jager et al. 2005, Chu et al. 2006, Wingerter et al. 2007). Minimal osteotomilerin kullanıldığı veya bir drill yardımıyla femur üzerinde defekt oluşturularak kemik iyileşmesinin incelendiği araştırmalarda genellikle sıçanlarda gözlenmek istenen ajanların etkisini bile gizleyebilen hızlı bir iyileşme kendiliğinden olmaktadır. Femurda transvers veya oblik kesi yapılan ya da kemik segmentinin uzaklaştırıldığı çalışmalarda ise düzgün bir kemik iyileşmesi görülebilmesi için stabilizasyon büyük önem taşımaktadır (Russell et al. 2007). Bu sebeple femurda tam osteotomi uygulanan sıçanlarda intramedüller Kirschner telleri veya eksternal fiksasyonun kullanılması stabilizasyon açısından güçlükler ortaya çıkaracağından çalışmamız için mini plak ve vida fiksasyonu tercih edilmiştir.

Conflitti et al. (2007) araştırmasında, Kirshner tellerinin kemik iyileşmesi için yeterli stabilizasyonu sağladığını; fakat kırık fragmanlar arasında aşırı kallus oluşumuyla sonuçlanabileceğini belirtmişlerdir. Wingerter et al. 2007 yılında

segmental defekt oluşturdıkları sıçan femurlarında Kirschner telleri ve plak osteosentezi modelini kullanarak 2 farklı fiksasyon tekniğini karşılaştırmışlardır. Kirschner teli kullandıkları grupta kırık fragmanlar arasında stabilizasyon sağlandığı; ancak oluşan mikro hareketliliğin kırık fragmanları arasında kallus formasyonu ile birlikte fibröz doku oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Plak uygulanan grupta ise kallus görülmeden direkt kortikal iyileşme ve kemik rejenerasyonu olduğunu ve minimal düzeyde fibrotik doku meydana geldiğini gözlemişlerdir. Bu durumu plak ve vidaların defekt alanında sağladığı rijit fiksasyona bağlamışlardır. Bazı araştırmacılar da kırık yüzeyine plak uygulaması sırasında periostun zarar görmesinin kırık iyileşmesini olumsuz etkileyeceği yönünde görüş bildirmektedirler (Rodriguez-Merchan and Gomez-Castresana 2004, Stiffler 2004, Ozkaya et al. 2009). Yapılan bir diğer çalışmada araştırmacılar intrameduller Kirschner teli uygulayarak tedavi ettikleri önkol kırığı olan hastalarındaki iyileşme süresinin plak uygulanan gruptaki hastalara göre kısa olduğunu ortaya koymuşlardır (Ozkaya et al. 2009). Aynı zamanda uygulama zorluğu da bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmasına rağmen genel olarak bakıldığında plak osteosentezi yönteminin avantajları daha ağır basmaktadır.

Eksternal fiksator kullanarak sıçanlarda kemik iyileşmesinin gözlemlendiği başka bir çalışmada, femurlara eksternal fiksator uygulayarak kırık fragmanları anatomik olarak konumlandırılmış ve sıçanlar operasyon sonrası 14. gün ve 56. günlerde sakrifiye edilerek sonuçlar biyomekanik, histolojik ve radyografik olarak değerlendirilmiştir (Kaspar et al. 2007). Kırık fragmanlar arasında 14. günde histolojik ve radyografik olarak tipik periosteal kallus oluşumu meydana geldiğini, 56. günde ise tamamen kemik köprüsünün oluştuğunu gözlemişlerdir. Aynı zamanda 56. günde yapılan biyomekanik testlerde burkulma kuvvetlerine hemen hemen karşıt femurla aynı düzeyde cevap verdiğini belirtmişlerdir. Ancak sıçanların operasyon sonrası sakrifiye edilene kadar olan dönemdeki hareketliliği göz önünde bulundurularak eksternal fiksator uygulamasının zorluğu tarafımızca değerlendirilmiş ve tercih edilmemiştir. Aynı zamanda pahalı olması da bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

Plak ve vida kullanılarak yapılan osteosentezin mikro hareketliliği elimine etmesi ve sağladığı bütünlük ve stabiliteyle defekt alanında normal bir kemik

iyileşmesi meydana gelmesine olanak sağlaması (Wingerter et al. 2007) nedeniyle ilk tercih olarak düşünülmelidir.

Bu araştırmalar ışığında, sıçan femurlarındaki kırık fragmanların mini plak ve vida ile fiksasyonuna karar verilen çalışmamızda, titanyum vidaların uzunluğu 7 mm olarak belirlenmiştir. Uzunluklarının Wistar türü sıçanların femur çaplarından daha fazla olması nedeniyle 7 mm çapındaki vidalar kullanılmıştır. Bu uzunlukta vidalar kullanıldığında kırık fragmanların fiksasyonunda başarılı sonuçlar elde edildiğini ve düşük komplikasyon oranı görüldüğünü rapor eden Şimşek (2011), aynı osteotomi modelini uyguladığı çalışmada sıçan femurlarına uyguladığı vidaların bir kısmını 7 mm bir kısmını ise 5 mm uzunluğunda kullanmıştır. Sunulan çalışmada kemik örneklerini toplama aşamasında bazı femurlarda kaynamama, osteomyelit ve abse formasyonu geliştiği gözlemlenmiştir. Bu patolojik bulguların ortaya çıkış nedenleri araştırıldığında kaynamama, osteomyelit, abse gibi komplikasyonların görüldüğü femurların tamamının fiksasyonunda 5 mm uzunluğundaki vidaların kullanılmış olduğu görülmüştür. Wistar türü sıçanların femur çaplarından daha fazla bir uzunluk olan 7 mm boyundaki vidaların kullanıldığı femurlarda ise herhangi bir patoloji oluşmaksızın iyileşme meydana geldiğini rapor etmiştir. Bu sebeple, yapılan çalışmada sıçanların alt ekstremitelerine binen kuvvet karşısında 5 mm uzunluğundaki vidaların kırık fragmanların hareketsizliğini sağlamada yetersiz olduğu, 7 mm uzunluğundaki vidaların ise sağlıklı bir kemik iyileşmesi ortamının sağlanması için gereken kırık fragmanların hareketsizliğini sağlamada daha başarılı olduğuna kanaat getirilmiştir.

İlgili tecrübeler doğrultusunda (Şimşek 2011), çalışmamızda da başarılı bir fiksasyonun yapılması ve bunun sonucunda kırık fragmanların hareketsizliğinin sağlanarak düzgün bir kemik iyileşmesi ortamının yaratılması amacıyla 7 mm uzunluğundaki titanyum vidalardan faydalanılmıştır.

Mini vida ve plak ile yapılan kırık fiksasyonlarında kullanılan plağın özellikleri de büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda faydalanılan 4 delikli mini plakların bir kısmının elimizde mevcut olması nedeniyle sadece eksik olan 20 adet titanyum mini plak aynı firmaya, aynı ebatlarda sipariş edilmiştir. Her grupta 20 adet titanyum mini plak kullanılmış ve bazı femurlarda kullanılan plakların kırılması veya bükülmesi nedeniyle kaynamama meydana geldiği (Kontrol grubu= 10, 0.2 mT grubu= 5 (beş),

1 mT grubu= 4 (dört) ve 2 mT grubu= 23) (Tablo 5) görülmüştür. Miloro et al. (2004) fonksiyondaki plaklarda; fiksasyonda yetersizlik, enfeksiyon ve/veya kaynamamayla sonuçlanabilen kırıklar meydana gelebileceğini belirtmişlerdir. Titanyum plaklarda görülen kırıkların en önemli sebebinin ise metal yorgunluğuna bağlı kırıklar olduğu dile getirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız plakların büyük bir kısmının daha önceki bir çalışmada kullanılmış olması bu plakların zaten metal yorgunluğuna sahip olduğunu düşündürmüştü ve tekrar fonksiyon görmeleriyle de var olan metal yorgunluğu bir miktar daha artmıştır.

Günümüzde oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan plakların büyük bir kısmı titanyumdan yapılmaktadır. Titanyum biyouyumlu bir materyaldir ve uygun plaklar seçildiğinde internal fiksasyonda tatmin edici özelliklere sahiptir. Fakat kemikle kıyaslandığında kırılma olması veya esnekliğinin yetersiz olması istenmeyen bir özelliğidir (Miloro et al. 2004).

Araştırmamızda sıçanların femurlarında kullandığımız titanyum mini plakların kırılma sayıları gözden geçirildiğinde (Tablo 5) ilk üç grupta (Kontrol grubu= 3 (üç), 0.2 mT grubu= 3 (üç), 1 mT grubu= 3 (üç)) öngörülebilir ve tolere edilebilir az sayıda metal yorgunluğuna bağlı plak kırıkları olduğu gözlenmiştir. Fakat 2 mT grubundaki kırılan plak sayısı (n=19) değerlendirilmiş ve dikkat çekici bir sonuç ortaya çıkmıştır. Sebebinin araştırılması amacıyla bu grupta kullanılan plakların kayıtlarına bakıldığında, tamamının firmaya yeni sipariş verilen diğerleriyle aynı ebatlarda titanyum mini plaklardan meydana geldiği anlaşılmıştır. Konuyla ilgili firmayla görüşülmüş ve bu durumun üretim sürecindeki bir hataya bağlı olduğu öğrenilmiştir. Aynı firmadan aynı ebatlarda tekrar tedarik edilen plaklarla 2 mT grubu için deney tekrarlanmış ve kullanılan yirmi plaktan sadece iki tanesinde kırık görülmüştür. Kırılan plak sayısındaki önemli derecede azalma önce sipariş verilen partideki kalite problemini doğrulamaktadır. Yenilenen gruptaki sıçanların femurlarında kullanılan plakların ikisinde kırık görülmesi, bir önceki gruptaki kırık plak sayısı ile da kıyaslandığında kabul edilebilir bir durum olarak değerlendirilmiştir. Bu durum sıçanların femurlarına binen deforme edici kuvvetlerin plak kırılmalarına neden olmasına bağlanmıştır.

Çalışmamızda sıçan femurlarında osteotomi sonrası kemik iyileşmesini gözlemlemek amacıyla darbeli elektromanyetik alan uygulamasını kullandık.

Günümüze kadar kemik iyileşmesini hızlandırmak amacıyla deney hayvanları üzerinde ilaç uygulamaları (Delgado-Martinez et al. 1998), dışarıdan çeşitli ajanların verilmesi (Lind et al. 1993) ve fiziksel tedaviler (Heybeli et al. 2002) gibi değişik uygulamalar yapılmıştır. Örneğin deney hayvanlarına hiperbarik oksijen uygulaması (Yablon and Cruess 1968), mekanik stimülasyon uygulamaları (Usui et al 1989), dışarıdan büyüme faktörleri verilmesi (Lind et al. 1993), şok dalga uygulamaları (Delius et al 1995), düşük enerjili lazer uygulamaları (David et al 1996), D vitamini verilmesi (Delgado-Martinez et al. 1998), düşük yoğunlukta ultrason uygulamaları (Heybeli et al. 2002), alendronat ve K1 vitamini verilmesi (Şimşek 2011) kemik iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalardan bazılarıdır.

Darbeli elektromanyetik alan uygulamaları kırık iyileşmesini hızlandırmak amacıyla günümüzde yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Popülerite kazanmasındaki etkenlerden bazıları non-invaziv bir işlem olması ve kolayca uygulanabilmesidir. Aynı zamanda elektromanyetik alan uygulamalarının kontraendikasyon ve komplikasyonlarının az olması ve terapistin zamanını almaması gibi avantajları bulunmaktadır (Külcü 2009). Literatürde bu konu üzerine çok sayıda çalışma olmasına rağmen (Matsunaga et al. 1996, Midura et al. 2005, Gupta et al. 2009) optimum frekans, şiddet ve süre üzerine yeteri kadar araştırma yapılmamıştır. Bu sebeplerden dolayı DEMA uygulamalarında farklı şiddetlerin sıçan femurlarındaki kırık iyileşmelerine olan etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda uyguladığımız DEMA yoğunluğu 0.2 mT (2 Gauss) (Bassett et al. 1982, Matsunaga et al. 1996), 1 mT (10 Gauss) (ICNIRP, 1998) ve 2 mT (20 Gauss) (Midura et al. 2005) olmak üzere 3 farklı şiddette tasarlanmıştır. Şimdiye kadar DEMA kullanılarak yapılan çalışmalarda uygulanacak manyetik alan şiddeti çok farklı şekillerde karşımıza çıkmaktadır (Bassett 1984, Darendeliler et al. 1997, Satter et al. 1999, Atay ve ark. 2003, Midura et al. 2005, Gupta et al. 2009). Ancak DEMA uygulamalarıyla kemik iyileşmesi çalışmalarının öncülerinden olan Bassett et al. (1982) 0,2 mT şiddetinde manyetik alan uyguladığı çalışmasında kemik formasyonundaki artışı anlamlı bulmuştur. Atay ve ark.'da 2005 yılında yaptıkları çalışmada 0,2 – 0,3 mT'lık düşük manyetik alan şiddetinin kemik formasyonu için yeterli olduğunu bildirmiştir. Ayrıca literatürde manyetik alanın kısa süre de olsa yoğun uygulanmasının tedavi üzerinde negatif etkisi bildirilmiştir (Ulukut ve ark.

2005). Non-iyonize Radyasyondan Korunma Kuruluşu ve Uluslararası Elektrik ve Elektronik Mühendisleri Enstitüsü'nün bilimsel tavsiyeleri üzerine WHO, düşük frekanslı alanların biyolojik değişiklik oluşturma sınırı olarak 1 mT dozunu belirlemiştir (ICNIRP, 1998).

Araştırmamızda hedeflediğimiz gözlemlerden bir tanesi şiddetin artmasıyla kemik iyileşmesinde olumlu veya olumsuz etkilerin olup olmayacağıdır. Bu sebeple kullanacağımız şiddet parametrelerini seçerken bazı çalışmacıların tavsiye ettiği (Bassett et al. 1982, Atay ve ark. 2005, Ulukut ve ark. 2005) düşük dozda 0,2 mT şiddeti ve WHO'nun düşük frekanslı alanların biyolojik değişiklik oluşturma sınırı olarak belirlediği 1 mT dozunun (ICNIRP, 1998) yanında Midura et al. (2005)' in çalışmasında olumlu sonuçlar elde ettiği 2 mT şiddeti sıçan femurlarına osteotomi sonrası uyguladığımız darbeli manyetik alan şiddet parametreleri olarak belirlenmiştir.

Kemik iyileşmesi üzerine etkili olduğu bilinen diğer bir faktör ise uygulanacak elektromanyetik alanın frekansıdır. Otter (1998)'e göre kemik üzerine olumlu etki sağlayan frekans aralığı, kemikte normal fonksiyonel aktivite sırasında oluşan frekans seviyesine en yakın olandır. Kemikte endojen üretilen frekanslar 1 – 100 Hz arasında değişim gösterebilmektedir. Diğer bir çalışmacıya göre ise (Brighton 1981) hücre membranlarındaki proteinleri etkileyen elektromanyetik alan uygulamasının yapısal değişikliklere neden olmasıyla metabolik etkiler ortaya çıkmaktadır ve bu değişikliklere neden olabilecek frekans aralıkları iskelet sisteminde normal fonksiyonel aktiviteler sonucu oluşan frekans aralıklarının dışında kalan frekanslardır. (Brighton 1981, Otter et al. 1998, Erdem 2006).

Elektromanyetik alanların kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin halen tam olarak aydınlatılmamış olması kemik iyileşmesinde etkili optimum elektromanyetik dalga şekli ve frekansının tespit edilmesinde zorlukları da beraberinde getirmektedir.

McLeod et al. (1992)' nin, hindilerin ulna kemiklerinde yaptıkları osteotomi sonrası elektromanyetik alan uygulamasının osteogenezis üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında üç farklı frekans kullanmışlar ve bunları karşılaştırmışlardır. Sekiz hafta boyunca günde 1 saat olarak uygulanan 15 Hz, 75 Hz ve 150 Hz frekanslarında en etkili sonucu 15 Hz frekansta elde etmişler ve 150 Hz frekansının osteogenezis üzerine etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Matsunaga et al.

