

49889

T.C  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ORTOPEDİ ve TRAVMATOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**KEMİK GREFTLERİNİN REVASKÜLARİZASYONU**  
(Tavşanlarda Deneysel Araştırma)

T 49889

Tez Yöneticisi

**Doç.Dr. Erol YALNIZ**

(Uzmanlık tezi)

**Dr. Aziz KURTULUŞ**

Edirne - 1996

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalındaki uzmanlık eğitimim süresince yarattıkları hoşgörölü ve bilimsel ortam içersinde bana sundukları bilgi ve deneyimleriyle, yetişmemde emeği geöen hocalarıma sürekli sevgi ve yardımlarını gördüğüm ve beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve diğer tüm çalışanlara Anabilim Dalı Başkanı'mız ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Mişel Kokino'nun saygın ve yapıcı kişiliğinde ayrı ayrı teşekkürü bir borö bilirim.

Tez çalışmam sırasında da yardım ve deneyimleriyle yol gösteren değerli hocam Doö. Dr. Erol Yalnız'a, tez çalışmamda tavşan gözlerine yaptığımız cerrahi girişimleri bizzat üstlenerek yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Nazan Erda'ya, İris anjiografi çekimlerinde titiz ve uyumlu çalışmasıyla tezimin sonuçlanmasına büyük katkısı olan Uz. Dr. Ömer Benian'a ve tez çalışmamda emeği geçip adını yazamadığım tüm çalışanlara teşekkür ederim.

## **İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
<b>GİRİŞ ve TARİHÇE</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	5
<b>MATERYAL VE METOD</b>	23
<b>BULGULAR</b>	26
<b>TARTIŞMA</b>	43
<b>SONUÇ</b>	48
<b>ÖZET</b>	49
<b>KAYNAKLAR</b>	50

# KEMİK GREFTLERİNİN REVASKÜLARİZASYONU

## 1.GİRİŞ ve TARİHÇE

20. yüzyılda tıp alanında en önemli gelişmelerden birisi de organ transplantasyonudur. Kemik kandan sonra insan vücudunda en fazla transplante edilen dokudur (1).

Günümüzde kemik greftleri, infeksiyon, travma, tümör nedeniyle hasara uğrayan yada zayıflayan iskelet sisteminin kemik defektlerinin ortadan kaldırılması amacıyla kullanılmaktadır (2,3,4).

Kemik greftlerinin bu denli yaygın olarak kullanılmasının nedeni kemik defektlerini ortadan kaldırmasının yanısıra, osteojenik aktivitelerinin olmasıdır. Duhamel 1739 yılında ilk kez osteojenik aktiviteyi subperiostal yerleştirilen gümüş tel etrafında oluşan yeni kemik oluşumunu gözleyerek tanımlamıştır. 1763 yılında Von Haller periostun zengin bir vasküler yapısı olduğunu ve yeni kemik oluşumunun arterlerden meydana çıkan eksüdasyon sonucu oluştuğunu bildirmiştir. 1867 de Ollier periostun osteojenik aktivitesinin olduğunu ve en uygun greftlerin periost içeren greftler olduğunu yayınlamıştır (5).

1907-1911 yılları arasında Axhausen otogreftlerde periostun varlığının yüksek osteojenik aktiviteye neden olduğunu, allogreftlerde osteojenik aktivitenin az olduğunu, ksenogreftlerde ise osteojenik aktivitenin olmadığını belirtmiştir. Axhausen'e göre kemik transplantasyonu sonucu kemik ve kemik iliği ölür. Ancak osteojenik kapasiteye sahip periostun bir kısmı canlı kalır. Onarım ve yenilenme canlı kalan bu dokunun vaskülaritesiyle sağlanır. Histolojik olarak başlangıçta alıcının kemik iliğinden ya da çevre dokulardan köken alan fibriler bir yapıya sahip bir konnektif doku

oluşur. Bu doku hem alıcının, hem de greftin periostuna invaze olur. Alıcıdan grefte damarsal yapılar ulaşır. Rezorpsiyon ve yeni kemik oluşumu başlar. Axhausen bu durumu "schleichender ersatz" olarak tanımlamış ve alman literatürüne geçmiştir. Greftin revaskülerize olarak hem osteoklastik hem de osteoblastik aktiviteyi bir arada gösterdiği bu dönem ingilizce yayınlanan literatürlerde "creeping substitution" olarak geçmektedir (5).

1909 yılında Nakahara ve Dilger, 1911 de Sasaki, 1912 yılında Jakoi, kemik ve periosttan elde ettikleri emülsiyonlarda osteojenik aktiviteyi göstermişlerdir. 1949'da Heinen, 1952'de Ray kemik ve periostan elde ettikleri emülsiyonların osteojenik aktiviteyi artırdığını gözlemlemişlerdir (5).

Grohe 1899 yılında 0 ila -40 dereceler arasında 100 saat sakladığı periostun intramüsküler transplantasyonunda osteogenezisi göstermiştir. 1899'da Morpurgo 15 derecede insan periostunu 168 saat saklamış ve osteogenezisi göstermiştir. Saltkow 1900 yılında agar jelatin içersinde 2 ila -29 dereceler arasında saklanan fare periostununun 14 gün sonra da canlı olduğunu göstermiştir (5).

Zaman zaman kitlesele, osteokondral greftlere ihtiyaç duyulması ya da greft ihtiyacı olan hastanın yeterli kemik stoğunun bulunmaması gibi nedenler araştırmacıları allogreftleri araştırmaya yönlendirmiştir. Ancak allogreftlerin ihtiyaç olduğu anda bulunamaması nedeniyle kaynatma, dondurma, deproteinize etme, radyasyon gibi yöntemlerle allogreftleri saklayıp sterilize ederek kullanmışlardır.

İlk başarılı taze allogreft uygulaması 1878 yılında Macewen tarafından yapılmış, tibiadan elde edilen greft, humerus defektine başarıyla implante edilmiştir (5).

Bauer 1910 yılında 3 haftadan daha fazla dondurarak sakladığı köpek allogreft sonuçlarının tatminkar olduğunu yayınlamıştır. Tuffier 1910 yılında 5 gün süreyle dondurup saklanmış kemik greftlerini kliniğinde kullanmıştır. Daha sonraları Albee,

Smith ve Incan kullanmışlardır. Bush ve Wilson 1947 yılında -20 derecede dondurarak saklamanın prensiplerini ortaya koymuşlardır (5).

Tuffier 1901 yılında çok parçalı omuz kırıklı çıkığı nedeniyle humerus başını rezeke etmiş. Bundan etkilenen Judet 1906 yılında tavşanlarda diz eklemi rekonstruksiyonunda total ve parsiyel kitlesel allogreftler kullanmıştır. Herndon ve Chase 1952-1954 yıllarında otolog, taze allogreft ve saklanmış allogreftler kullanarak 129 köpeğe diz transplantasyonu uygulamışlar ve yeterince takip edebildikleri 56 tanesinin sonuçlarını yayınlamıştır. Dondurmanın immunolojik cevabı azaltığını belirtmişlerdir. Daha sonraları Curtiss dondurmanın immunolojik yanıtı azaltığını yayınlamışlardır. Bu yayınlar osteokondral greftlerin modern dünyada kullanımının yaygınlaşmasına yol açmıştır (5).

Tietze 3 parsiyel otolog metatarsofalangeal eklem transplantasyonu yapmıştır. Lexer 1908 yılında 5 total, 4 parsiyel allogreft eklem transplantasyonu yaptığını, total transplantasyonların 4 tanesinin dize, 1 tanesinin el bileğine yapıldığını, diz transplantlarından bir tanesinde sonucun kötü olduğunu elbileği transplantasyonu yapılan hastanın 5. haftadan sonra izlenemediğini ancak diğer 3 dizin 2 yıllık izlemlerinde dejeneratif görünümüne karşın fonksiyonel durumlarının iyi olduğunu yayınlamıştır. Bürkle de la Camp, Lexer'in 14 ve 16 yıl önce diz transplantasyonu yaptığı iki hastayı histolojik olarak incelemiş, artiküler yüzeyin fibrokartilajla kaplı olduğunu, meniskuslerin ve bağların ortadan kalktığını, kapsül içersinde aşırı kalsifikasyon olduğunu ancak tüm dokuların canlı olduğunu gözlemiştir (5).