(1996), tavşanlarda darbeli elektromanyetik alan uygulamalarının osteogenezis üzerine etkili optimum ayarlarını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmalarında deney hayvanlarına farklı şiddetlerde ve frekanslarda elektromanyetik alanları uygulamışlardır. Düşük şiddetlerde kemik iyileşmesinde olumlu sonuçlar elde etmişler ancak frekans farklılıklarının osteogenezis üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Temel ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada tedavi edici özelliğe sahip manyetik alanın düşük frekanslı ve atım özellikli yani darbeli olması gerektiği belirtilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar doğrultusunda, farklı şiddetlerdeki darbeli elektromanyetik alanların sıçan femurlarında kontrollü olarak oluşturulan osteotomi sonrası kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelediğimiz çalışmamızda frekans olarak sabit 15 Hz frekansının kullanılması tercih edilmiştir. Şimdiye kadar elektromanyetik alan uygulamaları ile kemik iyileşmesinin incelendiği birçok çalışmada frekans parametresi olarak 15 Hz frekansı kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Colson et al. 1988, McLeod et al. 1992, Darendeliler et al. 1997, Midura et al. 2005, Shen et al. 2010).

5.3. Histopatoloji

Araştırmamızda hazırlanan kesitlerin histopatolojik olarak incelenmesi sırasında kullanılan parametreler; yeni kemik yapım alanı, iltihap, nekrozis ve fibrozis olarak belirlenmiştir. Bu parametreler örneklerin mikroskopik görüntülerinde yüzde olarak görülme oranlarına göre (%0-5, %5-30, %30-60, %60-90) 0-3 arasında skorlanmıştır (Tablo 7). Erdem (2006), kemik defektlerinde elektromanyetik alanın iyileşme üzerine biyokimyasal ve histopatolojik etkilerini araştırdığı çalışmasında histopatolojik parametreler olarak yeni kemik yapımı, iltihap, nekrozis ve fibrozis parametrelerini kullanmış ve mikroskop altında incelenen örneklerin görüntülerini yüzde olarak hesapladıktan sonra bu yüzdelere göre 0-3 arasında yapılan skora yöntemiyle deneysel bir çalışma yapmıştır. Bu sebeple araştırmamızın histopatoloji kısmında kullanılan parametreler ve uygulanan skora yöntemi Erdem (2006)'nın çalışmasıyla benzerdir. Yine kemik iyileşmesiyle ilgili başka bir çalışmada Selvi,

2008 yılında deneysel olarak oluşturulan kırıklara bifosfonat ilaç kullanımının etkilerini histopatolojik olarak incelediği araştırmasında; kemikleşme miktarı, bağ dokusu reaksiyonu ve şiddeti, iltihap ve yoğunluğu, kemikleşme tipi olarak 4 parametre kullanmıştır. Bunlardan kemikleşme miktarını mikroskopik görüntülere göre hem yüzde olarak hesaplamış, hem de 0-4 arasında skorlamıştır. Diğer iki parametre olan bağ dokusu reaksiyonu ve şiddeti, iltihap ve yoğunluğu parametrelerini yine hem yüzde olarak hesaplamış, hem de hesaplanan yüzdelere göre 0-3 arasında skorlama yapmıştır. Son parametresi olan kemikleşme tipinde ise intramembranöz ve/veya endokondral kemikleşme varlığı ya da yokluğu değerlendirilmiştir. Selvi (2008)' nin çalışmasında 3 parametresinde histopatolojik değerlendirme amacıyla kullandığı skorlama yöntemi de bizim çalışmamızda kullandığımız yöntemle benzerlikler göstermektedir. Aslan (2008) ise yaptığı deneysel çalışmada elektromanyetik alanların sıçanlarda kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelemiş, değerlendirme sırasında da radyografik olarak 0 – 3 arasında bir skorlama, klinik düzeyde oluşan kallusun elle mekanik olarak değerlendirilmesinde 0 - 2 arasında bir skorlama ve histolojik olarak kemikleşme derecesini incelemek için 1 ile 10 arasında bir skorlama yöntemi kullanmıştır. Histolojik değerlendirmede 1 skoru fibröz dokuyu, 10 skoru ise tamamen matür kemik oluşumunu ifade etmektedir.

Histopatolojik analiz amacıyla kullandığımız parametreler kemikleşme derecesini değerlendirebilmek ve beklenen kemikleşme meydana gelmediğinde sebebinin araştırılabilmesi amacıyla kullanabileceğimiz şekilde seçilmiştir. Kemik ve fibröz doku tiplerinin her ikisi de bağ dokusuna aittir. Fiziksel veya kimyasal etkiler ortaya çıktığında yeni oluşan kemik iyileşme dokusunun bir kısmı fibröz doku ile iyileşecektir. Eğer yeterli revaskülarizasyon olmazsa kemik dokuda nekroz meydana gelir ve iyileşme görülmez (Nanci 2008). Nekrozda plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasar görmesi nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu enflamasyon uyarılır (Taşpınar 2008). Bunun yanında çalışmamızda olduğu gibi osteotomi yapılan ve mini plaklar ve vidalar ile fiksasyon yapılabilmesi için vida yuvaları açılırken drill kullanılması sebebiyle kemikte bir miktar ısının ortaya çıktığı durumlarda nekroz görülmesi de kaçınılmazdır. Bir diğer parametre olan iltihap parametresi de yine farklı etkenlere bağlı olarak dokuların

verdiği reaksiyondur. Çalışmamızda cerrahi travmaya bağlı olarak veya postoperatif dönemde cerrahi sahada oluşan olumsuz etkenler nedeniyle gözlenebileceği düşünülerek parametreler arasına dahil edilmiş ve skorlaması yapılmıştır.

Araştırmamızda hiç darbeli elektromanyetik alan uygulamasına tabi tutulmayan kontrol grubunda %80 oranında örnekte düşük derecede (skor 1) iltihap gözlenmiştir (Tablo 8). Diğer üç grupta da değişen oranlarda (0.2 mT grubu - %71.4, 1mT grubu- %58.3, 2 mT grubu %100) düşük dereceli iltihap görülmesi uygulanan cerrahi işlemin invaziv oluşu ve iyileşme döneminde elektromanyetik alan düzeneğine her gün kafeslerinden alınıp tekrar yerleştirildikleri ve yer değişikliği nedeniyle strese girdikleri düşünüldüğünde kabul edilebilir görünmektedir. Fakat 2 mT grubundan bir sıçanın femurunda abse formasyonu ortaya çıkması nedeniyle kemik iyileşmesi mümkün olamamış bu sebeple de histopatolojik ve histomorfometrik incelemeye dahil edilememiştir. Abse oluşumunda etkilenen sıçanın postoperatif dönemde ciltteki suturları kemirerek koparması ve cerrahi sahanın dış etkenlere açık hale gelmesinin etkili olduğunu düşünmekteyiz. İltihap diğer adıyla enflamasyon hem dokuda reaksiyon uyaran zararlı etkeni hem de hasarlı dokuyu yok etmek veya sınırlandırmak amacıyla dokuların yaralanma veya yıkımına karşı gelişen lokalize savunma cevabı olarak tanımlanmıştır (Polat 2008). Dikkat çekici ve diğer gruplardan farklı olarak ortaya çıkan bir durum, 0.2 mT grubundaki örneklerde histopatolojik incelemede %21.4' lik bir oranda 0 skorunda yani hiç iltihap gözlenmemesidir. Bu durum, darbeli elektromanyetik alanlarla kemik iyileşmesi üzerinde yapılan çalışmaların öncülerinden olan Bassett et al. (1982) 'ın kemik iyileşmesinde olumlu sonuç bildirdiği 0.2 mT şiddetinin, iyileşme sürecinde enflamasyonu da azalttığı şeklinde bir görüş ortaya çıkarabilir. İstatistik analizde yapılan bağımsızlık testine göre çalışmamızda da iltihap parametresi için oranlar DEMA uygulama şiddetlerinden bağımsız değildir ($p= 0.025$).

Literatürde manyetik terapilerin vazodilatasyona neden olması, ödemi azaltması, doku tamirini hızlandırması gibi olumlu etkilerinin yanında enflamasyonu azaltıcı etkisi de araştırmacıların üzerinde görüş bildirdikleri bir konudur (Bassett 1989, Bassett 1993). Enflamasyon sürecinde değişikliklere neden oldukları belirtilmekte, ağrılı yaralanma ve enflamasyon durumlarında ilgili bölge üzerine uygulanmaları tavsiye edilmektedir (Fernandez et al. 2007).

Zorzi et al. (2007), yaptıkları araştırmalarında artroskopik cerrahi sonrası eklemde oluşan enflamasyonu ve ağrıyı azaltıcı etkisini değerlendirebilmek amacıyla DEMA kullanmışlardır. Rastgele gruplara ayırdıkları hastalardan bir gruba 0.05 mT diğerine de 1.5 mT şiddetinde DEMA uygulamışlar, aynı zamanda hastalar arasında non-steroidal antienflamatuar (NSAİİ) ilaç kullanımını da kaydetmişlerdir. İşlem sonrası 45. ve 90. günde değerlendirilen hastalarda artroskopi sonrası uzun dönem etkilerin de değerlendirilmesi amacıyla 3. yılda tekrar görüşme yapılmıştır. Sonuç olarak DEMA uygulanan hastalarda kontrol grubuna göre NSAİİ kullanımında azalma ve cerrahi sonrası iyileşmede uzun dönemde daha olumlu sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir. DEMA tedavilerinin uygulanmasıyla eklem kırıkdağını proenflamatuar sitokinlerin katabolik etkilerinden korumak veya enflamatuar hücre ortaya çıkmasını engellemek veya sınırlandırmak mümkün olabilir (Fini et al. 2005).

Manyetik alanların potansiyel terapötik etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada Vianale et al. (2008) düşük frekanslı elektromanyetik alan kullanarak keratinosit proliferasyonunu ve RANTES (regulated and normal T cell expressed and secreted) proteini, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein), MIP -1 α (macrophage inflammatory protein) ve IL-8 (interleukin) gibi kemokinlerin üretimini incelemişlerdir. İnsan keratinosit hücre kültürüne 1 mT, 50 Hz frekansta EMA uygulamışlar ve farklı zamanlarda hücre büyümesini ve yaşamlarını değerlendirmişlerdir. Kontrol hücreleriyle kıyaslandığında 48 saat sonra hücre büyümesinde önemli derecede artış gözlenmiş, 72 saat sonra da yine kontrol hücreleriyle kıyaslandığında RANTES, MCP - 1, MIP - 1 α ve IL - 8 salınımlarında önemli derecede azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar düşük frekanslı EMA' ların kemokin üretimini ve hücre büyümesini düzenleyerek enflamatuar süreci baskıladığını göstermektedir. Böylece cilt yaralanmalarının tedavilerinde de düşük frekanslı EMA uygulamalarının alternatif bir tedavi yaklaşımı olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda bütün gruplarda, örnekler mikroskopla incelendiğinde özellikle vidaların geçtiği bölgelerde yer yer nekrotik dokuların bulunduğu gözlenmiştir (Resim 22). Deney hayvanlarının femurlarında osteotomi sırasında ve plak uygulayabilmek amacıyla vida deliklerinin hazırlanması sırasında her ne kadar serum irrigasyonu ile soğutma sağlanmaya çalışılsa da kemikte bir miktar ısının

ortaya çıkması kaçınılmazdır. Kemik defektlerinde elektromanyetik alanın kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Erdem 2006), femur üzerinde defekt oluşturulmuş ve 15. ve 45. günlerde sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen örnekler histopatolojik olarak incelenmiştir. Kontrol ve çalışma gruplarında hepsinde düşük derecede nekroz varlığı saptanmıştır. Bütün gruplarda kemik iyileşmesinin 15. gününde, 45. günlere oranla nekroz oranının fazla görülmesi nedeniyle bu durum operasyonda yapılan osteotomi sırasında tur motoru kullanımının soğutma yapılsa bile kemikte ısı yükselmesiyle nekroza neden olacağını düşündürmüştür.

Araştırmamızda gruplar arasındaki nekroz oranları incelendiğinde, hiç elektromanyetik alan uygulanmayan kontrol grubundaki örneklerde %90 oranında skor 1 (%5-30) düşük dereceli nekroz gözlenmiştir (Tablo 8). Sadece elektromanyetik alan uygulanmayan kontrol grubunda böyle yüksek bir oranın çıkması ilk planda akla DEMA uygulanan ratlarda nekrozun elektromanyetik alanın etkisiyle azalabileceğini getirmektedir. Aynı zamanda, DEMA uygulanan gruplardan 0,2 mT grubunda 0 skorunda hiç nekroz görülmeyen örnekler bulunurken, skor 3 (>%60) oranında yani geniş nekroz alanları da hiçbir örnekte gözlenmemiştir. Bu durum yine nekroz parametresi için de Bassett et al. (1982)'ın önerdiği 0,2 mT şiddetinde daha olumlu sonuçlar elde edildiğini göstermektedir. Diğer gruplara baktığımızda ise WHO'nun düşük frekanslı alanların biyolojik değişiklik oluşturma sınırı olarak belirlediği 1 mT grubunda ve bunun aşıldığı 2 mT grubunda değişik oranlarda nekroz gözlenmiş ve kontrol ve 0,2 mT gruplarından farklı olarak skor 3 (>%60) oranında geniş nekrotik sahalar 1 mT grubunda %16,7 oranında, 2 mT grubunda ise %14,3 oranında gözlenmiştir. Bu durum da çalışmamızda ortaya çıkan 1 mT dozu aşıldığında DEMA'nın olumlu etkilerinin azalmaya başladığı görüşünü desteklemektedir. Ancak araştırmamızda elde edilen bulguların istatistik analizi yapıldığında nekrozis parametresi açısından oranların DEMA uygulama şiddetinden bağımsız olduğu görülmüştür ($p= 0.088$).

Massari et al. (2006) yılında yaptıkları bir çalışmada femur başı nekrozu görülen 66 hastaya ortalama 5 ay süresince günde 8 saat DEMA uygulamış ve sonuçları radyografik ve klinik olarak değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar femur başı nekrozlarında DEMA'nın kısa vadede artiküler kıkırdağı enflamasyonun katabolik

etkilerinden koruduğunu ve subkondral kemik iliği ödemini engellediğini, uzun vadede ise nekrotik sahada osteojenik aktiviteyi artırmasından ve subkondral yıkımı engellemesinden dolayı fraktür oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir. Böylece bu hastalarda erken dönemdeyse cerrahi müdahale gerekmemekte, aksi takdirde cerrahi müdahaleye kadar olan süre geciktirilebilmektedir.

Ding et al. (2011) çalışmalarında steroid kaynaklı meydana gelen kemik nekrozlarında DEMA kullanımının etkilerini incelemişlerdir. Araştırmaya 72 sıçan dahil edilmiş, bu deney hayvanları 3 gruba ayrılmıştır. İlk 2 gruba, ilk gün IV olarak lipopolisakkarit ve sonraki 3 gün boyunca IM olarak metilprednisolon asetat uygulanmış ancak bunlardan sadece 1. gruba 8 hafta boyunca Helmholtz bobinlerinin kullanıldığı elektromanyetik alan cihazıyla 15 Hz frekansta 1,8 mT şiddetinde DEMA uygulanmıştır. Son grup ise kontrol grubu olarak belirlenmiş ve DEMA uygulaması yapılmadan diğer gruplar gibi aynı zamanda ve aynı dozda %0,9'luk NaCl enjeksiyonu yapılmıştır. Femur proksimalinde kemik nekrozu oranının ölçüldüğü araştırmada kontrol grubunda hiç nekroz görülmezken, DEMA uygulanan grupta (%29) diğer gruba oranla (%75) önemli derecede düşük nekroz gözlenmiştir. Bu sebeple araştırmacılar; DEMA uygulamasının etkili, güvenli ve non-invaziv bir metod olarak steroid kaynaklı meydana gelen nekrozlardan korunma amacıyla kullanışlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda histopatolojik değerlendirme amacıyla kullandığımız bir diğer parametre olan fibrozis oranlarını incelediğimizde bütün gruplarda mutlaka fibröz dokuların oluştuğu görülmektedir. Kontrol grubunda 0 skorunda (%0) fibrozis oluşumu gözlenmezken 1 skorunda da (%5-30) yani düşük düzeyde de görülmemiş, deney hayvanlarının hepsinde ya 2 (%30-60) ya da 3 skorunda (>%60) fibrozis varlığı gözlenmiştir. Düşük dereceli (%5-30) fibrozis varlığı en yüksek 0.2 mT grubunda görülmüştür. Bulgulardan elde ettiğimiz sonuçlardan bir diğeri olan DEMA şiddetinin artmasıyla 2 ve 3 skorlarında yani %30-60 ve >%60 oranlarında fibrozis varlığının artması dikkat çekmektedir. Bu oranlardan 1 mT grubundaki örneklerde skor 2 (%30-60) fibrozis varlığı %50 iken 2mT grubunda %71.4'e çıkmıştır.