Ülkemizde kemik greftleri ve kemik bankası üzerine ilk derleme 1955 yılında Kazım İsmail Gürkan ve Hayrullah Kocaoğlu (6) tarafından yazılmıştır. 1962 yılında Rıdvan Ege (7) yaptığı deneysel çalışmalarda taze ve -10 derecede dondurulmuş otogreft, allogreft, ksenogreftlerle vertebral füzyon yapmış ve sonuçlarını yayınlamıştır.

Otojen greftin şekil, büyüklük, miktar bakımından sınırlı olması, grefti almak için fazladan bir insizyona ve zamana ihtiyaç duyulması, greft alınan yerde hematoma,

kırılma, heterotopik kalsifikasyon gibi komplikasyonların oluşma riski, opere edilen bireyden osteokondral greft alınamaması, hekimleri allogreft kullanmaya yönlendirmiştir (8,9).

Günümüzde tümör cerrahisinde ulaşılan yeni bilgi ve deneyimler sonucu amputasyon ve radikal rezeksiyon endikasyonları azalmış, lokal geniş rezeksiyonlar tercih edilmeye başlamıştır. Bu durum ciddi rekonstrüktif girişimlere ihtiyaç doğurmuş, pahalı ve zor bir yöntem olan kemik bankacılığını gündeme getirmiştir. Ancak istenilen boyutlarda kemik sağlama zorluğu, olası immunolojik problemler ve kemik bankacılığı gibi pahalı bir yöntemle para ayıramayan sosyo ekonomik durumu düşük ülkelerde rekonstrüksiyon sorunu tümörlü bölümün eksize edilip otoklavizasyonundan sonra replante edilmesiyle aşılmaya çalışılmıştır ( 10, 11, 12, 13, 14).

Bu çalışmada amacımız, taze otojen, dondurularak saklanan allojen ve otoklavize edilmiş otojen greftlerin revaskülarizasyonu ve kemik indüsyonunu gözlemlemek ve karşılaştırmaktır. Bu amaçla kemik greftleri albino tavşanların gözlerinin ön kamarasına yerleştirilmiştir. Deneysel çalışmalarda göz deneğe zarar vermeksizin rahatlıkla direk klinik izlem yapılabilecek, anjioplastik cevap verme yeteneğine sahip bir organdır (15).

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **A. KEMİĞİN YAPISI**

Kemik mineral ve kollajen içeren yapısıyla vücudun iskelet desteğini sağlayan tek tip hücreler ve zengin ara maddeden oluşan özel bir bağ dokusudur (16,17,18). Ağırlığının %65-70'ni inorganik, %30-35'ni organik matriks oluşturur (16,19).

Kemik spongioz ve kortikal yapıdan oluşur. Spongioz kemik kemiğin iç kısmında yer alan birbirleriyle çaprazlaşarak stres çizgileri boyunca dizilen gevşek bir trabeküler ağdan oluşur. Kemiğin dış kısmında bulunan kortikal kemik ise aralarında zemin lamelleri bulunan havers sistemleri tarafından oluşturulmuştur. Zemin lamelleri kısmen rezorbe olmuş havers sistem artıklarıdır. Havers kanalları etrafında konsantrik olarak sıralanmış ardıl lameller vardır (16,17,18,21).

Havers sistemi kaniliküller aracılığıyla birbirleriyle ilişkidedir. Besleyici arterlerin geçtiği ve dal verdiği havers kanalları konsantrik lamellöz bir yapıyla çevrilidir. Lakünalarıyla osteosit içerirler. Volkman kanalları periostal, havers ve medüller kan damarlarını birleştirir (16,17,18).

Kemiğin dış kısmı, vasküler dokusu yoğun olan periost tarafından sarılır. Kemik medüllası, spongioz kemik boşlukları ve havers kanalları ince hücreli bağ dokusu olan endosteumla içten kaplanır(16,17,18).

#### **a. Kemik Hücreleri**

Morfolojik yapılarına, yerleşimlerine, orjinlerine, fonksiyonlarına ve potansiyellerine bakılarak yapılan araştırmalar sonucunda kemiğin

1. Osteoblast
2. Osteosit
3. Osteoklast
4. Kemik döşeme h creti olmak üzere dört grup hücre içerdiği gözlenmiştir (16, 19).

### **1. Osteoblast**

Periostun kambium tabakası ve endosteumda bulunan, lokal hareketli olmayan kemik matriks oluşumundan sorumlu, kemik yapıcı farklılaşmış bağ dokusu h cretidir. Pluripotansiyel mezenkimal hücrelerden geliştiği kabul edilmektedir (16,17,18,19).

Aktif fazda 20-30 mikron boyutlarında, küboid etrafı girintili çıkıntılı, stoplazmadan zengin, birbirlerine sitoplazmik çıkıntılar aracılığıyla tutunan hücrelerdir. Eğer sık olarak yan yana bulunurlarsa, bu uzantıları görülmez. Hücrenin bir tarafında çekirdek, diğer tarafında endoplazmik retikulum ve Golgi cihazı bulunur. Çok fazla sayıda endoplazmik retikulum mevcuttur. İnaktif dönemde uzun yassı iç şeklini alır. Aktivasyon döneminde boyut ve şekilleri değişerek hücresel elemanları çoğalır. Osteoblastlar bölünerek  oğalmazlar (16).

Osteoblastlar hem Tip I kollejeni (prokollagen) hemde başlangıçta mineralize olmamış kemiği (osteoid) oluşturan ara maddeyi salgılar ve matriks kalsifikasyonunda rol oynarlar.

Osteoblastlar uzunlamasına büyümenin yanısıra, enine büyümeyi sağlar. Yeni oluşan tabaka ile daha önce oluşmuş tabaka arasında büyüme çizgisi denilen birleştirici bir sınır gözlenir (16).

### **2. Osteositler**

Osteositler erişkin kemik hücreleridir. Osteoblastların sentez edip salgıladığı kemiğin organik hücreler arası maddenin çevresinde birikmesi sonucu bu madde içersinde hapis kalarak farklılaşmasıyla meydana gelirler (18).

Her osteosit hücrenin şeklini kalıp gibi saran bir boşluğa yani lakunaya yerleşmiştir. Osteositler matriks içerisinde düzenli olmayan 1 mikron çapında kıvrımlı bir yapı gösteren kanaliküller içersinden ince sitoplazmik uzantıları aracılığıyla komşu lakunalarda bulunan hücrelerle bağlantılar yapar ( 17,18).

Kemik matriksin devamlılığını ve matriks birikimini sağlar. Kan kalsiyumunun uygun seviyede kalmasına yardımcı olur (18).

### **3.Osteoklastlar**

Osteoklastlar kemik ve mineralize kıkırdak dokusunu rezorbe eden ve kemiğin yeniden şekillenmesini sağlayan çeşitli büyüklük ve sayıda çekirdek içeren dev hücrelerdir (17,18,19). Kemik rezorpsiyonun olduğu bölgelerde aktif olarak bulunurlar. Aktivasyonları sonucu Howship lakunası yada rezorpsiyon körfezi denilen kemik yüzeyindeki çukurlar oluşur. Ameboid hareketlidirler. Mitozla çoğalmazlar (18).

Osteoklastlar ya monosit ve makrofajların direk birleşmesinden ya monosit, makrofajların oluşumunda öncü rol oynayan hücrelerden yada onlardan bağımsız başka bir kök hücreden geliştiği düşünülmektedir (19).

Osteoklastların postmitotik mononükleer prekürsör hücrelerin birleşmesinden kaynaklandığı görüşü en çok kabul edilen görüştür (18,19). Bu hücrelerin çok çekirdekli şekilleri tekrar eden DNA replikasyonları ve hücre bölünmesi olmaksızın çekirdek bölünmesiyle yada bir çok öncü hücrenin füzyonuyla oluşur(18).

Kemikle komşu olan hücrenin bölümleri iki kısma ayrılır.

1.Fırçamsı kenar (Ruffled border): Hücrenin diğer kısımlarından daha koyu benekli olup rezorpsiyon bölümünde kemige bitişik parlak bant gibi görülür (17,18).

2.Berrak bölge (Clear zone): Fırçamsı kenarı kuşak gibi sarar.Sitoplazma çevresinde küçük bir halkaya benzer (17,18).

Osteoklastların görevi kemiğin mineral ve hücreler arası ara maddesini rezorbe etmektir. Kemik rezorpsiyonu fırçamsı kenarda ekzositoz ve endositoz mekanizmasıyla olur. Osteoklastlarda litik bir çok enzim mevcuttur.

Paratiroid hormon düzeyindeki artış kemik rezorpsiyonunu artırır ve osteoklastik aktivite üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Kalsitonin ise osteoklastik aktiviteyi azaltarak kemik yıkımını dengeleyici rol oynar (18).