Tipik bir indirek kemik iyileşmesinde damarlanmanın daha yoğun olduğu kallusun dış kısmında fibröz doku, damarlanmanın daha az olduğu kallusun

merkezinde ise fibrokartilaj daha fazla görülmektedir (Hulse and Hyman, 1993). Bu görüşe göre DEMA uygulanan deney hayvanlarında düşük frekanslı ve yoğunluklu elektromanyetik alanların damarlanmayı arttırıcı etkisinden kaynaklanan bir fibröz doku oluşumu gözlenmesi olasıdır. Yaptığımız araştırmada fibrozis parametresi açısından kontrol ve farklı şiddetlerde DEMA uygulanan deney gruplarında oranların uygulama şiddetinden bağımsız olduğu görülse de ($p= 0.075$), gruplarımızdan şiddetin en yoğun olduğu 2 mT grubunda 2 skorunda fibrozis varlığının %71.4'e çıkması DEMA yoğunluğunun fibröz doku oluşumunu değiştiren bir unsur olduğunu gösterebilir.

Histopatolojik değerlendirmenin yapıldığı bir deneysel çalışmada Takano et al. (1992) DEMA'ların defekt oluşturulduktan sonra demineralize kemik matriksi (DBM) uygulanan ve uygulanmayan sıçanlarda kemik iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında Wistar cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanlarının premaksillasında 2 mm çapında kemik defekti oluşturmuşlar ve günde 12 saat olmak üzere 1.8 mT şiddetinde ve 100 Hz frekansında DEMA uygulayacak şekilde bir sistem hazırlanmıştır. Deney hayvanları sadece defekt oluşturulan, defekt oluşturulduktan sonra DBM uygulanan, defekt oluşturulduktan sonra DBM ve DEMA uygulanan, defekt oluşturulduktan sonra DEMA uygulanan olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda greftlenmeyen yani sadece defekt ve DEMA gruplarında 21.günde defekt sahasını fibröz doku doldururken 35. günde yer yer yeni kemik yapım alanları görülmüştür. DBM ve DBM+DEMA uygulanan gruplarda ise 21. günde defekt sahasını kaplayan osseos köprüler görülürken, 35. günde defekt sahasının neredeyse tamamının yeni kemik yapım alanlarıyla kaplandığı izlenmiştir. Bu çalışmada DEMA uygulanmasının sadece defekt oluşturulan grupla kıyaslandığında fibröz doku oluşumunu anlamlı derecede arttırmadığı anlaşılmaktadır. Yani DEMA uygulanmasa da defekt alanında aynı oranda fibröz doku oluşumu meydana gelmektedir. Osteotomi yaparak DEMA uyguladığımız çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada defekt oluşturulmuştur ve defekt sahasını DEMA uygulansa da uygulanmasa da öncelikle fibröz dokunun doldurması olağandır.

Kemik iyileşmesinde DEMA'nın etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada Leisner et al. (2002) sıçanlarda yeni oluşmuş ulnar kırıklarda yüksek yoğunluklu

DEMA uygulanan deney hayvanlarında kontrol grubuna göre fibröz dokunun daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir. Kırık iyileşmesinde DEMa uygulanan grupla kontrol grubunda istatistik olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı araştırmada, daha az miktarda oluşan kallusun mineralizasyon derecesinin yüksek olmasından dolayı kırık fragmanlar arası hareketsizliğin daha iyi olabileceğini ve bu şekilde kemikleşme sağlanabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca DEMa'nın kallus dokusunda farklı bir hücre popülasyonunu uyarıyor olabileceğini veya fibrin oluşumun düzenli ve daha iyi olmasını etkiliyor olabileceğini savunmuşlardır.

Erdem (2006)'in, sıçanların tibialarına defekt oluşturduktan sonra çalışma gruplarına EMA uygulayarak 15. ve 45. günde değerlendirme yaptığı çalışmasında, 15.gün EMA uygulanmış ve uygulanmamış gruplarda fibrozis miktarı istatistik olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. Yaptıkları çalışmada defekt oluşturduktan sonra EMA uyguladıkları ve 45. günde değerlendirdikleri grupta 2 skorunda fibrozis varlığı %71.4 olup sadece defekt oluşturup 45.günde değerlendirdikleri gruba kıyasla istatistik olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Araştırmacı bu sonucu EMA'ların kemik iyileşmesi sırasında damarlanmayı arttırmasına ve artan damarlanma sonucunda defekt sonrası oluşan kallusta dokuların beslenmesinin daha iyi olması nedeniyle osseoz yapıya dönüşecek kırık dokusunun daha az, damardan zengin dayanıklı fibröz dokunun daha fazla oluşmasına bağlamıştır (Leisner et al. 2002, Teper et al. 2004). Ayrıca çalışmada EMA uygulanan grupta 45. günde değerlendirilen fibrozis değerlerinin yüksek olmasına bağlı olarak defekt iyileşmesinin fibröz dokudan kaynağını alan primer kırık iyileşmesi şeklinde gerçekleştiği kanısına varılmıştır.

Histopatolojik parametrelerimizden en önemlisi olan yeni kemik yapımı oranlarını incelediğimizde kontrol grubunda 2 skorunda (%30 - 60) yeni kemik yapımının %80 olduğu görülmekle birlikte 3 skorunda (>%60) yeni kemik yapımı %10 örnekte gözlenmiştir (Tablo 8). Ancak 0.2 mT grubunda 3 skorunda (>%60) yeni kemik yapımı oranı %21.4 olarak gözlenmiştir. Bu oran gruplar arasında en yüksek skor olan 3 skorunda gözlenen en yüksek değerdir. Diğer gruplardan 1 mT grubunda da örneklerin %16.7'sinde 3 skorunda (>%60) yeni kemik yapımı gözlenirken, 1 skorunda (%5-30) yani düşük seviyede yeni kemik yapımı gözlenen örneklerde de %66.7 gibi bir oranla önemli artış göstermiştir. En yüksek şiddette

DEMA uygulanan 2 mT grubunda ise diğer gruplardan farklı olarak 0 skorunda yani hiç kemikleşme göstermeyen örnek oranı %21.4'le azımsanmayacak bir rakam ortaya çıkarmıştır. Bu grubun dışındaki bütün gruplarda mutlaka her örnekte farklı seviyelerde yeni kemik yapımı gözlenirken 2 mT grubunda %21.4 örnekte hiç yeni kemik yapımı gözlenmemesi DEMA şiddetinin artmasına bağlı olarak olumsuz etkilerin başladığını düşündürmektedir. Histopatolojik olarak değerlendirildiğinde yeni kemik yapımı parametresinde en iyi sonuçlar bazı araştırmacıların önerdiği düşük şiddette uygulanan DEMA ile elde edilmiştir (Bassett et al. 1982, Atay ve ark. 2005, Ulukut ve ark. 2005).

Literatürde DEMA'ların kemik doku ve kırık iyileşmesine olumlu etkilerinin olduğunu (Bassett et al. 1982, Ottani et al. 1991, Sarker et al. 1993, Grace et al. 1998) veya etkisinin olmadığını bildiren çalışmaların yanında (Barker et al 1984, Filho et al. 1992) olumsuz etkisinin olduğunu bildiren (Muhsin et al. 1991, Hannay et al. 2005) çalışmalar da vardır. Bunların dışında, kemik iyileşmesi amacıyla düşük frekanslı DEMA ile yapılan bu deneysel çalışmaların yanı sıra önceki klinik çalışmalarda da kırık iyileşmesinde elektromanyetik uyarıyla %64 ile %85 arasında değişen başarı oranları bildirilmektedir. Fakat günümüzde hala taze kırıkların tedavisinde etkili olup olmadığı netlik kazanmamıştır (Hannay et al. 2005, Aslan 2008).

Barker et al. (1984), tibia fraktürü olan 17 hasta üzerinde DEMA cihazı ve kontrol grubunda bu cihaza benzer sahte bir cihaz kullanarak kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Kontrol grubundan bir hastanın kişisel sebeplerden cihaz kullanımını bırakması üzerine kalan 16 hastada standart tüm bacak alçı tedavisi uygulanmış, bunun yanında aktif elektromanyetik alan cihazı uygulanan grup günde 12 – 16 saat boyunca 15 Hz frekansta 1-5 mT şiddetinde DEMA maruziyetine tabi tutulmuştur. Hastaların her 6 haftada bir rutin kontrolü yapılmış, 24 hafta sonunda kaynama görülmeyen kırıklara uygulama devam ettirilmiştir. Aktif DEMA uygulanan fraktürlerden 9'undan 5'inde kaynama, kontrol grubunda ise 7 tibiadan 5'inde 24 hafta sonunda kaynama görülmüştür. Bu sonuçların elde edilmesiyle araştırmacılar fraktür iyileşmesinde DEMA etkisinden daha çok klasik konservatif kırık tedavisinin etkili ve önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada hastaların bacakları alçıya alınmış ve iyileşme periyodunda kırık

fragmanların yüklerden arınmış olması çalışmamızdan farklı olan önemli bir kriterdir. Çalışmamızda DEMA uygulamasının deney hayvanlarında yapılması sebebiyle osteotomi yapılmış femurlar üzerine yük binmesi kaçınılmazdır. Bu sebeple Barker et al. (1984)'ın çalışmasında hastaların tüm bacaklarını alçıya almış olması ve normal kemik iyileşmesi için yeterli bir süre beklemiş olması nedeniyle DEMA'nın olumlu etkilerinin maskelenmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Düşük şiddetli elektromanyetik alanların kemik iyileşmesine etkisinin araştırıldığı bir başka deneysel araştırma Pienkowski et al. (1994) 'ın 399 tavşanın fibulalarında osteotomi sonrası elektromanyetik stimülasyon uyguladıkları çalışmadır. Bu çalışmada, araştırmacılar düşük şiddette elektromanyetik alanların kemik iyileşmesine ve iyileşen fragmanların bükme kuvvetlerine karşı direncini incelemişlerdir. Plasebo kontrol grubunun ve deney grubunun olduğu çalışmada, tavşanlara 15 Hz frekansta, 28 mikrotlesla ile 1130 mikrotlesla arasında elektromanyetik alan uygulanmış ve 50-100 milivolt seviyesinde ve 5-7 mikrosaniye atım genişliğinde olan uygulamalarda önemli derecede artmış kallus ve buna bağlı bükme direnci elde edilmiştir.

Darendeliler et al. (1997), statik ve darbeli elektromanyetik alanın kemik iyileşmesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, denek olarak 30 adet domuz kullanmışlardır. Denekler, kontrol ve iki deney grubu olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Tüm deneklerin mandibula gonial bölgelerine defekt oluşturulmuş ve 9. gündeki kemik iyileşmesi değerlendirilmiştir. 15 Hz frekanslı, 1.8 mT şiddetinde elektromanyetik alan günde 8 saat uygulanmıştır. Histolojik bulgular, elektromanyetik alan gruplarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kemik iyileşme oranının hızlandığını göstermiştir. Araştırmacılar ayrıca kontrol grubunda defekt sahasında yumuşak bağ doku bulunurken, deney gruplarında bu alanlarda yeni kemik alanlarının gözlemlendiğini de belirtmişlerdir. Ortaya çıkan sonucu EMA uygulanan gruplarda Ca tutulumunun daha iyi olmasına bağlamışlardır. Kemik iyileşmesinin erken döneminde ortaya çıkan bu farklılık proliferasyon ve diferansiyasyon evrelerinde DEMA'nın daha etkili olmasıyla da açıklanabilir (Midura et al. 2005). Çalışmamızda kemik iyileşmesinin 4. hafta sonunda incelenmiş olmasının erken evrede ortaya çıkan stimüle edici etkiyi bir miktar maskeleyiş olabileceği düşünülmüştür.

Matsumoto et al. 2000 yılında farklı şiddetlerde DEMA uyguladıkları tavşan fibulalarında implant yerleştirilmesini takiben çevresinde yeni kemik yapımını değerlendirmişlerdir. Deney hayvanlarını 100 Hz frekansta; 0.2 mT, 0.3 mT, 0.8 mT ve kontrol grubu olarak 4 ana gruba ayıran araştırmacılar, kontrol grubuyla kıyaslandığında çalışma gruplarında implant çevresinde daha fazla kemik yapımı elde etmişlerdir. Çalışma grupları arasında bir değerlendirme yapıldığında ise 0.2 mT ve 0.3 mT gruplarında 0.8 mT grubuna göre önemli derecede yüksek yeni kemik yapımıyla karşılaşmışlardır. Araştırmamızda histopatolojik analiz ile elde ettiğimiz sonuçlardan 0.2 mT grubunda yeni kemik yapımının 1 mT grubuna göre daha iyi olması Matsumoto et al. (2000)' ın bulgularıyla uyumludur. Ancak bu veri histomorfometrik analizde desteklenmemiştir. Günlük uygulama süresi açısından günde 4 saat ile günde 8 saat DEMA uygulanan femurlar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bunların dışında bu çalışmada 2 haftalık uygulama süresinin, 1 hafta ile kıyaslandığında önemli derecede fark gösterdiği fakat 4 haftalık uygulama süresinin 2 haftaya kıyasla anlamlı bir olumlu getirisinin olmadığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlar DEMA'ların yeni kemik yapımı açısından olumlu getiriler sağlayacak uygulama süresi, şiddeti ve uzunluğu açısından yararlı bilgiler sağlamıştır.

Fibula osteotomileri sonrası DEMA uygulanarak sıçanlarda kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada Midura et al. (2005), 2 mT şiddetinde ve 15 Hz frekansta manyetik alan üreten bir cihazla, 0.2 mT şiddetinde 1.5 Hz frekansta manyetik alan üreten cihazı da karşılaştırmışlardır. Deney hayvanlarının sağ fibulalarına günde 3 saat olmak üzere 5 hafta boyunca DEMA uygulanmıştır. Operasyondan 13 – 20 gün sonra 2 mT şiddetinde, 15 Hz frekansta DEMA ile tedavi edilen fibulalarda uygulanmayanlara göre 2 kat daha fazla kallus hacmi gözlenmiştir. Yine bu özelliklerde DEMA uygulanan sıçanlarda oluşan kallus dokusunun kalitesinin de histolojik olarak önemli derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonucun DEMA'nın kemik iyileşmesinin proliferasyon ve diferansiyasyon aşamalarında etkili olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Ancak 0.2 mT ve 1.5 Hz DEMA uygulanan osteotomi sahalarında aynı olumlu sonuçlar gözlenmemiştir. Bu durum çalışmamızda olumlu sonuçlar elde ettiğimiz 0.2 mT grubuyla bağdaşmamaktadır. Ancak frekansın, uygulama zamanının ve sürenin farklı olması farklı sonuçları da beraberinde getirecektir. Bu sebeple EMA

uygulamalarında etkili olan şiddet, süre, uygulama zamanı, frekans, dalga tipi gibi birçok parametrenin farklı kombinasyonlarda bir araya gelerek meydana getirdiği sonuçlar, zamanla kemik iyileşmesinde kullanılacak optimum ayarların ortaya çıkmasında faydalı olacaktır.

Darbeli elektromanyetik alanın kemik iyileşme hızına etkisini ve implant çevresi yeni kemik oluşumunu değerlendiren Grana et al. (2008), DEMA grubunda kemikleşme yüzdesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar 60 adet Wistar sıçan kullandıkları çalışmalarında, her deneğin sağ tibialarına titanyum implantlar yerleştirmiş, sol tibialarına ise osteotomi uygulamışlardır. 30 adet sıçana günde iki kez 30 dk süre ile 72 mT, 50 Hz DEMA uygulanırken, 30 adet sıçan ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Araştırmacılar kemik iyileşmesini görüntüleme yöntemi ile değerlendirdikleri çalışmalarında, 10. günde kemikleşme yüzdesinin DEMA grubunda daha fazla olduğunu, 20. günde ise deney grubunda osteotomi alanının hemen hemen tamamen remodele olduğunu rapor etmişlerdir. Her ne kadar çalışmamızda farklı metodoloji ve değerlendirme yöntemi kullanılsa da, tüm deney gruplarında mutlaka 3 skorunda yeni kemik oluşumu görülen örnekler izlenirken kontrol grubunda en fazla 2 skorunda yeni kemik oluşumu gözlenmesi DEMA'nın yeni kemik oluşumunu artırıcı etkisi olduğu görüşünü desteklemektedir.