#### **4.Kemik döşeme hücresi**

Erişkin iskeletinde kemik yüzeyini örten ince, uzun hücrelerdir. Çok az organelleri vardır. İnaktifler, rezorpsiyona ve değişime uğramaksızın kemik yüzeyini örterler. Sıklıkla birbirleriyle birleşir ve yarı birleşme yerleriyle osteositlere yakındırlar. Potensiyel osteoblastların kaynağı oldukları, kemik ve diğer ekstrasellüler sıvı kompartmanları arasında bariyer görevi gördükleri kabul edilmektedir (19,22).

#### **b. Periost ve Endosteum**

Periost parlak sarı beyaz renkli fibröz bir bağ dokusudur. Eklemler dışında kemiğin dış yüzeyini örter ve kemiğin çevre yumuşak dokularla ilişkisini sağlar. Periostun çevreye olan bağlılığı özellikle mukozaların doğrudan kemiğe yaslandığı yerlerde kuvvetlidir (17,18).

Periostun kollejen lifleri genellikle kemik yüzeyine paraleldir. Ligamanların ve tendonların kemiğe tutunma yerlerinde periostun karakteri değişir. Sharpey lifleri denen bu yapı, kalın kollejen lif kümelerinin doğrudan kemiğe tutunmasıyla oluşur ve periostun dairesel dış liflerine kadar uzanır. Bu liflerin görevi epifizle diafiz birleştiği, büyük kan damarlarının kemiğe girdiği, tendon ve kasların kemiğe yapıştığı yerlerde periostun kemiğe sıkıca bağlanmasını sağlamaktır (17,18).

Periost birbirleriyle sıkı ilişkide olan fakat, yapı bakımından farklı olan iki tabakadan oluşmuştur.

1. Dış tabaka (Stratum fibrosum) hücre ve damardan fakir olup, ince kollejen fibrillerinin oluşturduğu örgüden oluşur. Ekleme yakın bölgede perikondrium içersinde dağılır. Dış tabakada büyük damarlar vardır ve asıl mekanik tabakayı oluşturur.

2. İç tabaka (Kambium tabakası) hücre ve damardan zengin olup, ince kollejen fibril demetlerinden oluşmuştur. Hücreden zengin iç tabaka osteoblastlar ve uyarıldığında osteoblastlara dönüşen fibroblastlardan ayırd adilemeyen hücreler içerir (18).

Endosteum sıklıkla bir hücre kalınlığında hücresel bağ dokusudur. Medülla boşluğunu, spongios kemik trabeküllerini ve havers kanallarını döşer. Endosteum kemik oluşumunu sağlayan ve rezorbe eden hücrelerle, uygun uyarılar altında bu hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip hücreler içerir. Endosteum osteojenik olmasının yanısıra hemapoetik özelliğide vardır. Bu özellikleriyle kemiğin büyüme ve rejenerasyonunda görev alır (17,18).

### **c. Kemik matriksinin içeriği**

#### **1. Kemik matriksin organik içeriği**

Organik matriksin en bol proteini Tip 1 kollejendir. Osteoblastlar tarafından sentezlenir. Az miktarda tip 2, 3, 5, 10 kollagen bulunmakta ancak bunların daha çok damarsal ve kırıldak kökenli olduğu düşünülmektedir. Kemik matriksinin %90 kollajen %10 ise diğer proteinler tarafından oluşturulur (16, 20, 23, 24).

Osteonektin, kemiğin en bol non kollejenöz proteindir. Osteoblastlar ve fibroblastlar tarafından sentezlenir.

Ostekalsin (Kemik Gla protein) hem kemikte hemde plazmada bulunan kollejen olmayan proteindir. Plazma seviyesi kemik sentezinin artmasıyla yükselir. Plazma seviyesi osteoblastik aktivitenin göstergesidir. Osteokalsin sentezi K vitamin antagonistleri varlığında azalır (19).

Matriks Gla protein erken dönemde iskelet gelişiminde önemli rol oynar (19).

Proteoglikan 1 ve 2 hem protein içeriği hemde kendilerine bağlanan kondrotin sulfat yan zincirinin bağlanma farklılıkları nedeniyle ayrı iki proteoglikandır. Kemik mineralizasyon bölgelerinde yoğunlaşarak kemiğin direncini artırır (19).

Siyalik asitten zengin iki protein siyaloprotein 1 ve 2 olarak isimlendirilir. Siyaloprotein 1 sadece kemikte bulunur ve hidroksiapatitle sıkı bir şekilde bağlanır. Kemikte mineraller hücreler arasında köprü olarak görev yaptığı düşünülmüş ve osteopontin olarak da isimlendirilmiştir.

Kemik morfojenik protein yeni kemik oluşumunu indükleyen iki fraksiyondan oluşmuş 38-k Da olan bir glikoproteindir. İlk kez Urist (24, 25, 26, 27) tarafından izole edilmiştir. Kemik dokusu yıkıldığında ortaya çıkmakta mezenkimal hücreleri etkileyerek osteoprogenitör hücreler olarak çoğalması için uyarıda bulunmaktadır. Kollejenaz enzimine duyarlıdır.

Ayrıca kemik matriksinde kemik, kırık, trombosit, fibroblast büyüme faktör kökenli altı adet büyüme faktörü izole edilmiştir.

## **2. Kemik matriksin inorganik içeriği**

Kemiğin kuru ağırlığının %65-70 inorganik mineraller, bunların da %96 sıvı katı kalsiyum ve fosfat oluşturur (23).

Kemiğin inorganik bileşenleri amorf kalsiyum fosfat, hidroksiapatit kristalleridir (23). Kimyasal incelemelerde kalsiyum, fosfat, magnezyum, hidroksil, karbonat ana iyonları saptanmıştır (29). Ayrıca kemikte eser miktarda magnezyum, potasyum, sodyum, çinko, manganez, molibden, flor bulunmaktadır. Kemik amorf kalsiyumfosfatın olası formülü  $Ca HPO_4 \cdot 2H_2O$  veya  $Ca_3(PO_4)_2 \cdot 3(H_2O)$  şeklindedir (23).

### 3. Su

Hem intersitisyel, hem de hidroksiapatit kristalleri içesinde bulunduğu gibi ekstrasellüler olarak kemik içindeki boşluklarda, havers sistemi içersinde besleyici kanallarda kollegen lifleri arasında ultramikroskopik kanallarda bulunurlar (16). Yaş ile birlikte kemikte su miktarı azalır.

Su kalsiyum, sodyum, fosfat gibi bir çok iyonun hareketliliğini, hidrasyonunu ve diffüzyonunu sağlar. Matriks kalsifikasyonunda kalsiyum iyonlarının değişimi veya diffüzyon hızını yavaşlatarak rol oynar (16).

## B. KEMİĞİN KANLANMASI

Kan dolaşımı kemik canlılığının devamı için gereklidir. Böylelikle osteogenezis yani kırık tamiri ve büyüme gerçekleşir. İnsanlarda iskelet sistemi kan akımının, kalp atım volümünün %5'i olduğu saptanmıştır (28,29,30,31). Kan akımının düzenlenmesinde nöral, hormonal, lokal ve sistemik faktörler etkili olmaktadır (31,32,33).

Kemiğın çeşitli bölümlerinde olan kan akımı oranlarında farklılıklar bulunur. Kemik kanlanma bölgeleri çoktan aza doğru inferior metafiz, kemik iliği, süperior metafiz, inferior epifiz ve korteks olarak sıralanır (29, 32).

Tübüler kemiklerde arterial kan akımı

1. Nutrisyen arterler

2. Metafizer arterler

3. Periostal arterler yoluyla olur (18, 32). Kemik dolaşımının %70'i nutrisyen, %30'u epifizo-metafizer ve en düşük oranda periostal arterler aracılığıyla sağlanır (29, 35).

Metafizler arterler metafizin kanlanması sağlarlar ve medüller arterle anastomoz yaparlar. Korteks kanlanmasının büyük bir kısmını endosteal sistem gerçekleştirir (18, 32, 34).

Periostal arterler, normal kemik korteks kanlanmasının küçük bir bölümünü sağlarlar. Korteksin dış yüzünde yeni Havers sisteminin gelişmesi için gereklidir (18, 32). Kaymış kırıkların iyileşme döneminin başlangıcında çevre yumuşak doku damarlarıyla desteklenen periostal damarlar, kan akımının büyük bir kısmını sağlar ve kırık bölgesinde yeni kapiller tomurcukların oluşmasına yardım eder (32, 36, 37, 38).

Diafiz korteksi kan akım yönü endosteal sistemden periostal sisteme doğrudur. Bu akım yönü kırık sonrası tersine döner (32, 36, 37).

Kemiği besleyen damarlar arasında anastomozlar vardır. Bunlar metafizler arterler arasında, periostal arterial sistemle medüller sistem arasında anastomozlardır. Bu anastomozlar kırık sonrasında vasküler yapının yeniden düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (18, 32).

Kemiğin drenajı nutrisyen foraminalara, diafiz kemik dokusuna ve periostun dışına doğru giden damarlarla gerçekleşir. Bunlarda nutrisyen arterlerin venleri, kortikal venöz kanallar, periostal kapillerlerdir (18, 32).

### **C. KALSİFİKASYON**

Kemiğin mineralizasyonu hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki bölümde gerçekleşir. Birinci bölümde, osteoblastlar hakimdir. Kemik matriksin asıl komponenti oluşturulur. Osteoblastlar tarafından Tip 1 kollajen (prokollajen) sentez edilerek ekstrasellüler kalsifikasyon bölgelerinde birikir (16, 20, 23).

Kollajen fibriller üst üste gelerek katlanırlar ve bir sarmal oluştururlar. Bu fibriller lameller matriks içersinde kendilerine yakın mineral lamellerine paralel olacak

şekilde organize olurlar. Aralarında belli aralıklarla inorganik maddelerin yerleşmesi için boşluklar oluşturlar. Bu boşluklara hole zone adı verilir (16, 20, 23.).

Proteoglikanlar birlikte buldukları kollejen liflerine etki ederek formasyon hızını, mineral bölgesinin konsantrasyonunu, mineralizasyonun düzenlenmesini etkilerler (19).

İkinci bölümde ise, kalsifikasyon bölgelerine kalsiyum ve fosfatın depolanmasıyla çekirdek oluşur. Çekirdek bölgeden başlayarak minerallerin üstüste eklenmesiyle kalsifikasyon tamamlanır (20).

#### **D. KEMİK GREFTLERİNİN BİYOLOJİSİ**

Urist ve Silverman (24) kemik greftlerinin alıcı kemikle birleşmesini yani inkorporasyonu, donör ve alıcının yeni kemik dokusuyla kaplanıp birleşmesi olarak tanımlamış ve bunun oluşumunu beş bölüme ayırmıştır.

1. bölüm, dakika ve saatler içerisinde gerçekleşir greft yatağında enflamasyon ve osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonu olur. 2. ve 3. Bölüm, 1-7.günler arasında gerçekleşir. Bu dönemde kemik greftindeki matriksten köken alan Bone Morphogenic Protein (BMP) kemik yatağında osteoindüktif bir cevaba neden olur. 4.bölüm, osteokondüktif dönem olarak adlandırılır. Bu dönemde greftin revaskülarizasyonu gerçekleşir ve 'creeping substitution' denilen yeni kemik oluşumu ve nekrotik oluşumların birlikte gözlemlendiği aylar boyunca süren aktif dinamik iyileşme sürecini içerir (40). 5. bölüm ise, 2-20 yıl boyunca süren kemigin mekanik direnç kazandığı zaman dilimidir. Inkorporasyon için tanımlanan bu süreç alıcının kemik yaşına, kemiğin metabolik aktivitesine göre değişmektedir (41).

Osteoindüksiyon mezankimal hücrelerin kemik matriksiyle karşılaştıktan sonra farklılaştığı dönemi içerir. BMP kontrolü altındadır (42).

Reddi (43) osteoindüksiyonun en önemli fazının kemotaksis, mitozis ve diferensiasyon olduğunu belirtmiştir. İmplant edilen greft çevre dokulardan lökosit migrasyonuna neden olur. Greft üzerine kemotaktik ve mitojenik olan, kollejen ve fibrine afinitesi olan 450 kilodalton büyüklüğünde plazma fibronektini bağlar. Kemotaksisi takiben greft üzerinde mezankimal hücreler prolifer olmaya başlar. Bu durumu Rath ve Reddi (44) kemik matriksin lokal mitojen olduğunu göstererek açıklamıştır. Bu mitojenik aktivite DNA sentezini varlığının belirlenmesiyle ortaya konulabilir. Mitojenik fazı takiben kırıldak dokusu oluşumu, vasküler invazyon ve kemik dokusu gelişimi, kemik remodelizasyonu kemik iliği oluşumu gözlenir. (Tablo 1) (43).

Ostekonduksiyon alıcıdan, transplante edilen materyale doğru ilerleyen damarlar aracılığıyla osteoprogenitör hücrelerin nakil edilmesidir. Bu materyel cam, seramik, plastik gibi biyolojik olmayan maddeler olabilir. Otoklavize, deproteinize, dondurulmuş, dondurulmuş kurutulmuş kemik gibi canlılık özelliğini kaybetmiş materyal olabileceği gibi, taze vasküler veya vaskülerize olmayan greftler de olabilir. Kısacası osteokonduksiyon alıcıdan transplante edilen materyale uzanan pasif bir yeni kemik oluşumdur (9). Osteokonduksiyon canlı kemik greftlerinde osteoindüktif etki nedeniyle, yaşamayan ya da biyolojik olmayan greftlere göre daha kolay gerçekleşir (45).

## E. BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Hücrel değişiklikler biyokimyasal değişikliklerle birlikte gerçekleşirler. İlk 3 günlük mezenkimal hücre artımı hücre içi DNA'ya (<sup>3</sup>H)-timidin girişi ve greft üzerinde ornitin dekarboksilaz aktivitesinin artışıyla, kırıldak indüksiyonu kırıkdağa özgün proteoglikan ve Tip 2 kollagen içersine <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> girişiyle, yeni kemik oluşumu <sup>45</sup>Ca alımı ve alkalen fosfataz aktivite artışıyla, kemik remodelasyonun göstergesiyle aril sülfataz ve asit fosfataz enzimlerinin artışıdır. Kemik iliği oluşumundaysa demirin hem içersine girişi ölçü birimi olarak kullanılmıştır (46).

İndirek immunofloran yöntemiyle farklı zamanlarda yapılan incelemelerde mezenkimal hücre proliferasyonu sırasında Tip 3, kırık oluşumu sırasında Tip 2, vasküler invazyon sırasında Tip 4, kemik oluşumu sırasında Tip 1 kollejen sentezlendiği saptanmıştır (46).

**Tablo 1:** Kemik indüksiyon basamakları

1.dakika	Pıhtı oluşumu ve trombosit açığa çıkması	Fibrin ağı oluşması ve trombosit büyüme faktörü serbestleşmesi
1.saat	PMN(Polimorf nüveli lökositlerin) kemotaksisi	Kollejenaz, elastaz gibi proteolitik enzimlerin serbestleşmesi.
3-18. Saatler	PMN sayısal artışı ve birleşmesi	Sınırlı proteoliz ve fibroblastlar için kemotaktik faktör salgılanması.
1.gün	Fibroblast kemotaksisi	Fibronektin peptidlerinin salınımı ve hücre hareketlerinin artışı.
2.gün	Fibroblast kemotaksisi devam eder	Nükleik asit ve protein sentezi başlar ve büyüme faktörleri salgılanır.
3. gün	Hücre proliferasyonu	DNA içersine <sup>3</sup> H-timidin yerleşmesi ve ornitin dekarboksilaz aktivitesinin artışı.
5. gün	Kondroblast oluşumu[D1]	Proteoglikanlar içersine SO <sub>4</sub> alımı artar.Tip 3 kollagen sentezi olur.
7. gün	Kondrosit ortaya çıkar, matriks sentezi ve sekresyonu olur.	Tip 2 kollagen ve kırıkdağa özgün proteoglikan sentezi.
9.gün	Kondrositlerin hipertrofisi  Kırıkda matriksinin kalsifikasyonu Vasküler invazyon	Alkalen fosfataz aktivite artışı ve Ca absorpsiyonu Tip 4 kollagen sentezi laminin sentezi
10-12. Gün	Osteoblast oluşumu, Kemik oluşumu ve mineralizasyonu	Tip 1 kollagen sentezi Kemik proteoglikanlarının sentezi.Alkalen fosfataz ve Ca absorpsiyonunun en üst seviyeye ulaşması.
12-18. Gün	Osteoklastik aktivite ve kemik remodelasyonu	Asit fosfataz, aryl sulfataz, glukorinidaz gibi lizozomal enzimlerde artış.Osteokalsin içeriği olan karboksiglutamik asit artışı. Kollejenaz ve proteazların serbestleşmesi.
21. gün	Kemik iliği oluşumu	Tip 3 kollejen sentezi. Hem içersine Fe girmesi ve lizozomal enzimlerin depolanması.