Histopatolojik bulgular açısından tüm gruplar değerlendirildiğinde; kontrol grubunda iltihap ve nekroz parametrelerinin 1 skorunda yoğunlaştığı görülmektedir. Femur osteotomi yönteminin kullanılmış olması ve plak ile fiksasyon yapılmış olması nedeniyle böyle invaziv bir girişimden sonra kemik iyileşmesi sırasında görülen düşük seviyeli (skor 1) iltihap ve nekroz oranları kabul edilebilir görünmektedir. Fibrozis parametresi sadece 2 ve 3 skorunda eşit oranda görülürken yeni kemik yapımı büyük oranda (%80) 2 skorunda görülmüştür. Bu durum normal kemik iyileşmesi sırasında fibröz dokulardan kaynağını alacak olan kemikleşmenin de devam ettiğinin belirteci olabilir. Düşük şiddette DEMA uygulanmış olan 0.2 mT grubunda iltihap oranlarında azalma göze çarpmaktadır. Şöyle ki, hiç iltihap belirtisi göstermeyen (skor 0) örneklerin oranı %21.4 ile en yüksek seviyededir. Bu durum DEMA'nın enflamasyonu azaltıcı etkisinin (Bassett 1989) belirtisi olarak düşünülmüştür. Ancak 1 mT ve 2 mT gruplarında bu etkinin görülmemiş olması

düşük şiddette uygulandığında enflamatuar durumu baskıladığı şeklinde yorumlanabilir. Yeni kemik yapımında 3 skorunda görülen artış da 0.2 mT grubunda görülen olumlu etkinin belirteçidir. 1 mT grubunda 3 skorunda yeni kemik yapımında kontrol grubu (%10) ile kıyaslandığında %16.7 ile artış gözlenmiştir. Ancak 0.2 mT grubuna (%21.4) göre azalma gözlenmiş olması olumlu etkinin azalmaya başladığı şeklinde yorumlanmıştır. Aynı şekilde 2 mT grubunda da (%14.7) kontrol grubuna (%10) göre yüksek olan 3 skorunda kemik iyileşmesi 0.2 mT (%21.4) ve 1 mT (%16.7) grupları ile kıyaslandığında şiddetin artmasıyla yeni kemik yapımındaki olumlu etkinin azalma eğilimi olduğu görüşünü desteklemektedir.

5.4. Histomorfometri

Histopatolojik analiz kırık iyileşmesinin değerlendirilmesinde uygulanan basit bir yöntemdir. Kırık bölgesi ve çevreleyen dokularda genel histolojik parametreler kullanılarak kemik formasyonunun, fragmanlar arasında kaynama olup olmadığının ve yeniden şekillenmenin değerlendirilmesine olanak sağlar (Koivukangas 2002). Ancak kemik dokusunun mineralizasyonu ve kemik hücrelerinin aktiviteleri hakkında detaylı bilgi elde edilememesi önemli bir dezavantajdır (Rauch 2009). Bu sebeple araştırmamızda histopatolojik analizin yanında sonuçların daha objektif olması açısından histomorfometrik analiz de yapılmıştır. Parfitt (1988) ve Iwaniec et al (2008), histomorfometrik analizin doku kesitlerinde kemiğin yapım, yıkım ve yapısal parametrelerinin ölçülebilmesinde altın standart sayılan yöntem olduğunu bildirmiştir. Şimdiye kadar kemik dokusunun mikromimari yapısının ve mekanik direncinin çeşitli histomorfometrik parametreler ile değerlendirildiği çalışmalar (Cortet and Marchandise 2000, Rupprecht et al 2006) yapılmış olmakla birlikte, metabolik kemik hastalıklarının patogenezinin araştırılmasında ve buna yönelik uygun teşhis ve tedavilerin değerlendirilmesinde de üzerinde çalışmalar yapılan bir yöntemdir (Ito and Yashima 2011). Bunların dışında günümüzde kemik dokusunun, özellikle de yeni kemik yapımının değerlendirilmesinde kantitatif değerler elde edilmesine olanak sağlaması nedeniyle

en geçerli yöntem olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Ott 2008, Kulak and Dempster 2010).

Histomorfometrik analizde kullanılan parametreler mikroskop altında kemiğin yapısal özelliklerini ve yeniden şekillenme sırasındaki özelliklerini değerlendirmek amacıyla kullanılan parametreler olmak üzere 2 ana gruba ayrılabilir (Kulak and Dempster 2010). Çalışmamızda yeni kemik yapımı hakkında kantitatif verilerin elde edilebilmesi amacıyla ‘yeni kemik yüzey alanı’ parametresinin yanında kemik hücresel aktiviteleri hakkında bilgi sahibi olunabilmesi için ‘osteoblast sayısı’ ve ‘osteoklast sayısı’ ve aynı zamanda kemik iyileşmesi sırasında gözlenen anjiogenezisi değerlendirebilmek için ‘yeni damar sayısı’ histomorfometrik parametreler olarak seçilmiştir.

Kemik metabolizması şekillenme ve yeniden şekillenme olmak üzere 2 kategoriye ayrılabilir. Her iki süreçte de temelde aynı hücreler etkili olmakla birlikte sonuç farklıdır. Şekillenme işlemi özellikle kemiğin büyüme sırasındaki kütle artışı ve şeklinden sorumluyken, yeniden şekillenmenin etkisi onarım aşamasında ortaya çıkan yeni kemik oluşumu sırasında görülür. İki ayrı fazda ortaya çıkan yeniden şekillenme sırasında, osteoklastlar tarafından mineralize kemik matriksinin rezorpsiyonu oluşurken, osteoblastlar tarafından ise yeni kemik formasyonu meydana gelmektedir. Bu durumda aktif hücrelerin özellikle de osteoblast ve osteoklastların sayısı ve buna bağlı olarak kemik rezorpsiyonu ve kemik formasyonunun relatif değerleri bize yeni kemik yapımı hakkında bilgi vermektedir (Eriksen 1986, Dempster and Zhou 2006). Parametrelerimizden bir diğeri olan ‘yeni damar sayısı’ parametresini seçmemizin nedeni ise damarlanmanın kırık iyileşmesi açısından kritik önem taşıyor olmasıdır (Oren et al 2004). Bilindiği üzere kırık iyileşmesinin enflamasyon fazında temel olarak yaralanmış bölgeye kan akımının ulaşması sağlanmaktadır (Junqueira and Carneiro 2009). Bu sebeple DEMA uygulamasının kapillerdeki genişlemeyi sağlaması ve yeni damarların oluşumunu hızlandırması ile kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde etkinlik gösterdiği düşünülmektedir (Oren et al 2004). Araştırmamızda histomorfometrik değerlendirme sırasında kullandığımız parametrelerden en önemlisi olan ‘yeni kemik yüzey alanı’ parametresi ise yine histomorfometrik analiz yazılım programı vasıtasıyla bilgisayarda mikrometre cinsinden ölçülerek değerlendirilmiştir. Bu da yaptığımız histopatolojik analize ek

olarak kantitatif veriler elde ederek objektif bir değerlendirme yapabilmemiz açısından önem taşımaktadır.

İlk olarak osteoblast değişkenine göre grupları incelediğimizde kesitlerde gözlenen osteoblast sayıları; kontrol grubu = 16.90 ± 8.44 , 0.2 mT grubu = 24.00 ± 8.88 , 1 mT grubu = 28.00 ± 8.84 ve 2 mT grubu ise 20.86 ± 7.61 (Tablo 9) olarak tespit edilmiştir. Tüm deney gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığı çalışmamızda osteoblast değişkenine göre, kontrol grubu ile 1 mT şiddetinde DEMA uygulanmış grup arasında istatistik olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p=0.018$). Bu durum kırık iyileşmesinde tedavi amacıyla elektromanyetik alan uygulandığı takdirde dokularda osteoblast proliferasyonunda artış olduğuna işaret edebilir. Diğer deney gruplarındaki örneklerde gözlenen osteoblast sayıları da istatistik olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre artış göstermiştir.

Geçmişte yapılan bazı araştırmalarda kemik iyileşmesi üzerindeki kesin mekanizması bilinmese de *in vitro* düzeyde DEMA uygulamasının osteoblast proliferasyonunda artışa neden olduğu ve osteoblast kaynaklı kalsifikasyonda olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (Bodamyali et al 1998). Ancak kırık iyileşmesi *in vivo* düzeyde oldukça kompleks ve farklı hücrel aktivitelere bağlantılı bir atmosfere sahiptir. Fiziksel ve biyokimyasal olarak kan damarları ve kemik hücreleri arasında kemik iyileşmesinin farklı aşamalarında dolaylı bağlantılar bulunmaktadır (Carano and Filfaroff 2003). Farklı hücrelere aynı anda maruziyetinin etkisini araştırmak amacıyla Hopper et al. (2009) düşük frekanslı DEMA kullanarak hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmada, 15 Hz frekansta 1.8 mT şiddetinde elektromanyetik alanı osteoblast ve endotelial hücre kültürlerine 8 saat boyunca uygulamışlardır. Araştırmacılar DEMA'nın, *in vitro* düzeyde parakrin mediatörler üzerine etki ederek osteoblast ve endotelial hücrelerin proliferasyon oranlarına indirekt etkisi olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Osteoblastlar üzerine elektromanyetik alanların etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada Zhang et al. (2007), neonatal sıçanların kalvaryal kemik hücrelerine; rektangular elektromanyetik alan, triangular elektromanyetik alan, sinuzoidal elektromanyetik alan ve DEMA uygulaması yaparak hücrelerin proliferasyon, diferansiyasyon ve mineralizasyonlarını ve farklı elektromanyetik alan tiplerine karşı hücrelerin cevaplarını değerlendirmişlerdir. Düşük frekanslı ve farklı dalga

formlarında elektromanyetik alan uygulamasına imkan veren bir jeneretör yardımıyla gerçekleştirilen çalışmada hücre kültürleri 15 Hz frekansta, 5 mT şiddetinde elektromanyetik alana maruz bırakılmıştır. Triangular elektromanyetik alan dışında diğer uygulamalarda osteoblast proliferasyonunda fark gözlenmiştir. Kemik hücrelerindeki proliferasyon kontrol grubuyla kıyaslandığında triangular elektromanyetik alan ve DEMA uygulamasında anlamlı derecede artmıştır. Aynı zamanda DEMA uygulaması kemik iyileşmesi sırasında gözlenen hücre mineralize nodülleri de anlamlı derecede arttırmıştır.

Osteoblast hücre proliferasyonunda DEMA uygulamasıyla mutlaka bir artış gözlenmektedir (Aaron et al. 1999, Zhang et al. 2007). Bizim çalışmamızda da deney gruplarının hepsinde kontrol grubuyla kıyaslandığında osteoblast sayısında bir miktar artış gözlenmiştir. Araştırmamızda elde ettiğimiz DEMA uygulamasıyla osteoblast proliferasyonundaki artış bu çalışmalarla da uyumluluk göstermektedir.

Sallazzo et al. (2010), DEMA'nın osteoblast hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonlarına etkilerini araştırdığı çalışmasında hücre kültürlerinden birine 75 Hz frekansta 2 mT şiddetinde elektromanyetik alanı 18 saat boyunca uygulamışlar, diğer gruba herhangi bir DEMA uygulaması yapmadan kontrol grubu olarak incelemiştir. DEMA'nın hücre proliferasyonuna ve diferansiyasyonuna neden olması sonucunun yanında, ekstrasellüler matriks üretimini ve mineralizasyonunu tetiklerken, matriksin rezorpsiyonunu ve bozulmasını da azalttığı sonucuna ulaşmışlardır. Bu sonuçlar bize DEMA'nın kemik iyileşmesi ve osteogenezis üzerindeki olumlu etkilerinin birçok farklı mekanizma ile ortaya çıktığını göstermesi açısından önemlidir.

Kemik dokusunun formasyonunda DEMA'nın tetikleyici etkilerinin hücrelerin sayısının artışına neden olmasından mı, hücresel diferansiyasyondaki arttırıcı etkisinden mi yoksa her ikisinden mi kaynaklandığını anlayabilmek için olgunlaşmanın farklı aşamalarında osteoblastlar üzerine DEMA uygulaması yapılmıştır. 15 Hz frekans ve 7 mT şiddetinin kullanıldığı araştırmada hücre proliferasyon, diferansiyasyon ve kemik doku formasyonu farklı zamanlarda değerlendirilmiştir (Diniz et al 2002). Aktif proliferasyon safhasının (0 – 10 gün) erken döneminde yani ilk 5 günlük dönemde DEMA uygulamasının hücre proliferasyonunu, diferansiyasyonunu ve kemik formasyonunu anlamlı derecede

arttırdığı gözlemlenmiştir. Osteoblast hücre kültürlerinin diferansiyasyon aşamasının (10 – 20 gün) ilk 5 günlük döneminde uygulandığında da yine diferansiyasyon ve yeni kemik formasyonundaki artışı anlamlı bulmuşlardır. Ancak osteoblast hücre kültürlerinin mineralizasyon aşamasında uygulandığında kemik formasyonunda azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar DEMA'nın osteoblastlar üzerindeki stimulatör etkisinin hücre kültürünün erken dönemlerinde kemik formasyonunda artış ile ortaya çıktığını belirtmiş ancak bu olumlu etkinin osteoblastların sayısal artışına bağlı olarak değil, daha çok hücre diferansiyasyonundaki olumlu etkilerine bağlı olarak meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Araştırmamızda osteoblast sayıları ile yeni kemik yüzey alanı değerleri 1 mT grubu için paralel gitmiştir. Yani en yüksek osteoblast sayısı (28.00 ± 8.84) bu grupta gözlenirken, en fazla yeni kemik yüzey alanı da (70646.12 ± 11340.24) bu grupta gözlenmiştir. Hiç DEMA maruziyetine tabi tutulmayan kontrol grubunda da en düşük osteoblast sayıları (16.90 ± 8.44) gözlenirken, en düşük yeni kemik yüzey alanı oranı da bu gruptadır. Ancak osteoblast sayısı açısından en yüksek 2. değer 0.2 mT grubunda görülmesine rağmen, yeni kemik yüzey alanı değerleri bu grup için paralel gitmemiş ve 2 mT grubunda 0.2 mT grubuna kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Bu bakımdan araştırmamız osteoblast sayılarıyla yeni kemik yapımı açısından direk bir bağ kurulamayacağını gösterdiğinden Diniz et al. (2002) 'ın çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir. Bu durum in vivo kemik iyileşmesinin oldukça karmaşık olması ve DEMA'nın çeşitli hücrelere ve değişik aşamalarda farklı mekanizmalara, bunun dışında farklı fiziksel ve biyokimyasal etkenlere etki ediyor olması görüşünü desteklemektedir (Carano and Filfaroff 2003). Yani DEMA uygulaması osteoblastların sayısal artışının yanında hücrelerde transdüksiyon, transkripsiyon, sentez ve çeşitli büyüme faktörleri salınımı gibi önemli fizyolojik parametreleri de modifiye etmektedir (Sallazzo et al 2010).

Bir sonraki parametremiz olan osteoklast değişkenine göre grupları incelediğimizde kesitlerde gözlenen osteoklast sayıları; kontrol grubu = 3.00 ± 1.70 , 0.2 mT grubu = 1.71 ± 0.10 , 1 mT grubu = 2.25 ± 0.87 ve 2 mT grubu ise 2.57 ± 1.34 (Tablo 9) olarak tespit edilmiştir. Osteoklast değişkenine göre gruplar değerlendirildiğinde elektromanyetik alan uygulanan deney gruplarının hepsinde

kontrol grubuna göre bir miktar azalma gözlenmiştir. Ancak gruplar arasındaki farkın istatistik olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p = 0.101$).

Osteoklast sayılarında ve aktivitelerinde DEMA' nın etkileri, özellikle yeniden şekillenme sırasındaki kemik formasyonu ve rezorpsiyonu dengesinin bozulduğu osteoporozis durumları ve bazı kemik rahatsızlıkları açısından önem kazanmaktadır. Bu sebeple osteoklastların rezorpsiyon aktivitelerinin baskılanması ve kemik formasyonunun artırılması amacıyla araştırmalar yapılmaktadır (Shankar et al. 1998, Chang et al. 2003, Chang et al. 2006). Barnaba et al. 2011 ise implantların etrafında görülen aseptik kemik kayıplarının artmış osteoklastik aktivite ve diferansiyasyonundan kaynaklanabileceğini ve DEMA' nın olumlu etkilerinin olabileceğini belirtmişlerdir.

Chang et al. (2003), hücresele düzeyde DEMA' nın osteoklastogenezise etkisini değerlendirebilmek amacıyla olgun Wistar ratlardan elde ettikleri hücre kültürlerine farklı şiddetlerde ve farklı sürelerde DEMA uygulamışlardır. Uygulama sonrası DEMA şiddetine bağlı olarak osteoklast sayılarında hem artış hem de azalma olabileceği kanısına varılmıştır. Çalışmada, düşük dozda ($4.8 \mu\text{V}/\text{cm}$) DEMA uygulandığında kontrol grubuna kıyasla günlük 0.5 saat, 2 saat ve 8 saatlik uygulamalarda osteoklast sayılarında sırasıyla %27, %37 ve %17'lik bir baskılanma sağlanmıştır. Daha yüksek dozda uygulandığında ise ($12.2 \mu\text{V}/\text{cm}$) aynı sürelerde yine sırasıyla %30, %53, %66'lık bir artış gözlenmiştir. Çalışmamızda deney gruplarına uyguladığımız DEMA şiddetlerinin hepsinin düşük dozlar olduğunu göz önünde bulundurduğumuzda osteoklast sayılarındaki azalmanın bu çalışmayla uyumlu bir sonuç ortaya çıkardığı görülmektedir. Bunların dışında kemikte mikro düzeyde osteoklast gelişiminin yüksek oranda tümör nekroz faktör α (TNF- α), interlökin 1- β (IL-1 β) ve prostoglandin E2 (PGE2) gibi çevresel sitokinler tarafından düzenlediği bilinmektedir (Chang et al. 2003). Osteoklast sayıları ile TNF- α ve IL-1 β düzeyleri arasında doğru orantılı bir ilişkinin bulunduğu, PGE2 düzeyinin ise osteoklast sayıları ile ilişkili Chang et al.(2003)'ün çalışmasında ayrıca belirtilmiştir. Bu çalışma bize kemik rezorpsiyonunu farklı DEMA şiddetleri kullanarak stimule veya inhibe edebileceğimizi göstermektedir. Ayrıca DEMA' nın farklı dozlarının osteoklastlar üzerine biyolojik etkilerinin gittikçe daha fazla anlaşılmasıyla, ileride

osteoporozis, osteopetrozis gibi kemik metabolizması hastalıklarına karşı yeni yaklaşımlar ortaya çıkabilir.

Bir başka çalışmada Chang et al. (2006), in vitro düzeyde hazırladıkları osteoklast hücre kültürlerine 7.5 Hz frekansta, 3 $\mu\text{V}/\text{cm}$ şiddetinde DEMA uygulayarak osteoklast apoptozisini (programlanmış hücre ölümü) gözlemişlerdir. Araştırmacılar 8 aylık Wistar ratların femur ve tibialarından alarak hazırladıkları hücre kültürlerinde 48 saat sonrasında, 8 saat DEMA uyguladıklarında %105 oranında 16 saat DEMA uyguladıklarında ise %30 oranında osteoklast apoptozis artışı gözlemişlerdir. Fakat kültürün hazırlanmasından sonraki 24. saat ve 72. saatlerde herhangi bir etki görülmemiştir. Araştırmacılar bu durumu olgun osteoklastların izolasyonundan 24 saat sonrasının apoptozis başlaması için kısa bir süre olmasına, 72 saat sonrasında ise zaten hücrelerin kendiliğinden apoptozis sürecine girmiş olmalarına bağlamışlardır. Bu çalışmaya göre DEMA uygulamasıyla osteoklastlarda apoptozis olayı tetiklenerek rezorpsiyonun engellenmesi ve kemik ilişkili rahatsızlıklarda çeşitli alternatifler oluşturulabilir. Ancak yine osteoblastların apoptozisine etki edebilecek TNF- α , IL-1 β , TGF- β 1 ve OPG (osteprotegerin) gibi düzenleyici moleküllerin ortamda bulunabilmesi ve bu moleküllerin DEMA' dan farklı şekilde etkileniyor olması nedeniyle DEMA' nın direkt olarak osteoklast apoptozisine neden olduğu gibi bir yorum yapılamamaktadır. Çalışmamızda da osteoklast sayılarının DEMA uygulanan gruplarda daha düşük çıkmasının nedeni DEMA' nın osteoklast formasyonunu baskılamasından ve/veya osteoklastların apoptozisini tetiklemesinden kaynaklanıyor olabilir.

Elektromanyetik alanların klinik başarısının farklı birçok değişkene bağlı olduğu bilinmektedir. Doku iyileşmesinde önemli rol oynayan bir süreç olan angiogenezis, vücutta yeni kan damar ağlarının oluşumu olarak adlandırılmaktadır. Araştırmacılar DEMA' nın angiogenezis üzerinde etkili olduğunu düşünmüşler ve etki mekanizmasını aydınlatmaya çalışmışlardır (Tepper et al. 2004).

Yeni damar sayısı değişkenine göre grupları incelediğimizde kesitlerde gözlenen yeni damar sayıları; kontrol grubu = 1.40 ± 0.10 , 0.2 mT grubu = 2.57 ± 1.70 , 1 mT grubu = 2.50 ± 1.57 ve 2 mT grubu ise 3.00 ± 1.84 (Tablo 9) olarak tespit edilmiştir. Çalışma gruplarının karşılaştırıldığı çalışmamızda yeni damar sayısı değişkenine göre, gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir fark ortaya

çıkamıştır ($p = 0.101$). Ancak deney gruplarındaki örneklerde gözlenen yeni damar sayıları kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Araştırmamızda gözlediğimiz bu durumun istatistik olarak anlamlılık göstermemesi nedeniyle kırık iyileşmesinde tedavi amacıyla elektromanyetik alan uygulandığı takdirde dokularda yeni damar oluşumunda artış olduğuna kanıt olarak gösterilememektedir.

Angiogenesis ile elektromanyetik alan ilişkisini araştırmayı amaçlayan bir çalışmada Patton et al. (1988), endotelial hücre kültürlerine 0.1 mT şiddetinde 15 Hz frekanslı elektromanyetik alan uygulamışlardır. Deney grubunda kontrol grubuna kıyasla endotelial hücre proliferasyonunun ve vaskularizasyonun arttığı görülmüştür. Araştırmacılar bu bulgulardan yola çıkarak kaynama göstermeyen inatçı kırıklarda iyileşmenin angiogenesis safhasındaki duraklamaya bağlı endokondral kemikleşme oluşmaması nedeniyle gerçekleşmediğini bu sebeple elektromanyetik alan uygulamasının angiogenesis üzerine olumlu etkilerinden dolayı bu duraklamayı engelleyebileceğini belirtmişlerdir.

Tepper et al. (2004) çalışmalarında, in-vivo ve in-vitro olarak sıçanlara ve hücre kültürlerine 15 Hz'lik ve 1.2 mT şiddetinde DEMA uygulamasının angiogenesis üzerine etkilerini araştırmışlardır. İn-vitro çalışmada insan endotelial hücre kültürlerine 24 saatlik DEMA uygulaması sonucunda hücre sayısı ile orantılı olarak hücre proliferasyonunda, DEMA uygulanmamış kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğunu belirtirken ($p < 0.01$); farklı hücre kültürlerinde değerlendirdikleri fibroblast ve osteoblast sayılarında anlamlı artışlar olmadığını rapor etmişlerdir. Sıçanlar üzerinde yapılan in-vivo çalışmada ise deney hayvanlarına günde 8 saat DEMA uygulanmış, 3., 10. ve 14. günlerde değerlendirilmiştir. Çalışmacılar deney gruplarında DEMA uygulanmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin vasküler artış izlendiğini, angiogenesisin 2 kat arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da Tepper et al. (2004)' in kullandığı frekans ve yakın bir doz kullanılan 2 mT grubunda (3.00 ± 1.84) kontrol grubuyla (1.40 ± 0.10) kıyaslandığında yeni damar sayısında benzer bir sonuç (yaklaşık 2 kat artış) elde edilmiştir. Bu bakımdan çalışmamız Tepper et al. (2004)' in bulgularıyla uyum göstermektedir. Sonuç olarak araştırmacılar DEMA'nın angiogenesis üzerinde belirgin etkisi olduğunu ve esas hedef hücrelerinin endotelial hücreler olduğunu, DEMA uygulamasının kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisinin osteogenesis'e direk

etkisinden çok angiogenezis üzerindeki arttırıcı etkisinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu artışta da potansiyel etkili vasküler mitojen olduğu bilinen ve pro-angiogenik etkiden sorumlu olduğu düşünülen (Losordo et al. 1998) VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü)' den ziyade primer olarak FGF-2 (fibroblast büyüme faktörü)' nin etkili olduğunu dile getirmişlerdir.

Del Monache et al. (2008), yaptıkları çalışmada in-vitro olarak EMA ve angiogenezis ilişkisini araştırmışlardır. İnsan endotelial hücre kültürlerine günde 12 sa, 50 Hz frekanslı ve 1 mT şiddetinde EMA uygulamışlardır. Araştırmacılar, insan mikrovasküler endotelial hücrelerinin önemli fonksiyonlarından proliferasyon, migrasyon ve tübül formasyonu gibi fonksiyonlarda önemli artışlar olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda EMA ile endotelial fonksiyonlarla ilişkili olarak VEGF kanalıyla angiogenezin arttığını bildirmişlerdir. Bu bulgu Tepper et al. (2004)'ın angiogeneziste FGF-2' nin primer etkili olduğunu belirttiği çalışma ile uyum göstermemektedir.

Çalışmamızda histomorfometrik analizde damar sayısı değişkeni ile değerlendirilen angiogenezis miktarı tüm deney gruplarında, kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Tüm deney gruplarında belirgin artış izlenmesine rağmen gruplar karşılaştırıldığında değerlerin istatistik olarak anlamlı bulunmaması nedeniyle DEMA uygulamasıyla angiogenezin arttığı şeklinde bir yorum yapılamamaktadır. Bunun dışında, yeni kemik yüzey alanlarına baktığımızda yeni damar sayısının en yüksek olduğu 2 mT grubunda (68295.92 ± 12565.13) 1 mT grubuna (70646.12 ± 11340.24) göre yeni kemik yüzey alanının daha düşük olması damardan yoğun fibröz doku artışının olumsuz etkisine bağlanabilir. Leisner et al. (2002)' ye göre artan damarlanma sonucunda, kemikteki defekt sonrası oluşan kallusta dokuların beslenmesinin daha iyi olması nedeniyle osseoz yapıya dönüşecek kırık dokusu daha az, damardan zengin dayanıklı fibröz doku daha fazla oluşmaktadır. Çalışmamızda da elde ettiğimiz bu bulgulara göre damarlanmanın dolayısıyla fibröz doku artışının aşırı olması kırık fragmanların mikro düzeyde hareketsizliğini sağlamada olumsuz etkileyeceğinden kemik iyileşmesinin damar sayısı artışı ile doğru orantılı olarak artmayacağı şeklinde bir düşünce ortaya çıkmıştır.

Histomorfometrik analizdeki en önemli parametremiz olan yeni kemik yüzey alanı değişkenine göre grupları incelediğimizde kesitlerde gözlenen yeni kemik yüzey alanları μm^2 cinsinden; kontrol grubu = 54106.40 ± 22822.64 , 0.2 mT grubu = $66.160.29 \pm 13196.37$, 1 mT grubu = 70646.12 ± 11340.24 ve 2 mT grubu ise 68295.92 ± 12565.13 (Tablo 9) olarak tespit edilmiştir. Yine tüm deney gruplarının karşılaştırıldığı yeni kemik yüzey alanı değişkenine göre, gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p = 0.303$). Ancak deney gruplarındaki örneklerde gözlenen yeni kemik yüzey alanları kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Araştırmamızda gözlediğimiz bu durum kırık iyileşmesinde tedavi amacıyla elektromanyetik alan uygulandığı takdirde dokularda yeni kemik yapımında artış olduğuna, dolayısıyla DEMA kullanarak kemik iyileşmesinin hızlandırılabilmesine veya iyileşmeyen inatçı kırıklarda DEMA uygulamasının olumlu sonuçlar ortaya çıkarabileceğine net bir şekilde işaret edememektedir.

Şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada DEMA uygulaması ile kırıklarda kemik iyileşmesinin hızlandırılabilmesine dair sonuçlar elde edilmiştir (Bassett et al. 1982, Ottani et al. 1991, Sarker et al. 1993, Darendeliler et al. 1997, Grace et al. 1998, Leisner et al. 2005, Gupta et al. 2009). Bu çalışmalardan farklı olarak Inoue et al. (2002)' in yaptıkları çalışmada deney hayvanları üzerinde kırık iyileşmesinin geç fazlarında DEMA uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışmada deney hayvanı olarak 12 adet yetişkin köpek kullanılmış, çalışma ($n = 6$) ve kontrol ($n = 6$) grubu olarak ayrılan deneklerin tek taraflı olarak tibialarında transversal osteotomiler yapılmıştır. Kullanılan cihaz 1.5 Hz frekansta ve 0.2 mT şiddetinde DEMA üretmektedir. Deney hayvanları osteotomiyi ve fiksasyonu takiben 4. haftadan itibaren 8. hafta boyunca günlük 1 saat DEMA maruziyetine tabi tutulmuştur. Yeni kemik oluşumunu tetikleyen kemik morfojenik proteinleri ve diğer büyüme faktörleri genellikle kemik iyileşmesi sürecinin 4. haftasında anlamlı derecede düşmektedir (Sandberg et al. 1993). Biyofiziksel stimülasyonun başlangıç zamanının farklı biyolojik etkilere yol açması nedeniyle kemik iyileşmesi üzerinde önemli bir faktördür. Bu sebeple Inoue et al. (2002) çalışmasında kemik iyileşmesinin başlangıç fazlarının tamamlandığı 4. haftada DEMA uygulamasını başlatmış ve histomorfometrik analiz ile DEMA uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla yeni kemik formasyon yüzdesi ve yeni kemik yüzey alanında anlamlı derecede yüksek

sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmamızda DEMA' nın taze kemik kırıklarının iyileşmesi üzerine etkisi değerlendirilirken bu çalışmada iyileşmenin geç döneminde DEMA kullanılması kaynamayan inatçı kırıkların tedavisi hakkında yorum yapılabilmesi açısından önemlidir.

Ozen et al. (2004), tavşanlarda implant yerleştirilmesini takiben DEMA uygulayarak kemik iyileşmesini değerlendirmişlerdir. Deney ve çalışma grubu olarak 2 gruba ayırdıkları deney hayvanlarından çalışma grubuna implant yerleştirilmesini takiben 2 hafta boyunca 0.2 mT şiddetinde ve 100 Hz frekansta DEMA'yı günde 4 saat olarak uygulamışlardır. 8 hafta sonrasında sakrifiye edilen tavşanlardan DEMA uygulanan çalışma grubundakilerde implant etrafındaki yeni kemik oluşumu anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve bu kemiğin trabeküler yapıya sahip olduğu belirtilmiştir. Trabeküler yapının fazla olması kanlanmanın da daha iyi olacağı düşüncesini akla getirmektedir. Matsumoto et al. (2000)' ın da benzer olarak 100 Hz frekansta, 0.2 mT ve 0.3 mT şiddetlerinde tavşan femurlarında yerleştirdikleri implantların çevresindeki yeni kemik alanını kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulması DEMA' nın klinik olarak implant uygulanan olgularda kemik iyileşmesinin hızlandırılması ve dolayısıyla osseointegrasyonun daha kısa sürede tamamlanmasına olanak sağlayabilir.

Yeni kemik alanının ölçüldüğü diğer bir alışma Taylor et al. (2005) tarafından yapılmıştır. Araştırcılar 18 adet Yeni Zelanda tavşanını rastgele gruplara ayırmış, tibial osteotomi sonrasında distraksiyon yaparak DEMA' nın etkilerini incelemeyi amaçlamışlardır. Fiksator yerleştirilmesini takiben latent period için 7 gün beklenmiş ve sonrasında 10 gün boyunca günde 2 kere 0.5 mm'lik distraksiyon yapılmıştır. Konsolidasyon safhasında uygulanmaya başlanan DEMA'nın şiddeti 0.2 mT ve frekansı 1.5 Hz olarak tercih edilmiştir. Uygulama suresi ise günde 1 saat olmak üzere 20 gün boyunca devam etmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında DEMA uygulanan grupta yeni kemik yüzeyinde anlamlı bir fark bulmayan araştırcılar bunu DEMA' nın geç dönemde yani konsolidasyon döneminde uygulanmasına bağlamışlardır. Bu bakımdan latent sure beklenmeden distraksiyona başlanan ve aynı zamanda beklenmeden DEMA uygulamasının da başlandığı ve kemik yapımında olumlu sonuçların elde edildiği Fredericks et al. (2003)' ın çalışmasıyla farklılık göstermektedir. Bu bulgular bize distraksiyon sırasında DEMA uygulamasının kemik

iyileşmesi açısından olumlu etkilerinin ancak erken dönemde uygulandığı takdirde görülebileceğini işaret etmektedir.