## **F. OTOJEN KEMİK GREFLERİN ONARIMDA BİRİNCİ DÖNEM**

Kortikal ya da spongioz greftler onarım fazının ilk dönemlerinde benzer özellik gösterirler. Birincil olarak hem kortikal hem de spongioz kemik grefti üzerinde kanlanma eksikliğini giderebilmek için bir kan pıhtısı oluşur. 1. hafta içerisinde transplant etrafı diffüzyonla beslenebilmesi için sıvıyla çevrili, alıcıdan damarlar uzanan inflamatuvar bir merkez görünümündedir. Damarlar ilk iki gün içerisinde greftin çevresini sarar daha sonrada greft içersine girer. Bu süreç iki haftada tamamlanır (47, 48).

Diğer bir revaskularizasyon şekli ise saatler içerisinde gerçekleşen uç uca anastomozdur ve spongioz greftlerde gözlenir (47). Plazma hücreleri, osteoklastlar, polimorf nüveli lökositler transplantı sararlar. İkinci haftadan itibaren enflamasyon azalır, fibröz ganülasyon dokusu oluşur ve osteoklastik aktivite artar (41). Osteoklastlar transplantasyonun 4. gününde sonra ortaya çıkarlar ancak 10.günde çok belirgin şekilde artmış olarak gözlenirler. Bu hücreler otolize uğrayan osteositleri ortadan kaldırarak yeni hücrelerin yerleşebileceği boş havuzlar oluştururlar. Alıcıdan grefte uzanan damarlar haversiyen kanallar aracılığıyla kemik iliğine ulaşır ve kemik iliği makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır (50). Kapiller invazyonla canlı kalabilmiş olan endotelial hücreler kemik iliği boşluğunda mezenkimal hücrelerle çoğalmaya başlar. Bu arada greft üzerinde diffüzyonla beslenerek canlı kalmış bazı osteositler invaze olmuş bu kapillerlerle beslenmeye başlar (48). Bu dönem yaklaşık olarak iki hafta kadar sürer (48).

## **G. OTOJEN KEMİK GREFTLERİNİN ONARIMINDA İKİNCİ DÖNEM**

Kortikal kemik greftleri revaskularizasyon zamanı uzunluğu, revaskularizasyon oran azlığı, onarımın tam olmaması gibi nedenlerden dolayı onarımın ikinci döneminde spongioz kemik greftlerinden farklıdır. Spongioz greft içerisindeki kemik iliği transplantasyondan sonra ölür. Yeni damarların kemik içine invazyonu için trabeküllerin sınırladığı geniş kanallar oluşur (47, 48, 51). Hatta trabekül sayısının

onarım yüzdesini belirlediği söylenmiştir (48). Bazı yazarların otojen kemik greftlerinin revaskülarizasyonunun uç uca anastomozlar oluşturarak ortaya çıktığını söylemesine karşın revaskülarizasyon primer olarak alıcıdan gelişen damarların kemik iliği boşluğuna ilerleyerek yerleşmesiyle oluşur (47, 48, 52, 53). Spongioz greft sıklıkla iki gün içerisinde damarlarla çevrilir ve iki hafta içerisinde revaskülarizasyon tamamlanır (48).

Vasküler invazyonla birlikte mezankimal hücreler osteojenik hücrelere dönüşür (54). Bu osteojenik hücreler öncelikle osteoblasta farklılaşarak ölü trabeküller ortasına yerleşir (55). Radyolojik olarak bu dönemde radyodansitenin artışı gözlenir. Ölü kemik dokusunun ortadan kaldırmak üzere osteoklastik aktivitenin başlamasıyla birlikte radyodensite yavaş yavaş azalır. Aynı anda greft üzerinde hemopoetik kemik iliği elemanları çoğalmaya başlar (55). Zaman içerisinde ölü kemik canlı kemikle tamamen yer değiştirir.

Kortikal kemik greftlerinin iyileşmesinin spongioz kemik greftlerinden farklı olmasının nedeni histolojik olarak farklı olmasıdır. Kortikal kemik sıklıkla 6. günden önce damarlar tarafından penetre edilemez (56). Tamamen revaskülarizasyon ise 2 aydan önce tamamlanmaz (48). Kortikal kemik greftlerinde vasküler penetrasyon öncelikle periferik osteoklastik aktivite sonucu volkman kanallarına oradanda haversiyen kanallara ulaşarak gerçekleşir (47, 48). Revaskülarizasyon gecikmesinin, uç uca anastomozların oluşmasına yardımcı olan endosteal hücrelerin azlığında bağlı olabileceği belirtilmiştir (49). Çünkü spongioz kemik greftlerinde diffüzyonla beslenerek canlı kalabilen hücreler uç uca anastomoz şansını artırmaktadır (48). Kortikal greftlerdeyse revaskülarizasyonun başlangıçta periferik olması inferior korteksin revaskülarizasyonun zayıf olması "creeping substitution" sürecini uzatmaktadır (41).

Kortikal kemik greftlerinde osteoklastik aktivite 0 ile 6. haftalar arasında yükselir, 1. yıldan sonra ise yavaş yavaş normal seviyesine iner (41). Rezorbsiyonun ilk iki haftasında nekrotik haversiyen kanallar ve interstisyel lameller ortadan kaldırılır. Daha sonraki 4 haftalık dönemde internal kortikal bölgede belirgin bir nekrotik lameller

çıkarmaksızın haversiyen kavite genişletilir ve osteoblastları yerleştiği boşluklar oluşturulur (40).

Kortikal kemik greftlerinde onarım fazı ilk 12 haftası osteoklastik aktiviteyle geçer (57). "Creeping substitution" greftin uzun aksına paralel ve dik olarak devam eder. Bu iyileşme en belirgin olarak alıcı ve greftin birleşim yerinde gözlenir ve greftin ortasına doğru ilerler (58).

Köpek fibulası kullanılarak yapılan bir çalışmada nekrotik ve yeni kemik doku oranının 2 hafta ile 6 ay arasında sürekli arttığını, 6 ay ile 2 yıl arasında bu oranın pek fazla değişmediğini, ancak spongioz kemiğin tamamen canlı olduğu gözlenmiştir (41).

Kortikal greft çalışmalarında konsolidasyonun alıcının ve greftin kontak uçları arasında başlamasını fizyolojik yüklenmelerin kemik oluşumu üzerine olumlu etkisine bağlamışlar ve metabolik hızı yüksek olan iskelet sisteminde greft onarımının daha hızlı olduğunu gözlemişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda kemik oluşumu için yeterli oksijen ve kompresyon gerekliliğini işaret etmiş; düşük oksijende kırıldak oluşumu, artmış oksijenasyonda fibröz doku oluşumu gözlenmiştir (59).

## **H. KEMİK GREFTLERİNİN MEKANİK DİRENCİ**

Kemik greftlerinin direncini onarım fazı belirler. Spongioz greftlerde onarım yeni kemik oluşumu direkt nekrotik kemik üzerine olur. Daha sonrada nekrotik kemik rezorbe edilir. Yeni kemik oluşumuyla nekrotik kemiğin birarada oluşu spongioz kemikte direncini etkilemez (41).

Kortikal kemik greftlerinde onarım fazı spongioz greftlerin tersine osteoklastik aktiviteyle başlar. Bu da kemikte kitle ve radyodensite azalmasıyla karakterizedir. Sonuç olarak kemik greftinin mekanik direncinde azalma gözlenir (40). Kortikal kemik ile yapılan araştırmalarda ilk 6 haftayla 6 ay arasında porozitenin arttığı kortikal kemik

greftinin direncinin normal kemiğe göre %40 azaldığı daha sonraki 1-2 yıl içerisinde greftin normal kemik direncine ulaştığı gözlenmiştir (41).

Deneysel çalışmaların verileri klinik uygulamalarda tetrasiklinle işaretleyerek mikroradyografik yöntemlerle ya da histolojik gözlemlerle korelasyonu araştırılmış ve onarımın benzer ancak daha uzun bir süreçte gerçekleştiği gözlenmiştir (57). Mekanik direnç ilk 6 ayda maksimum olarak azalmakta ancak normal kemik direncine 2 yıldan önce ulaşmamaktadır. Yorgunluk kırıkları 6 ile 18 ay arasında sıklaşmaktadır (40).