Histomorfometrik değerlendirmenin yapıldığı bir başka çalışmada Boopalan et al. (2009), 12 adet Wistar sıçan üzerinde çalışmışlardır. Çalışma grubu (n = 6) ve deney grubu (n = 6) olarak ayrılan sıçanların femurlarında 5 mm'lik bir osteotomi yapılmış ve femurlar Kirschner telleri vasıtasıyla fikse edilmiştir. Deney hayvanlarında 1 Hz, 20 V DEMA uygulaması günde 2 defa 1 saat süreyle ve 6 hafta boyunca yapılmıştır. Çalışmada DEMA uygulanan deney gruplarında yeni kemik formasyonunda artış gözlenmekle beraber bu kemiğin yapısının daha çok trabeküler yapıdan kaynaklandığı belirtilmiştir. Kontrol grubunda ise defekt sahalarında kortikal ve trabeküler kemik yapıları beraber görülmüştür. Defekt alanındaki yeni kemik yüzey alanları istatistik olarak anlamlı ($p = 0.015$) bulunmakla beraber çalışma grubunda $1000608 \mu\text{m}^2$, kontrol grubunda ise $328091 \mu\text{m}^2$ olarak ölçülmüştür. Çalışmada TGF- β salınımını da değerlendiren araştırmacılar iki grupta da artış görmüşler fakat çalışma grubundaki artışın anlamlı derecede yüksek olması nedeniyle yeni kemik oluşumundaki olumlu etkilerin TGF- β ' dan kaynaklanabileceği şeklinde yorum yapmışlardır. Dimitriou et al. (2005), kemik iyileşmesi sırasında görülen moleküler etkenleri; proinflamator sitokinler, TGF- β ailesi ve diğer büyüme faktörleri, angijenik faktörler olarak 3 gruba ayırmıştır. TGF- β ' nin osteoprogenitör hücreler tarafından yapılan BMP sentezini tetiklediği ve böylece osteoklastik aktiviteyi inhibe edebileceği osteoklastların apoptozisini hızlandırabileceği rapor edilmiştir.

Histomorfometrik parametreler açısından genel olarak gruplarımızı değerlendirdiğimizde kontrol grubuna (54106.40 ± 22822.64) göre 0.2 mT grubunda ($66.160.29 \pm 13196.37$) yeni kemik yüzey alanında artış olmakla birlikte bu artışın istatistik olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Histopatolojik verilerin aksine histomorfometrik değerlendirmede en olumlu sonuçlar 1 mT grubunda bulunmuştur. Bu durum objektif bir değerlendirme yapılabilmesi için histomorfometrik analiz yapmanın gerekliliğini de ortaya koymaktadır. 1 mT grubunda osteoblast sayılarında (28.00 ± 8.84) istatistik olarak anlamlı derecede artış ($p= 0.018$) ve osteoblast sayısı artarken, osteoklast sayısının azalması şeklinde görülen korelasyon ($p= 0.03$) kemik yapımı artarken osteoklastik aktivitenin baskılanmasına dolayısıyla rezorpsiyonun

azalmasına işaret etmektedir. 2 mT grubunda ise yeni kemik yapımı yine kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ancak 1 mT grubu ile kıyaslandığında azalma olması histopatolojik değerlendirme sırasında elde ettiğimiz şiddetin artmasıyla birlikte kemik iyileşmesi sürecinde görülen olumlu etkilerde azalma olması görüşü ile uyum sağlamaktadır. Damar sayısı parametresi de 2 mT grubunda (3.00 ± 1.84) diğer çalışma gruplarıyla ve kontrol grubuyla (1.40 ± 0.10) kıyaslandığında en yüksek seviyededir. Bu durum da DEMA'nın fibrozisi ve dolayısıyla damarlanmayı artırıcı etkisine bağlanmıştır. Angiogenesis sürecinde yeni damarların oluşması ve kanlanmanın artması kemik iyileşmesinde önemlidir. Ancak çalışmamızda görüldüğü üzere damar sayısının en yüksek çıktığı 2 mT grubunda en yüksek yeni kemik yüzey alanının elde edilememiş olması damarlanmayla kemik iyileşmesi arasında direkt bir bağ kurulamayacağını belirtisidir. Hatta damardan zengin fibröz dokuların kırık bölgesinde aşırı oluşumuna bağlı olarak daha dirençli kallus dokusunun sağladığı desteğin aksine kırık fragmanların hareketliliğine müsaade ettiği için kırık iyileşmesinde gecikmeler olması bile muhtemeldir.

Çalışmamızda DEMA uygulamasının kemik iyileşmesi açısından her 3 dozda da (0.2 mT grubu = $66.160.29 \pm 13196.37$, 1 mT grubu = 70646.12 ± 11340.24 ve 2 mT grubu = 68295.92 ± 12565.13) kontrol grubuna (54106.40 ± 22822.64) göre fayda sağladığı düşünülmüştür. Ancak DEMA şiddeti bizim uyguladığımız dozlardan daha yükseğe çıktığında olumlu etkilerin ortadan tamamen kalkabileceği kanaati ortaya çıkmıştır. Şöyle ki, en yüksek şiddeti uyguladığımız 2 mT grubunda, 1 mT grubuna göre anlamlı olmasa da yeni oluşan kemik yüzey alanında düşüş gözlenmiştir. Ayrıca WHO'ya göre kemik iyileşmesinin hızlandırılması için uygulanacak DEMA'ların dozu 1 mT'yi aştığında biyolojik sistemlerde farklı olumsuz etkiler ortaya çıkacaktır.

Kemik iyileşmesini hızlandırmak için DEMA uygulamaları uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir konudur. Gelecekte yeni çalışmalarla, DEMA uygulamalarının kemik iyileşmesi üzerindeki etki mekanizmalarının aydınlatılacağı ve uygulamayı etkileyen değişkenlerin optimize edileceği, böylece iyileşme üzerindeki olumlu etkilerinin artırılarak non-invaziv bir yöntem olarak kullanılabilmesi kanaatine varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı şiddetlerdeki DEMA uygulamasının sıçan femurlarında kontrollü olarak oluşturulan osteotomi sonrası kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelediğimiz çalışmamızda şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Sıçan femurlarında kırık fiksasyonu amacıyla kullanılan mini plakların metal yorgunluğu olmayan ve rijit fiksasyon sağlayabilecek sertlikte materyalden seçilmesi, kırık fragmanların hareketsizliğinin sağlanması açısından önem taşımaktadır. Aksi takdirde femur üzerine binen yükler karşısında plaklarda meydana gelen kırılma ve bükülmeler iyileşme sürecinin bozulmasına veya fragmanlar arasında kaynama oluşmamasına neden olabilir.

2. Deney hayvanlarında invaziv bir cerrahi işlem sonrasında ağırlık kaybı gözlenmesi olağandır. Fakat çalışmamızda 4. haftada 2 mT grubunda preoperatif ağırlıkların hala geri kazanılamamış olması DEMA uygulamasının şiddetinin artmasıyla kaybedilen ağırlığın geri kazanılmasını olumsuz etkileyebileceği tespit edilmiştir.

3. Araştırmamızda kırık iyileşmesinin değerlendirilmesi amacıyla hem histopatolojik hem de histomorfometrik analiz yapılmıştır. Ancak histomorfometrik analiz kantitatif veriler sunması nedeniyle objektif bir değerlendirme yapabilmek imkanı sunmaktadır.

4. Histopatolojik analizde gruplarımızda, diğer gruplardan farklı olarak sadece 0.2 mT grubunda %21.4 oranında örnekte hiç iltihap görülmemesi nedeniyle düşük şiddette DEMA uygulamasının iyileşme döneminde enflamasyonu azalttığı sonucuna ulaşılmıştır.

5. Deney gruplarında DEMA uygulamasının damarlanmayı arttırdığı fakat kemik iyileşmesinin buna doğru orantılı artmadığı, DEMA uygulamasının şiddetinin 1 mT'yi aştığında damardan zengin fibröz dokuların aşırı artmasının kırık fragmanlar arasındaki hareketsizliği olumsuz etkileyebileceği düşünülmüştür.

6. Kontrol grubuna göre bütün deney gruplarında kemik iyileşmesinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak sonuçların istatistik olarak anlamlılık göstermemesi

DEMA uygulamasının taze olmuş kırıkların ve iyileşmeyen inatçı kırıkların tedavisinde kullanılabileceğini net olarak ortaya koyamamaktadır.

7. Çalışmamızda kemik iyileşmesi açısından en iyi sonuçlar 1 mT grubunda elde edilmiştir. Ancak DEMA uygulamasında kemik iyileşmesini etkileyen birçok parametre olması nedeniyle uygulanabilecek optimum frekans, şiddet, uygulama süresinin uzunluğu ve zamanı açısından değişik kombinasyonlar üretilerek yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

ÖZET

Sıçanlarda Farklı Şiddetteki Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulamalarının Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkisi

Kemik iyileşmesi, yeni kemik yapımını arttırıcı osteoblastik ve osteoklastik faaliyetleri de içeren karmaşık bir süreçtir. Kemik iyileşmesini hızlandırmak için bir çok çalışma yapılmaktadır. Kullanılan yöntemlerden biri de darbeli elektromanyetik alan (DEMA) uygulamasıdır. Bu araştırmanın amacı; farklı şiddetlerdeki DEMA uygulamalarının kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin histopatolojik ve histomorfometrik analiz ile değerlendirilmesidir.

Sunulan prospektif, randomize ve tek kör çalışmada, 12 aylık Wistar albino sıçanlar (n= 40); kontrol (n= 10), 0.2 mT (n= 10), 1 mT (n= 10) ve 2 mT (n= 10) grupları olmak üzere dört gruba ayrıldı. Femur kemiğinde osteotomi yöntemiyle oluşturulan kırık parçalar mini plak ve mikro vidalarla rijit fiksasyon uygulanarak sabitlendi. Femurlarında kırık oluşturulan sıçanlara 15 Hz sabit frekansta, günde 1 saat olmak üzere 3 hafta süreyle ait olduğu grubun protokolüne uygun 0.2 mT (2 Gauss), 1 mT (10 Gauss) ve 2 mT (20 Gauss) olmak üzere 3 ayrı şiddette DEMA uygulandı ve DEMA uygulamasını takiben 1 hafta beklendi. Araştırmamızda kemik iyileşmesi, operasyon sonrası 4. haftada çıkarılan femur kemikleri üzerinde histopatolojik ve histomorfometrik analiz ile değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirmede parametreler yüzdelere göre 0-3 arasında skorlandı.

Histopatolojik olarak yapılan değerlendirmede iltihap oranının DEMA uygulama şiddetinden bağımsız olmadığı ($p= 0.025$) ve 0.2 mT grubunda (skor 0= %21.4) kontrol grubuna kıyasla (%0) düşük olduğu, yeni kemik yapımının da DEMA uygulama şiddetinden bağımsız olmadığı ($p= 0.019$) ve 0.2 mT grubunda (skor 3 =21.4%) kontrol grubuna göre (%10) yüksek olduğu tespit edildi. Histomorfometrik analizde, osteoblast sayısının kontrol grubuna (16.90 ± 8.44) göre 1 mT grubunda (28.00 ± 8.84) anlamlı derecede yüksek olduğu ($p= 0.018$) bulundu.

Sonuç olarak kemik iyileşmesinde en olumlu etkinin 1 mT şiddetinde meydana geldiği görüldü. Buna ek olarak, histopatolojik değerlendirmede inflamasyonun azaldığı ve kemik yapımının arttığı görülse de 0.2 mT şiddetinde daha fazla denek sayılarıyla yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Darbeli elektromanyetik alan, histomorfometri, kemik iyileşmesi, sıçan.

ABSTRACT

Effect of Different Intensities of Pulsed Electromagnetic Field Therapies on Bone Fracture Healing in Rats.

Bone healing is a complex process including osteoblastic and osteoclastic activities in the advantage of bone formation. Accumulating studies have illustrated the effect of various methods on acceleration of bone healing. Pulsed electromagnetic field (PEMF) therapy is one these methods used to accelerate bone healing. The aim of this study was to evaluate the effects of different intensities of PEMF application on bone healing in rats.

In this prospective, randomized and single blind study, 12-months-old Wistar albino rats (n=40) were divided into four groups as control (n=10), 0.2mT (n=10), 1mT (n=10) and 2mT (n=10) groups. To evaluate bone healing, fracture was created with dental fissure bur on rat femurs with osteotomy and fixed with miniplates and screws. Three different intensities of PEMF as 0.2mT (2 Gauss), 1mT (10 Gauss) and 2mT (20 Gauss) at 15 Hz frequencies were applied 1 hour/day for three- weeks according to their protocol. At the end of 4th-week, rats were sacrificed and femurs were removed. Histopathological and histomorphometrical analysis were performed. In histopathological analysis parameters were scored between 0-3 according their percentage rates.

Results of histopathological evaluation showed inflammation is not independent from PEMF intensity ($p=0.025$) and there is a decrease in inflammation in 0.2mT group (score 0 =21.4%) when compared to control group (0%), new bone formation is not independent from PEMF intensity ($p=0.019$) and there is an increase in new bone formation (score 3 =21.4%) compared to control group (10%). In histomorphometric analysis, the only statistically significant difference was determined in 1mT group in which osteoblast number (28.00 ± 8.84) was significantly increased ($p=0.018$) when compared to control group (16.90 ± 8.44).

It was concluded that 1mT group may be the most effective intensity of PEMF application in terms of acceleration of bone fracture healing. Additionally, when statistically significant decrease in inflammation and increase in new bone formation as histopathologically are considered, it is worth performing this research on higher number of animals in 0.2 mT group.

Key Words: Bone healing, histomorphometry, pulsed electromagnetic fields, rat.

KAYNAKLAR

Aaron RK, Lennox D, Bunce GE, Ebert T. The conservative treatment of osteonecrosis of the femoral head. A comparison of core decompression and pulsing electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res*, 1989; 249: 209-218.

Aaron RK, Ciombor DM, Simon BJ. Treatment of nonunions with electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res*, 2004; 419: 21-29.

Abbasi M, Nakhjavani M, Hamidi S, Tarafdari AM, Esteghamati A. Constant magnetic field of 50 mT does not affect weight gain and blood glucose level in BALB/c mice. *Med Sci Monit*, 2007; 13(7): 151-154.

Aday WR, Lawrence AF. *Nonlinear Electrodynamics in Biological Systems*. New York: Plenum, 1984: p. 3-22.

Akay MT. *Genel Histoloji*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: s. 147-171.

Akbolat V. Oldukça düşük frekanslı manyetik alan ve mangan'ın kemik mineral içeriği ve yoğunluğu üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, 2008; 35(4): 240-244.

Atay A, Özen J, Oruç S, Dalkız M, Beydemir B, Halaç E, Isnık M. Diş hekimliğinde implant çevresindeki kemik iyileşmesinin hızlandırılmasında kullanılabilir elektromanyetik alan darbe üretici tasarımı. *Gülhane Tıp Dergisi*, 2003; 45(4): 350-354.

Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res*, 2001; 16(4): 671-680.

Barker AT, Dixon RA, Sharrard WJ, Sutcliffe ML. Pulsed magnetic field therapy for tibial non-union. Interim results of a double-blind trial. *Lancet*, 1984; 1(8384): 994-996.

Bassett CA, Pawluk RJ, Pilla AA. Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields. A surgically noninvasive method. *Ann N Y Acad Sci*, 1974; 238: 242-262.

Bassett CA, Mitchell SN, Gaston SR. Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am*, 1981; 63(4): 511-523.

Bassett CA, Valdes MG, Hernandez E. Modification of fracture repair with selected pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am*, 1982; 64(6): 888-895.

Bassett CA. The development and application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for ununited fractures and arthrodeses. *Orthop Clin North Am*, 1984; 15(1): 61-87.

Bassett CA. Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *Crit Rev Biomed Eng*, 1989; 17(5): 451-529.

Bassett CA. Beneficial effects of electromagnetic fields. *J Cell Biochem*, 1993; 51(4): 387-393.

Binderman I, Somjen D, Shimshoni Z, Levy J, Fischler H, Korenstein R. Stimulation of skeletal-derived cell cultures by different electric field intensities is cell-specific. *Biochim Biophys Acta*, 1985; 844(3): 273-279.

Birnbaum K, Wirtz DC, Siebert CH, Heller KD. Use of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of non-unions. A review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2002; 122(6): 324-330.

Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ, Winrow VR, Kanczler JM, Simon B, Abbott J, Blake DR, Stevens CR. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 250(2): 458-461.

Borrelli J Jr, Prickett WD, Ricci WM. Treatment of nonunions and osseous defects with bone graft and calcium sulfate. *Clin Orthop Relat Res*, 2003; 411: 245-254.

Bostrom MPG, Yang X, Koutras I: Biologics in bone healing. *Curr Opin Orthop*, 2000; 11: 403-412.

Bozic KJ, Glazer PA, Zurakowski D, Simon BJ, Lipson SJ, Hayes WC. In vivo evaluation of coralline hydroxyapatite and direct current electrical stimulation in lumbar spinal fusion. *Spine*, 1999; 24: 2127-2133.

Brighton CT, FriedenberG ZB, Black J, Esterhai JL Jr, Mitchell JE, Montique F Jr. Electrically induced osteogenesis: relationship between charge, current density, and the amount of bone formed: introduction of a new cathode concept. *Clin Orthop Relat Res*, 1981; 161: 122-132.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. *Bone biology. J Bone Joint Surg Am*, 1995; 77: 1256-1275.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*, 1996; 45: 371-386.

Buckwalter J, Einhorn T, Simon S. Orthopaedic basic science, 2nd edn. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000: p. 58-63.

Canè V, Botti P, Soana S. Pulsed magnetic fields improve osteoblast activity during the repair of an experimental osseous defect. *J Orthop Res*, 1993; 11(5): 664-670.

Cannon CP, Lin PP, Lewis VO, Yasko AW. Management of radiation-associated fractures. *J Am Acad Orthop Surg*, 2008; 16(9): 541-549.

Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, Akiyama T, Shi L, Komatsubara S, Miyamoto K, Norimatsu H. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, 2002; 17(12): 2237-2246.

Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*, 2003; 8(21): 980-989.

Chang K, Hong-Shong Chang W, Yu YH, Shih C. Pulsed electromagnetic field stimulation of bone marrow cells derived from ovariectomized rats affects osteoclast formation and local factor production. *Bioelectromagnetics*, 2004; 25(2): 134-141.

Chang K, Chang WH, Tsai MT, Shih C. Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. *Connect Tissue Res*, 2006; 47(4): 222-228.

Childs SG. Stimulators of bone healing. Biologic and biomechanical. *Orthop Nurs*, 2003; 22(6): 421-428.

Ciombor DM, Aaron RK. Influence of electromagnetic fields on endochondral bone formation. *J Cell Biochem*, 1993; 52(1): 37-41.

Colson DJ, Browett JP, Fiddian NJ, Watson B. Treatment of delayed- and non-union of fractures using pulsed electromagnetic fields. *J Biomed Eng*, 1988; 10(4): 301-304.

Conflitti J, Graves M, Russell G, Tucci M, Benghuzzi H. Plating of rat femoral shaft osteotomies: report of a technique and preliminary results. *Biomed Sci Instrum*, 2003; 39: 278-283.

Cormack DH. *Essential Histology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997: p. 163-189.

Cornell CN. Osteobiologics. *Bull Hosp Jt Dis*, 2004; 62(1-2): 13-17.

Çetingül E. *Çene ve Yüz Travmatolojisi*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 2002: s. 17-53.

Çınar K. Elektromanyetik Alan. *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*, 2006; 80-81.

Chu TM, Sargent P, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Preliminary evaluation of a load-bearing BMP-2 carrier for segmental defect regeneration. *Biomed Sci Instrum*, 2006; 42: 42-47.

Cortet B, Merchandise X. Bone microarchitecture and mechanical resistance. *Joint Bone Spine*, 2001; 68: 297-305.

Darendeliler MA, Darendeliler A, Sinclair PM. Effects of static magnetic and pulsed electromagnetic fields on bone healing. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg*, 1997; 12(1): 43-53.

David R, Nissan M, Cohen I, Soudry M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. *Lasers Surg Med*, 1996; 19(4): 458-464.

De Barros Filho TE, Rossi JD, Lage Lde A, Rodrigues CJ, de Oliveira AS, Pinto FC, dos Reis GM, Rodrigues Júnior AJ. Effect of electromagnetic fields on osteogenesis: an experimental study on rats. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, 1992; 47(3): 128-130.

Delgado-Martínez AD, Martínez ME, Carrascal MT, Rodríguez-Avial M, Munuera L. Effect of 25-OH-vitamin D on fracture healing in elderly rats. *J Orthop Res*, 1998; 16(6): 650-653.

Delius M, Draenert K, Al Diek Y, Draenert Y. Biological effects of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone. *Ultrasound Med Biol*, 1995; 21(9): 1219-1225.

Delle Monache S, Alessandro R, Iorio R, Gualtieri G, Colonna R. Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce in vitro angiogenesis process in human endothelial cells. *Bioelectromagnetics*, 2008; 29(8): 640-648.

Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 2005; 36(12): 1392-1404.

Ding S, Peng H, Fang HS, Zhou JL, Wang Z. Pulsed electromagnetic fields stimulation prevents steroid-induced osteonecrosis in rats. *BMC Musculoskeletal Disord*, 2011; 12: 215.

Diniz P, Soejima K, Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide*, 2002; 7(1): 18-23.

Doğan H, Ozcelik B, Gedikoğlu G, Senel S. The effect of calcitonin on osseous healing in guinea pig mandible. *J Endod*, 2001; 27(3): 160-163.

Dwyer AF, Wickham GG. Direct current stimulation in spinal fusion. *Med J Aust*, 1974; 1(3): 73-75.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2005; 16(2): 129-138.

Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res*, 1995; 10(8): 1272-1281.

Einhorn TA. Current concepts review: Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Am*, 1995; 77(6): 940-956.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, 1998; 355: 7-21.

Elmali N, Ertem K, Ozen S, Inan M, Baysal T, Güner G, Bora A. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002; 26(4): 509-513.

Elster EA, Stojadinovic A, Forsberg J, Shawen S, Andersen RC, Schaden W. Extracorporeal shock wave therapy for nonunion of the tibia. *J Orthop Trauma*, 2010; 24(3): 133-141.

Erdem MA. Kemik defektlerinde elektromanyetik alanın iyileşme üzerine biyokimyasal ve histopatolojik etkilerinin deneysel olarak araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Prof. Dr. Çetin Kasapoğlu), 2006.

Erdoğan Ö. Düşük yoğunlukta kesikli ultrason uygulamasının mandibuler kırık iyileşmesi üzerine etkisi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, (Prof. Dr. Emin ESEN), 2007.

Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocr Rev*, 1986; 7(4): 379-408.

Eriksson C. Streaming potentials and other water-dependent effects in mineralized tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 1974; 238: 321-338.

Feitelson JB, Rowell PP, Roberts CS, Fleming JT. Two week nicotine treatment selectively increases bone vascular constriction in response to norepinephrine. *J Orthop Res*, 2003; 21(3): 497-502.

Fernandez MI, Watson PJ, Rowbotham DJ. Effect of pulsed magnetic field therapy on pain reported by human volunteers in a laboratory model of acute pain. *Br J Anaesth*, 2007; 99(2): 266-269.

Finì M, Giavaresi G, Carpi A, Nicolini A, Setti S, Giardino R. Effects of pulsed electromagnetic fields on articular hyaline cartilage: review of experimental and clinical studies. *Biomed Pharmacother*, 2005; 59(7): 388-394.

Fredericks DC, Nepola JV, Baker JT, Abbott J, Simon B. Effects of pulsed electromagnetic fields on bone healing in a rabbit tibial osteotomy model. *J Orthop Trauma*, 2000; 14(2): 93-100.

Fredericks DC, Piehl DJ, Baker JT, Abbott J, Nepola JV. Effects of pulsed electromagnetic field stimulation on distraction osteogenesis in the rabbit tibial leg lengthening model. *J Pediatr Orthop*, 2003; 23(4): 478-483.

Friedenberg ZB, Brighton CT. Bioelectric potentials in bone. *J Bone Joint Surg Am*, 1966; 48(5): 915-923.

Friedenberg ZB, Roberts PG Jr, Didizian NH, Brighton CT. Stimulation of fracture healing by direct current in the rabbit fibula. *J Bone Joint Surg Am*, 1971; 53(7): 1400-1408.

Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Physiol Soc Japan*, 1957; 12: 1158-1162.

Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B*, 2003; 70(2): 81-89.

Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1997: p. 114-130.

Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM*, 2004; 97(7): 385-395.

Giugni TD, Braslau DL, Haigler HT. Electric field-induced redistribution and postfield relaxation of epidermal growth factor receptors on A431 cells. *J Cell Biol*, 1987; 104(5): 1291-1297.

Gong ZY, Zhou SX, Gu XM, Li DC, Sun ML. Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor on angiogenesis during mandible fracture healing in rabbits. *Chin J Traumatol*, 2003; 6(4): 242-244.

González-Riola J, Pamies JA, Hernández ER, Revilla M, Seco C, Villa LF, Rico H. Influence of electromagnetic fields on bone mass and growth in developing rats: a morphometric, densitometric, and histomorphometric study. *Calcif Tissue Int*, 1997; 60(6): 533-537.

Gökçimen A. *Genel Tıbbi Histoloji*. Isparta: SDÜ Basımevi, 2006: s. 89-101.

Grace KL, Revell WJ, Brookes M. The effects of pulsed electromagnetic on fresh fracture healing: osteochondral repair in the rat femoral groove. *Orthopedics*, 1998; 21(3): 297-302.

Grana DR, Marcos HJ, Kokubu GA. Pulsed electromagnetic fields as adjuvant therapy in bone healing and peri-implant bone formation: an experimental study in rats. *Acta Odontol Latinoam*, 2008; 21(1): 77-83.

Griffin M, Bayat A. Electrical stimulation in bone healing: critical analysis by evaluating levels of evidence. *Eplasty*, 2011; 11: e34.

Griffin XL, Warner F, Costa M. The role of electromagnetic stimulation in the management of established non-union of long bone fractures: what is the evidence? *Injury*, 2008; 39(4): 419-429.

Grundnes O, Reikerås O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 1993; 64(3): 340-342.

Gupta AK, Srivastava KP, Avasthi S. Pulsed electromagnetic stimulation in nonunion of tibial diaphyseal fractures. *Indian J Orthop*, 2009; 43(2): 156-160.

Hanaoka T. The effects of pulsed micro-electrical currents on internal remodeling in long tubular bone and bone healing. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 1983; 57(2): 151-166. (Abstract)

Hannay G, Leavesley D, Pearcy M. Timing of pulsed electromagnetic field stimulation does not affect the promotion of bone cell development. *Bioelectromagnetics*, 2005; 26(8): 670-676.

Hannemann P, Göttgens KW, van Wely BJ, Kolkman KA, Werre AJ, Poeze M, Brink PR. Pulsed Electromagnetic Fields in the treatment of fresh scaphoid fractures. A multicenter, prospective, double blind, placebo controlled, randomized trial. *BMC Musculoskelet Disord*, 2011; 12: 90.

Harder AT, An YH. The mechanisms of the inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing: a concise review. *J Clin Pharmacol*, 2003; 43(8): 807-815.

Hastings GW, Mahmud FA. Electrical effects in bone. *J Biomed Eng*, 1988; 10(6): 515-521.

Heybeli N, Yeşildağ A, Oyar O, Gülsoy UK, Tekinsoy MA, Mumcu EF. Diagnostic ultrasound treatment increases the bone fracture-healing rate in an internally fixed rat femoral osteotomy model. *J Ultrasound Med*, 2002; 21(12): 1357-1363.

Hopper RA, VerHalen JP, Tepper O, Mehrara BJ, Detch R, Chang EI, Baharestani S, Simon BJ, Gurtner GC. Osteoblasts stimulated with pulsed electromagnetic fields increase HUVEC proliferation via a VEGF-A independent mechanism. *Bioelectromagnetics*, 2009; 30(3): 189-197.

Hsu RW, Tai CL, Chen CY, Hsu WH, Hsueh S. Enhancing mechanical strength during early fracture healing via shockwave treatment: an animal study. *Clin Biomech*, 2003; 18(6): 33-39.

Hulse D and Hyman B. *Textbook Of Small Animal Surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1993: p. 1785-1793.

ICNIRP. Guidelines for Limiting Exposure to Time-Varying Electric, Magnetic and Electromagnetic Fields. *Health Phys*, 1998; 74(4): 494-522.

Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwarzt JD, Chao EY. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *J Orthop Res*, 2002; 20(5): 1106-1114.

Isaacson BM, Bloebaum RD. Bone bioelectricity: what have we learned in the past 160 years? *J Biomed Mater Res A*, 2010; 95(4): 1270-1279.

Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech*, 2005; 50(5): 137-142.

Johnson KD, August A, Sciadini MF, Smith C. Evaluation of ground cortical autograft as a bone graft material in a new canine bilateral segmental long bone defect model. *J Orthop Trauma*, 1996; 10(1): 28-36.

Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology Text and Atlas*. McGraw-Hill Companies, 2009: p. 132-151.

Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*, 2001; 10(4): E1.

Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G, Bail HJ. An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech*, 2007; 52(6): 383-390.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*, 2002; 8(3): 147-159.

Katano M, Naruse K, Uchida K, Mikuni-Takagaki Y, Takaso M, Itoman M, Urabe K. Low Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Delayed Healing Process by Reducing the Time Required for the Completion of Endochondral Ossification in the Aged Mouse Femur Fracture Model. *Exp Anim*, 2011; 60(4): 385-389.

Kılıçoğlu SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *AÜTF Dergisi*, 2002; 55(2): 143-150.

Koivukangas A. Effects of long term clodronate administration on bone and on fracture healing in rat, with special reference to methodological aspects. University of Oulu, Division of Orthopaedics and Trauma Surgery, Department of Anatomy and Cell Biology and Department of Medical Technology, Doctorate Thesis, Oulu, (Prof. Heikki Kröger), 2002.

Kulak CA, Dempster DW. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2010; 54(2): 87-98.

Kusnierczak D, Brocai DR, Vettel U, Loew M. Effect of extracorporeal shockwave administration on biological behavior of bone cells in vitro. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 2000; 138(1): 29-33.

Külcü Geler D, Gülşen G, Altunok EÇ. Short-Term Efficacy of Pulsed Electromagnetic Field Therapy on Pain and Functional Level in Knee Osteoarthritis: A Randomized Controlled Study. *Turk J Rheumatol*, 2009; 24: 144-148.

Law HT, Annan I, McCarthy ID, Hughes SP, Stead AC, Camburn MA, Montgomery H. The effect of induced electric currents on bone after experimental osteotomy in sheep. *J Bone Joint Surg Br*, 1985; 67(3): 463-469.

Leisner S, Shahar R, Aizenberg I, Lichovsky D, Levin-Harrus T. The effect of short-duration, high-intensity electromagnetic pulses on fresh ulnar fractures in rats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2002; 49(1): 33-37.

Lin HY, Lu KH. Repairing large bone fractures with low frequency electromagnetic fields. *J Orthop Res*, 2010; 28(2): 265-270.

Lind M, Schumacker B, Søballe K, Keller J, Melsen F, Bünger C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand*, 1993; 64(5): 553-556.

Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 1998; 98(25): 2800-2804.

Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res*, 2005; 23: 1300-1307.

Luben RA, Cain CD, Chen MC, Rosen DM, Adey WR. Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79(13): 4180-4184.

Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone*, 2005; 36(5): 770-778.

Luppen CA, Blake CA, Ammirati KM, Stevens ML, Seeherman HJ, Wozney JM, Bouxsein ML. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances osteotomy healing in glucocorticoid-treated rabbits. *J Bone Miner Res*, 2002; 17(2): 301-310.

Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab*, 2010; 21(6): 369-374.

Marsh DR, Li G. The biology of fracture healing: optimising outcome. *Br Med Bull*, 1999; 55(4): 856-869.

Massari L, Fini M, Cadossi R, Setti S, Traina GC. Biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am*, 2006; 88(3): 56-60.

Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. *Clin Oral Implants Res*, 2000; 11(4): 354-360.

Matsunaga S, Sakou T, Ijiri K. Osteogenesis by pulsing electromagnetic fields (PEMFs): optimum stimulation setting. *In Vivo*, 1996; 10(3): 351-356.