Ancak onarım fazı fizyolojik onarım kapasitesine, yaşa greftin tipine, boyutuna, lokalizasyonuna göre farklılıklar gösterir (40).

## **I. ONARIMA GREFT ve ALICININ KATKILARI**

İnkorporasyon, alıcı hücreleri ve greft üzerinde canlı kalan hücreler aracılığıyla gerçekleşir (47, 54). Onarımda görev alan hücrelerin ne kadarının grefte ne kadarının alıcıya ait olduğu kesin olarak bilinmemektedir (40). Ancak grefte ait osteojenik hücreler 4 bölge aracılığıyla transplante edildiği düşünülmektedir.

**a. Periost:** Bir çok çalışmada özellikle periostun kambium tabakasında osteogenezis yeteneğine sahip hücrelerin bulunduğu ve transplantasyon sonrası canlı kalanlar olduğu gösterilmiştir (47, 55). Periostsuz transplante edilen greftlerde alıcı ve greftin inkorporasyonunda gecikme, kallus formasyonunda azalma, “creeping substitution” yani internal onarımda gecikme gözlenmiştir. Eksperimental çalışmalarda periostun yeni kemik oluşumunun %30 nu sağladığı gösterilmiştir (55).

**b. İntrakortikal zon:** Bazı osteositler transplantasyondan sonra kanaliküller aracılığıyla difüzyonla beslenerek canlı kalabilmektedirler (48). Yapılan in vitro çalışmalarda bazı osteositlerin greft üzerinde 24 saatten daha fazla canlı kaldığı gözlenmiştir (60). Osteositler çoğalma yeteneğine sahip olmayan hücreler olmasına karşın onunla birlikte transplante edilen osteojenik kapasitesi olan hücrelerin canlı kalma olasılığı ortaya çıkar (61). Bu hücreler preosteoklast ya da preosteoblast olabilirler (62). Ayrıca endotelial hücreler, intrakortikal mezenkim yeni kemik oluşumunda rol oynayabilir (61).

*c.Endosteum ve kemik iliği:* Endotelial hücreler ve kemik iliği transplantasyondan sonra yeni kemik oluşturma yeteneğine sahiptirler (54, 55 ). Ancak endosteal hücreler kemik iliğine oranla yeni kemik oluşturmada daha önemli rol oynarlar (49). Burwell'e (63, 64) göre nekrotik kemikten bir madde açığa çıkar. Bu mezankimal hücrelerin osteoblastlara dönüşmesini indükler. Kemik matriksinde iki tip indüklenebilen osteojenik prekürsör hücre olduğunu ileri sürülmüştür. **A)**Determinan osteojenik prekürsör hücreler (DOPC) bu hücreler kendi kendine çoğalma yeteneğine sahiptir ve sadece kemik iliği ve kemik yüzeyinde bulunurlar. **B)**İndüklenebilen osteojenik prekürsör hücreler bağ doku ve dolaşımda bulunurlar (65,66).

*d.Alicının inkorporasyona katkıları:* Alıcı transplante edilen grefti inert olarak kabul eder. Tüm hücrel faaliyetleri grefte canlı kalan hücrelerle benzerlik gösterir. Alicının yaşı, greftin yerleşim yeri önemlidir (40).

## **J. ALLOGREFTLER ve ALICILARIN ALLOGREFTLERE YANITI**

Otojen greftlerin yeterli olmadığı durumlarda, masif osteokondral greft ihtiyacında, ek bir cerrahi insizyonun istenmediği durumlarda, greft yerinde zayıflamaya neden olmamak ve greft alınan bölgede kanama, enfeksiyon gibi risklerle karşılaşmamak için allogreftler önerilmiştir (9).

Ancak klinik ve deneysel çalışmalarda otogreftlerin allogreftlerden üstün olduğu gözlenmiştir. Otogreftler kendi başlarına onarımlarını sağlayabildikleri halde allogreftlerde alıcı ve greftin farklı genetik yapıda olmaları nedeniyle bu mümkün değildir. Allogreftlerdeki bu doku uyumsuzluğu, otojen greftlere oranla daha uzun bir onarım sürecini gerektirmektedir (67) .

Alicının kıkırdak ve kemiğe cevabı diğer organ transplantasyonlarında olan reaksiyonlardan farklı değildir. Ancak bu reaksiyonların ortaya koyduğu tablo implante edilen organın fonksiyonuna, doğal yapısına bağlı olarak değişiklikler gösterir. Alıcı genellikle antijen dozuna bağlı olarak sensitize olur. İskelet sisteminin antijenik

yapısında birincil olarak hücresel immünite rol oynar. Matriks antijenleri ise olayı biraz daha abartılı olmasına yol açan humoral immüniteyi harekete geçirirler (10, 11).

Allogreft inkorporasyonunda histolojik olarak üç sonuç gözlenebilir (68, 69).

1. Otojen greft gibi alıcı tarafından kabul edilebilir.
2. Bazı genetik farklılıklar nedeniyle eksik inkorporasyon gözlenir. Bu çok az genetik farklılık nedeniyle kaynamama, greftin parsiyel rezorpsiyonuna bağlı olarak yorgunluk kırıkları, internal onarımın az olmasını, allogreft yapının zayıf olduğunu gösteren köprü kallusların oluşması gözlenir.
3. Büyük genetik farklılık nedeniyle greftin rejeksiyonu. Bu farklılık nedeniyle greft "creeping substitutional" onarım göstermeksizin periferden başlayarak hızla rezorbe olur.

Başlangıçta alıcının taze allogreftlere yanıtı genetik farklılıklara bağlı özellik göstermez. Ototreftlerde olduğu gibidir. 1. haftanın sonunda greft çevresinde enflamatuvar bir cevap gözlenir (70,71, 72). Bu reaksiyon ikinci haftanın sonunda maksimum noktasına ulaşır. 2 ay içerisinde inflamasyonda lenfosit hakimiyeti oluşur ve allogreft çevresini fibröz bir doku çevreler (70). Bu enflamasyon greft ve alıcı arasındaki genetik farka bağlı olarak 8 aydan daha fazla sürebilir (70, 72).

Başlangıçta allogreft etrafındaki vasküler yapılar otojen greftlere oranla çok azdır. Vasküler yapılar birinci haftanın sonunda genetik farklılıklar nedeniyle inflamatuvar hücreler tarafından tıkanır. Hiyalinizasyon gözlenir (53). Vasküler yapıların ortadan kalkmasıyla yeni oluşmuş ve transplante edilmiş canlı hücreler ölür (53, 72).

İnkorporasyon, transplantın alıcı tarafından kabulünün göstergesidir. Yeterli inkorporasyonda greft alıcı birleşim yerinde kallus ve greftte internal onarım gözlenir. Ototreftlerde ve allogreftlerde 1. haftada periferal olarak yeni kemik oluşumu gözlenir ancak vasküler yetmezlik nedeniyle allogreftlerde yeni kemik oluşumu ilerlemez ve nekroza dönüşür. Allogreftlerde sekonder osteogenezis alıcı aracılığıyla 4. haftadan sonra başlamaktadır (72, 73)

**Allogreftlerin otogreftlerden fizyolojik farklarına ek olarak değişik sterilizasyon yöntemleri ve saklama teknikleride birtakım olumsuz faktörler ortaya çıkarmakta ve inkorperasyonu etkilemektedir.**



### 3. MATERYAL ve METOD

Araştırma T.Ü.T.F araştırma laboratuvarında 1 yaşında, sağlıklı, ortalama ağırlığı 2,5 kg olan 15 adet albino tavşan üzerinde gerçekleştirildi.

Denekler ameliyat öncesi iki hafta süreyle gözlem altında tutuldular. Beşer elemanlı üç gruba ayrıldılar. Operasyon öncesi tüm denekler 6 saat süre ile aç bırakıldı. Tüm deneklerin göz ameliyatları Göz Hastalıkları Anabilim Dalından bir öğretim üyesi tarafından yapıldı. Tavşanların anestezisine Ketamin hidroklorid (Ketalar, Parke-Davis) 10 mg/kg İ.M'ile başlandı ve Xylazin Hidroklorid (Rompun, Bayer) 10 mg/kg İ.M yapılarak idame sağlandı. Tüm operasyonlar ortalama 20 dakikada sonlandı.

**1.Grup:** Deneklerin tibiasına saha temizliğini takiben anteromedial insizyonla ulaşıldı. Periost sıyrıldı, metafizer bölgeden 2x2x1 mm boyutlarında spongioz greft alındı. Cilt kapatıldı. Greftlerin serum fizyolojikle yıkanmasını takiben, korneaya saat 12 hizasından mikroskop altında kornea korneal insizyonla girildi, önkamara viskoelastik madde Metil selüloz %2 (Adatocel, Adatomed GmbH ) ile oluşturuldu. Greft insizyon yerinden 3-4 mm temporale, büyük iris arter halkası üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Ön kamaradaki viskoelastik madde aspire edildi. Kornea 10/0 prolenle tek kelebek sütür atılarak kapatıldı.

**2.grup:** Çalışma dışı bir tavşandan alınan tibia steril koşullarda yumuşak dokularından ayrıldıktan sonra -70 °C'de 3 hafta süreyle saklandı. Operasyondan 1 saat önce oda koşullarında serum fizyolojik içerisinde çözdürüldü. Tibia metafizindeki spongioz kemiklerden 2x2x1 mm boyutlarında greftler hazırlandı. Greftlerin serum fizyolojikle yıkanmasını takiben korneaya saat 12 hizasından mikroskop altında kornea korneal insizyonla girildi, önkamara viskoelastik madde Metil Selüloz %2 (Adatocel, Adatomed GmbH ) ile oluşturuldu. Greft insizyon yerinden 3-4 mm temporale, büyük

iris arter halkası üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Ön kamaradaki viskoelastik madde aspire edildi. Kornea 10/0 prolenle tek kelebek suture atılarak kapatıldı.

**3.grup:** Çalışma grubunda ki tüm tavşanların tibia metafizinden steril koşullarda 2x2x1 mm boyutlarında spongiöz greft alındı ve cilt kapatıldı. Alınan greftler aynı vericiye implante edilmek üzere numaralandırıldılar. Greftler 120 °C'de 20 dakika süreyle otoklavize edildiler. Greftlerin serum fizyolojikle yıkanmasını takiben korneaya saat 12 hizasından mikroskop altında kornea korneal insizyonla girildi, önkamara viskoelastik madde Metil Selüloz (Adatocel, Adatomed GmbH ) ile oluşturuldu. Greft, insizyon yerinden 3-4 mm temporale, büyük iris arter halkası üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Ön kamaradaki viskoelastik madde aspire edildi. Kornea 10/0 prolenle tek kelebek suture atılarak kapatıldı.

Tüm deneklerde postoperatif ilk 3 günlük süre boyunca opere edilen gözlerine topikal olarak Tobramisin sülfat gtt (Tobrex, Alcon )ve Deksametazon gtt (Maxidex, Alcon) 3x1 gtt/gün kullanıldı. Sistemik antibiyoterapi uygulanmadı. Otojen greft implante edilen deneklere 3 er gün dondurulmuş ve otoklavize edilmiş greft implante edilmiş deneklere 7 şer gün aralıklarla kulak venleri aracılığıyla 1cc'lik Fluoresceine %20 Faure (Labrotieres H.Faure) opak madde verilerek iris fluorescein anjiyografisi (İ.F.A) (Canon CF 60 UV Fundus Camera) çekilerek fotoğraflandı ve biomikroskopik muayene yapıldı. Araştırma sonunda tüm denekler kurban edilerek enükleasyon yapıldı ve histolojik incelemeye alınmak üzere aşağıdaki şekilde hazırlandı.

1. % 10'luk formalinde 1 gün bekletildi.
2. % 10'luk formalin (1/2 kısım) + %96'lık etil alkol (1/2 kısım) karışımında 1 gün bekletildi.
3. % 10'luk formik asit karışımında iki saat bekletilerek dekalsifiye edildi.
4. Ön kamarada kemik doku kalacak şekilde göz medial ve lateralden kesilerek 0,5 cm kalınlığa indirildi.
5. Ototeknikoma konuldu (E-2500 Tri-matic Lipshaw-Shandon).
6. Ototeknikomdan çıkarılarak parafine gömüldü ve buzdolabına kaldırıldı.

7. Parafin bloklardan 4'er mikron kalınlığında alınan doku kesitleri dökülmeyi engellemek için yumurta akı ve gliserol sürülmüş lameller üzerine alındı.
8. Doku kesitleri deparafinize edilmek üzere 60 santigrad dereceye ayarlı etüvde 30 dakika bekletildi.
9. Deparafinizasyon işlemine 15 dakika ksilenle bekletilerek devam edildi.
10. 2 kez asetonla yıkandı.
11. Sırasıyla % 90, 80, 70' lik etil alkol solusyonlarına 5'er kez daldırılarak dehidrate edildi.
12. Çeşme suyunda yıkanmayı takiben hemotoksilende 5 dakika bekletildi.  
Tekrar çeşme suyunda yıkandı.
13. % 1'lik asit alkol çözeltisine 3 kez daldırıldı. Çeşme suyunda yıkandı.
14. % 1'lik amonyak çözeltisine 3 kez daldırıldı. Çeşme suyunda yıkandı.
15. Eozinde 30- 120 saniye bekletildi ve yıkandı.
16. % 70, 80, 90'lık etil alkollere 5'er kez batırılarak dehidrate edildi.
17. 2 defa asetona 5'er kez asetona batırıldı.
18. Havada kurutuldu.
19. 2 kez ksilenle yıkandı. Balzamlı lameller kapatıldı.

Operasyon sonrası yapılan biomikroskopik muayenelerde bir deneğe kortikospongioz greft implante edildiği gözlenerek çalışma dışı bırakıldı. Postoperatif dönemde deneklerde greft alınan bölgede ve gözde enfeksiyon görülmedi. Opere ettiğimiz tüm denekler izlem sürelerini sağlıklı olarak tamamladılar.

## 4. BULGULAR

### 1. grup (otojen greftler)

#### 1.denek

Postoperatif ilk 3 günlük bakımı takiben yapılan biomikroskopisinde ön kamarada enflamatuar reaksiyon, sütür yerinde anterior sinei, greft üzerinde hemoraji, çekilen ilk iris fluoresceine anjiografisinde (İ.F.A de) greft vresinde minimal opak madde gözlendi. **(Resim 1)**

6. günde yapılan biomikroskopik muayenede n kamarada enflamatuar reaksiyonun devam ettiği, çekilen ikinci İ.F.A. de greftin periferden ve santraldan vaskülarize olduğu gözlendi. **(Resim 2)**

9.günde çekilen İ.F.A. de greftin tamamının vaskülerize olduğu gözlendi. **(Resim 3)**

#### 2.denek

Postoperatif 3. gün çekilen ilk İ.F.A.de greft üzerinde hemorajinin olması nedeniyle vaskülarizasyon değerlendirilemedi.

Postoperatif 6. gün çekilen İ.F.A.de greft üzerinde hemorajinin azalmakla birlikte devam ettiği ancak vaskülarizasyonun balamı olduğu gözlendi.

Postoperatif 9. günde yapıla İ.F.A.de greftin tamamının vaskülarize olduğu gözlendi.

**3. denek**

Postoperatif 3.gün yapılan biomikroskopik muayenede insizyon bölgesinde sineşi greft üzerindeki korneada vaskülarizasyon gözlendi. İ.F.A.de vaskülarizasyon gözlenmedi.

5.gün yapılan biomikroskopik muayenede enflamatuar reaksiyonun devam ettiği gözlendi. İ.F.A.de vaskülarizasyon görülmedi.

7.günde yapılan İ.F.A.de greftin periferel vaskülarizasyonunun olduğu merkezden de damarlanmanın başladığı görüldü.

11.günde greftin tama yakın vaskülerize olduğu gözlendi

13. günde vaskülarizasyonun tamamlandığı gözlendi.

**4. denek**

Postoperatif 3.gün çekilen İ.F.A.de greft üzerinin hemorajik olması nedeniyle vaskülarizasyon değerlendirilemedi.

6.gün çekilen İ.F.A.de hemorajinin azaldığı ve periferden vaskülarizasyonun başlamış olduğu gözlendi.

9. gün çekilen İ.F.A.de greftin tamamının vaskülarize olduğu gözlendi.

**5. denek**

Postoperatif 3.gün çekilen İ.F.A.de greft üzerinin hemorajik olması nedeniyle vaskülarizasyon değerlendirilemedi.

6.gün çekilen İ.F.A.de hemorajinin azaldığı ve periferden vaskülarizasyonun başlamış olduğu gözlendi.

9. gün çekilen İ.F.A.de greftin tamamının vaskülarize olduğu gözlendi.