McLeod KJ, Rubin CT. The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am*, 1992; 74(6): 920-929.

Meyer RA, Meyer MH, Tenholder M, Wondracek S, Wasserman R, Garges P. Gene expression in older rats with delayed union of femoral fractures. *J Bone Joint Surg Am*, 2003; 85(7): 1243-1254.

Midura RJ, Ibiwoye MO, Powell KA, Sakai Y, Doehring T, Grabiner MD, Patterson TE, Zborowski M, Wolfman A. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. *J Orthop Res*, 2005; 23(5): 1035-1046.

Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2nd Edition, London: BC Decker Inc, 2004: p. 371-382.

Muhonen A, Peltomäki T, Hinkka S, Happonen RP. Effect of mandibular distraction osteogenesis on temporomandibular joint after previous irradiation and hyperbaric oxygenation. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2002; 31(4): 397-404.

Morley P, Whitfield JF, Willick GE. Parathyroid hormone: an anabolic treatment for osteoporosis. *Curr Pharm Des*, 2001; 7(8): 671-687.

Muhsin AU, Islam KM, Ahmed AM, Islam MS, Rabbani KS, Rahman SM, Ahmed S, Hossain M. Effect of pulsed electromagnetic field on healing of experimental nonunion in rat tibiae. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 1991; 17(1): 1-10.

Ott SM. Histomorphometric measurements of bone turnover, mineralization, and volume. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008; 3(3): 151-156.

Ottani V, De Pasquale V, Govoni P, Castellani PP, Ripani M, Gaudio E, Morocutti M. Augmentation of bone repair by pulsed elf magnetic fields in rats. *Anat Anz*, 1991; 172(2): 143-147.

Otter MW, McLeod KJ, Rubin CT. Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, 1998; 355: 90-104.

Ozcelik D, Huthut I, Kuran I, Bankaoğlu M, Orhan Z, Mayda AS. Comparison of accuracy of three-dimensional spiral computed tomography, standard radiography and direct measurements in evaluating facial fracture healing in a rat model. *Ann Plast Surg*, 2004; 53(5): 473-480.

Ozkaya U, Kiliç A, Ozdoğan U, Beng K, Kabukçuoğlu Y. Comparison between locked intramedullary nailing and plate osteosynthesis in the management of adult forearm fractures. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2009; 43(1): 14-20.

Parfitt AM. Bone remodeling and bone loss: understanding the pathophysiology of osteoporosis. *Clin Obstet Gynecol*, 1987; 30(4): 789-811.

Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units (summary of proposed system). *Bone*, 1988; 9(1): 67-69.

Paterson DC, Lewis GN, Cass CA. Treatment of delayed union and nonunion with an implanted direct current stimulator. *Clin Orthop Relat Res*, 1980; 148: 117-128.

Paul CR, Nasar SA. *Introduction to Electromagnetic Fields* 2nd Ed, Singapore: McGraw-Hill Book Company, 1987: p. 1-36.

Pienkowski D, Pollack SR, Brighton CT, Griffith NJ. Low-power electromagnetic stimulation of osteotomized rabbit fibulae. A randomized, blinded study. *J Bone Joint Surg Am*, 1994; 76(4): 489-501.

Puricelli E, Dutra NB, Ponzoni D. Histological evaluation of the influence of magnetic field application in autogenous bone grafts in rats. *Head Face Med*, 2009; 5: 1-6.

Remedios A. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1999; 29(5): 1029-1044.

Rodriguez-Merchan EC, Gomez-Castresana F. Internal fixation of nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 2004; 419: 13-20.

Russell G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall J Jr, Ragab A, Benghuzzi H. Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg*, 2007; 20(4): 249-255.

Ryaby JT. Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, 1998; 355: 205-215.

Sarker AB, Nashimuddin AN, Islam KM, Rabbani KS, Rahman M, Mushin AU, Hussain M. Effect of PEMF on fresh fracture-healing in rat tibia. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 1993; 19(3): 103-112.

Satter Syed A, Islam MS, Rabbani KS, Talukder MS. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of bone fractures. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 1999; 25(1): 6-10.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, 1986; 205: 299-308.

Selvi F. Deneysel olarak oluşturulan kırıklara bifosfonat ilaç kullanımının etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Prof. Dr. Ayfer Kaynar), 2008.

Shankar VS, Simon BJ, Bax CM, Pazianas M, Moonga BS, Adebajo OA, Zaidi M. Effects of electromagnetic stimulation on the functional responsiveness of isolated rat osteoclasts. *J Cell Physiol*, 1998; 176(3): 537-544.

Sharrard WJ. A double-blind trial of pulsed electromagnetic fields for delayed union of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br*, 1990; 72(3): 347-355.

Shen WW, Zhao JH. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects BMD and local factor production of rats with disuse osteoporosis. *Bioelectromagnetics*, 2010; 31(2): 113-119.

Singh S, Saha S. Electrical properties of bone. A review. *Clin Orthop Relat Res*, 1984; 186: 249-271.

Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 2001; 10(2): 86-95.

Spadaro JA. Mechanical and electrical interactions in bone remodeling. *Bioelectromagnetics*, 1997; 18(3): 193-202.

Stewart KJ, Weyand B, van't Hof RJ, White SA, Lvoff GO, Maffulli N, Poole MD. A quantitative analysis of the effect of insulin-like growth factor-1 infusion during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *Br J Plast Surg*, 1999; 52(5): 343-350.

Stiffler KS. Internal fracture fixation. *Clin Tech Small Anim Pract*, 2004; 19(3): 105-113.

Stuermer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Utesch C, Mangal O, Zimmer S, Dullin C, Stuermer KM. Musculoskeletal response to whole-body vibration during fracture healing in intact and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 2010; 87(2): 168-180.

Şimşek S. Alendronat ve K1 vitamininin rat femural kırık kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta, (Yrd. Doç. Dr. Bilge Çadır), 2011.

Takano-Yamamoto T, Kawakami M, Sakuda M. Effect of a pulsing electromagnetic field on demineralized bone-matrix-induced bone formation in a bony defect in the premaxilla of rats. *J Dent Res*, 1992; 71(12): 1920-1925.

Temel Ö, Baysal U. Darbeli Elektromanyetik Alanlarla Tedaviye Yardımcı Biyomedikal Cihaz Geliştirilmesi. Elektrik Elektronik-Bilgisayar ve Biyomedikal Mühendisliği 13. Ulusal Kongresi ve Fuarı Bildirileri, 2009.

Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, Galiano RD, Bhatt KA, Baharestani S, Gan J, Simon B, Hopper RA, Levine JP, Gurtner GC. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *FASEB J*, 2004; 18(11): 1231-1233.

Tis JE, Meffert CR, Inoue N, McCarthy EF, Machen MS, McHale KA, Chao EY. The effect of low intensity pulsed ultrasound applied to rabbit tibiae during the consolidation phase of distraction osteogenesis. *J Orthop Res*, 2002; 20(4): 793-800.

Trock DH. Electromagnetic fields and magnets. Investigational treatment for musculoskeletal disorders. *Rheum Dis Clin North Am*, 2000; 26(1): 51-62.

Tuominen T, Jämsä T, Tuukkanen J, Marttinen A, Lindholm TS, Jalovaara P. Bovine bone implant with bovine bone morphogenetic protein in healing a canine ulnar defect. *Int Orthop*, 2001; 25(1): 5-8.

Ulukut Ö, Çömlekçi S, Özkaya U, Çınar K. Darbeli elektromanyetik alanın sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine etkileri, BİYOMUT 2005 Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı Bildiriler Kitabı, 89-91, İstanbul.

Usui Y, Zerwekh JE, Vanharanta H, Ashman RB, Mooney V. Different effects of mechanical vibration on bone ingrowth into porous hydroxyapatite and fracture healing in a rabbit model. *J Orthop Res*, 1989; 7(4): 559-567.

Vianale G, Reale M, Amerio P, Stefanachi M, Di Luzio S, Muraro R. Extremely low frequency electromagnetic field enhances human keratinocyte cell growth and decreases proinflammatory chemokine production. *Br J Dermatol*, 2008; 158(6): 1189-1196.

Wang CJ. Extracorporeal shockwave therapy in musculoskeletal disorders. *J Orthop Surg Res*, 2012; 7: 11.

Weinstein SL, Buckwalter JA. Çeviri A.Mümtaz Alpaslan. *Türk Ortopedi İlkeler ve Uygulamalar*. 6.baskı, İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi, 2009: s. 58-63.

Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H. Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg*, 2007; 20(3): 149-155.

Victoria G, Petrisor B, Drew B, Dick D. Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? *Indian J Orthop*, 2009; 43(2): 117-120.

Yablon IG, Cruess RL. The effect of hyperbaric oxygen on fracture healing in rats. *J Trauma*, 1968; 8(2): 186-202.

Yen-Patton GP, Patton WF, Beer DM, Jacobson BS. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*, 1988; 134(1): 37-46.

Zhang X, Zhang J, Qu X, Wen J. Effects of different extremely low-frequency electromagnetic fields on osteoblasts. *Electromagn Biol Med*, 2007; 26(3): 167–177.

Zorzi C, Dall'Oca C, Cadossi R, Setti S. Effects of pulsed electromagnetic fields on patients' recovery after arthroscopic surgery: prospective, randomized and double-blind study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2007; 15(7): 830-834.

EKLER

EK 1: Deneysel Hayvanları Uygunluk Sertifikası

KOBAY

deneysel hayvanları laboratuvarı a.ş.

Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'ndan Üretim, Kullanım ve Tedarik ruhsatı almış Türkiye'deki ilk ve tek özel üretim laboratuvarıdır.

Veteriner Hekim imzalı bu sertifika çalışmalarınızda kullanmak üzere almış olduğunuz laboratuvar hayvanlarının orijinlerine uygunluğunun sertifikasıdır.

Laboratuvar hayvanlarımızın sağlık kontrolleri laboratuvarlarımızda Veteriner Hekim tarafından yapılmaktadır. Klinik hastalık belirtileri ve parazitolojik hastalıklarla ilgili bulgular göstermemektedir.

Laboratuvar hayvanlarımız; deneysel çalışmalarda ve üretim sürecinde kullanılmamıştır.

Laboratuvar hayvanlarımıza; hayvanlarda ve insanlarda hastalık oluşturabilecek herhangi bir etkene karşı hiçbir aşılama ya da ilaç uygulaması yapılmamıştır.

Laboratuvar hayvanlarımızın anaçları SPF (Specific Patogen Free) olarak ithal edilmiş ve üretim sürecimiz de sahip oldukları özelliklerine uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvar hayvanlarımız uluslararası taşıma standartlarına uygun şekilde taşınarak size teslim edilmiştir.

- Üretim Numarası : 160610-1211-3525E
- Müşteri Numarası : İÇ01

KOBAY DENEY HAYVANLARI
LABORATUVARI SANAYİ VE TİCARET A.Ş.
İvedik Organize Sanayi 21. Cadde
520. Sokak No. 2/2 Yenimahalle/ANKARA
Osım V.D. 0534 4744

A. Beçim BUĞDAYCI
Veteriner Hekim
D.P. No: 7404



İ.O.S.B. 21. Cadde 520. Sokak No: 2-2 Yenimahalle - ANKARA
Tel: (0312) 394 70 94 GSM: (0534) 843 63 73
www.kobay.com.tr - bilgi@kobay.com.tr

EK 2: SDÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Kararı

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNV. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI



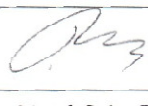

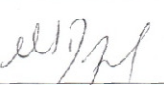
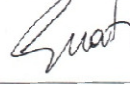
TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
18.05.2010	17	03

SDÜ, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 18 MAYIS 2010 tarihinde Saat 15:00'de toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

03-Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D.Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR'ın yürütücüsü olduğu Dt. Çağrı CAN, Yrd. Doç. Dr. Murat SEZAK, Teknisyen. Saadetin ÇÖLERİ' nin yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Sıçanlarda farklı şiddetteki darbeleri elektromanyetik alan uygulamalarının kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi" konulu çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Wistar Albino Sıçan	Erkek	60	9 Aylık

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU BAŞKAN	Yrd. Doç.Dr. Efkân UZ BAŞKAN YARDIMCISI	Prof.Dr. Fatih GÜLTEKİN ÜYE
KATILMADI		
Prof. Dr. M. N. ÇAKIR ÜYE	Doç. Dr. Sema BİRCAN ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR ÜYE
		KATILMADI
Vet. Hekim İsmail UZ ÜYE	Ecz. Mustafa Serhan DERYAL ÜYE	Vet. Hekim İshak Suat ÖVEY ÜYE
		

EK 3: SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolü

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

Toplantı Tarihi : 20.05.2010
Toplantı No: 2010/02

Proje No : 2173-D-10
Proje Yöneticisi : Yrd.Doç.Dr.Bilge ÇADIR
Yöneticinin Adresi : Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi
Proje Başlığı : Sıçanlarda farklı şiddetteki darbeli elektromanyetik alan uygulamalarının kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi.
Proje Bütçesi (TL) : 9.973,00
Proje süresi : Başlangıç Tarihi : 20.05.2010 Bitiş Tarihi: 20.05.2012 - 24 ay

İMZA
Doç.Dr.Mehmet KİTİŞ
B.A.P. Komisyon Bşk. V.

İMZA
Prof.Dr.Fatma Yeşim KIRZIOĞLU
Komisyon Üyesi

İMZA
Prof.Dr. Nevzat ÖZGÜR
Komisyon Üyesi

İMZA
Prof.Dr. Yıldırım SONGÜR
Komisyon Üyesi

İMZA
Prof.Dr. Mustafa KUŞÇU
Fen Bil.Ens.Müd./Kom.Üyesi

İMZA
Prof.Dr. Serpil DEMİRCİ
Sağlık Bil.Ens.Müd.Kom.Üyesi

İMZA
Doç.Dr. Süleyman SEYDİ
Sosyal Bil.Ens.Müd.Kom.Üyesi V.

İMZA
Prof.Dr.Vecihi KIRDEMİR
BAP Komisyon Başk.
(İZİNLİ)

İMZA
Doç.Dr. Ali Muhammet BAYRAKTAROĞLU
Güzel San.Ens.Müd.Yrd.Kom.Üyesi

İMZA
Doç.Dr. Ata Utku AKÇİL
Su Enstitüsü Müd.Kom.Üyesi

PROJE YÖNETİCİSİNE TEBLİGAT
Sayın: **Yrd.Doç.Dr.Bilge ÇADIR**
Süleyman Demirel Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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 :

Doç.Dr.Mehmet KİTİŞ
Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyon Başkanı V.



EK 4: SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı

S.D.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO
18.05.2010	17	02

02- Enstitümüz Ağız Diş çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi (0740308003) Çağrı CAN'ın Araştırma Projesi teklifi ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 17.05.2010 tarih ve B.30.2.SDÜ.0.04.00.01/301-02/392 sayılı yazısı ve eklerinin görüşülmesi.

Enstitümüz Ağız Diş çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi (0740308003) Çağrı CAN'ın Araştırma Projesi teklifi ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 17.05.2010 tarih ve B.30.2.SDÜ.0.04.00.01/301-02/392 sayılı yazısı ve ekleri görüşüldü.

Adı geçen öğrencinin tez konusu ile aynı olan "Sıçanlarda Farklı Şiddetteki Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulamalarının Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkisi" başlıklı proje uygun görülmüş olup, Araştırma Projeleri Yönetim Birimine teklifine,

Oy birliği ile karar verildi.

(İMZA) (İZİNLİ) (GÖREVLİ)
Prof. Dr.Serpil DEMİRCİ Yrd.Doç.Dr.Duygu K.DOĞUÇ Yrd.Doç.Dr.Elçin ESENLIK TOKLU
Enstitü Müdürü Enstitü Müdür Yardımcısı Enstitü Müdür Yardımcısı

(İMZA) (İMZA) (İMZA)
Doç.Dr.Ahmet KOYU Doç.Dr.Osman SULAK Yrd.Doç.Dr.Ferdi BAŞKURT
Üye Üye Üye

(İMZA)
Raportör
Erol KAYA
Enstitü Sekreteri



ÖZGEÇMİŞ

Ankara'da 18.04.1983 tarihinde doğdum. Ankara Abdi İpekçi İlkokulu'ndan 1994 yılında mezun oldum. Ankara Atatürk Lisesi'nden 2001 yılında mezun olarak aynı yıl İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne başladım. Üniversite eğitimimi 2006 yılında tamamladım. Askerlik görevimi takiben 2007 - 2008 öğretim yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD' nda Doktora eğitimime başladım.