*Patolojik inceleme:* Postoperatif 21. gün sakrifiye edilerek histolojik kesit hazırlanan 5 adet otojen greftin H.E ile boyanmış kesitlerinin mikroskopik incelemesinde greftlerde belirgin vaskülarizasyon, yeni kemik oluşumu yanısıra matür kemiğin varlığı , matür yağ hücreleri ve zengin kemik iliği elemanları içeren kemik iliği gözlemlendi. Örneklerin hiçbirinde dejenere kemik yapısı gözlenmedi. (Resim 4, Resim 5)

## 2. grup (dondurulmuş greftler)

### 1. denek

Post operatif 7. günden 36. güne kadar çekilen 7 adet İ.F.A.de greft üzerinde vaskülarizasyonun olmadığı gözlemlendi.

Post operatif 46. günde çekilen İ.F.A.de minimal vaskülarizasyon bulguları gözlemlendi. Ancak korneal vaskülarizasyona mı, greftin revaskülarizasyonuna mı ait olduğu ayırd edilemedi.

Postoperatif 55, 73, 96. günlerde çekilen 3 adet İ.F.A.de vaskülarizasyon şüphesinin devam ettiği ancak kesin vaskülarize diyebilmek için greftin tamamen opak maddeyi almadığı gözlemlendi.

### 2. denek

Post operatif 7 ve 46 . günler arasında çekilen 9 adet İ.F.A.de greft üzerinde vaskülarizasyona ait bulgu gözlenmedi.

Post operatif 55. günde çekilen İ.F.A.de grefte ya da korneaya ait olduğu düşünülen vaskülarize alan gözlemlendi.

Post operatif 73, 96. güne kadar çekilen 2 adet İ.F.A.de daha önce çekilen anjiyografideki vaskülarizasyon bulgularının değişmediği gözlemlendi.

3. denek

Post operatif 7 ve 36. günler arasında yapılan 8 adet İ.F.A.de vaskülarizasyona ait bulgu saptanmadı. **(Resim 6)**

Post operatif 46. günde çekilen İ.F.A.de grefte ait vasküler alan gözlendi. **(Resim 7)**

Post operatif 55, 73, 96. güne kadar çekilen 3 adet İ.F.A.de vaskülarizasyon bulgularında değişiklik gözlenmedi. **(Resim 8)**

4. denek

Post operatif 7 ve 36. günler arasında yapılan 8 adet İ.F.A.de vaskülarizasyona ait bulgu saptanmadı.

Post operatif 46. günde çekilen İ.F.A.de grefte ait vasküler alan gözlendi.

Post operatif 55, 73, 96. güne kadar çekilen 3 adet İ.F.A.de vaskülarizasyon bulgularında değişiklik gözlenmedi.

5. denek

Post operatif 7 ve 36. günler arasında yapılan 8 adet İ.F.A.de vaskülarizasyona ait bulgu saptanmadı.

Post operatif 46. günde çekilen İ.F.A.de grefte ait vasküler alan gözlendi.

Post operatif 55, 73, 96. güne kadar çekilen 3 adet İ.F.A'de vaskülarizasyon bulgularında değişiklik gözlenmedi.

*Patolojik inceleme:* Postoperatif 96. gün sakrifiye edilerek histolojik incelemeye alınan dondurulmuş 5 adet allogreftin H.E ile boyanmış kesitlerinin yapılan

mikroskobik değerlendirmesinde tüm greftlerin vaskularize olduğu gözledi. 4 adet denek daha belirgin olmak üzere tüm deneklerde matür kemiğin yanısıra oldukça fazla yeni kemik oluşumu yani osteblastik aktivite gözlendi. Matür yağ hücreleri daha belirgin olmak üzere tüm kemik iliği elemanları gözlendi. (**Resim 9, Resim 10**)

### **3.grup (Otoklavize otojen greftler)**

#### **1. denek:**

Postoperatif 1. günden 167. güne kadar çekilen 17 İ.F.A.de vaskularizasyona ait herhangi bir bulguya rastlanmadı. (**Resim 11, Resim 12, Resim 13**)

#### **2. denek**

Postoperatif 1. günden 167. güne kadar çekilen 17 İ.F.A. de vaskularizasyona ait herhangi bir bulguya rastlanmadı.

#### **3. denek**

Postoperatif 1. günden 167. güne kadar çekilen 17 İ.F.A. de vaskularizasyona ait herhangi bir bulguya rastlanmadı.

#### **4. denek**

Postoperatif 1. günden 167. güne kadar çekilen 17 İ.F.A.de vaskularizasyona ait herhangi bir bulguya rastlanmadı.

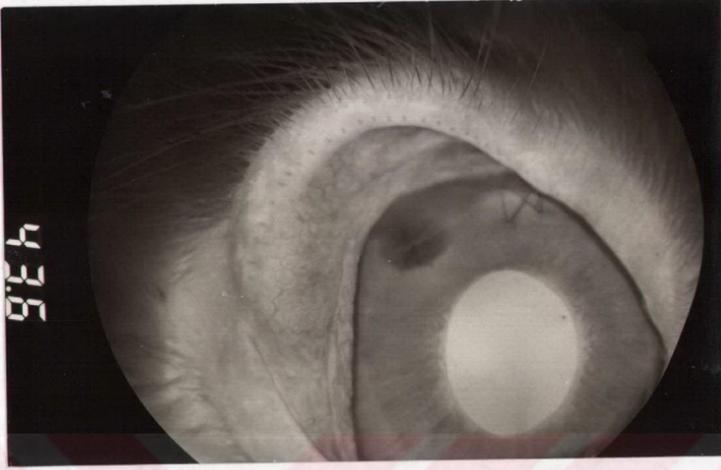
#### **5. denek**

Postoperatif 1.günden 167. güne kadar çekilen 17 İ.F.A. de vaskularizasyona ait herhangi bir bulguya rastlanmadı.

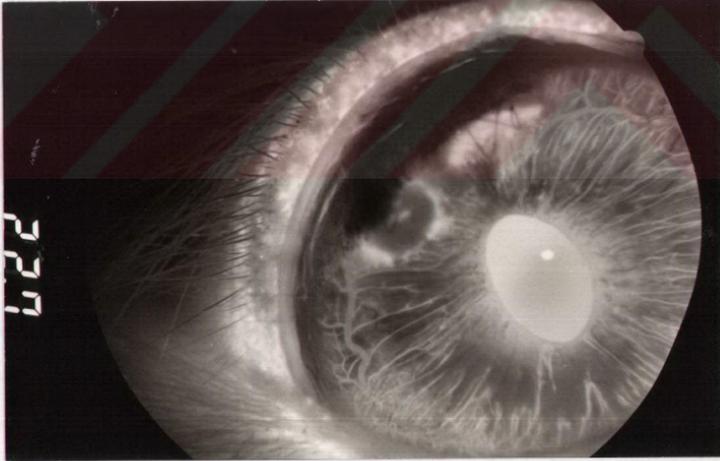
*Patolojik inceleme:* Postoperatif 167. gün sakrifiye edilerek histolojik incelemeye alınan 5 adet otoklavize edilmiş greftlerin H.E ile boyanmış kesitlerinin değerlendirmesinde kemik yapısının bozulmuş olduğu, kemik iliği alanlarının tamamen boş olduğu, vakuoler bir görünümde olduğu gözlenmiştir. Deneklerin 3 tanesinde

periferde, çok sınırlı bir alanda minimal yeni kemik oluşumu dikkat çekiciydi. Tüm preparatlarda çevre dokularda belirgin iltahabi hücre artışı mevcuttu. ( **Resim 14, Resim 15**)

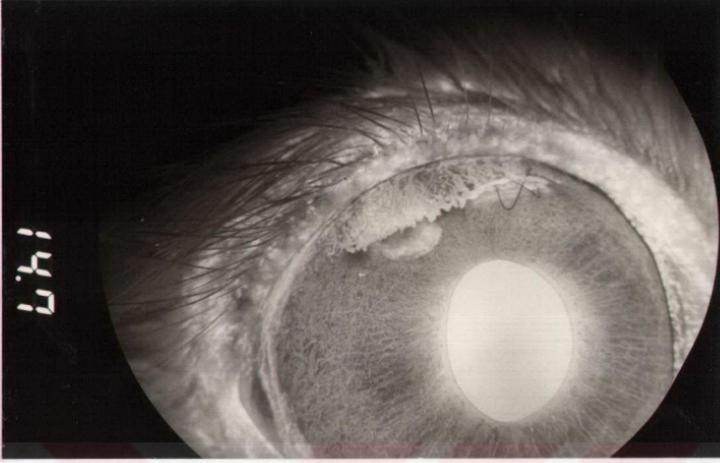




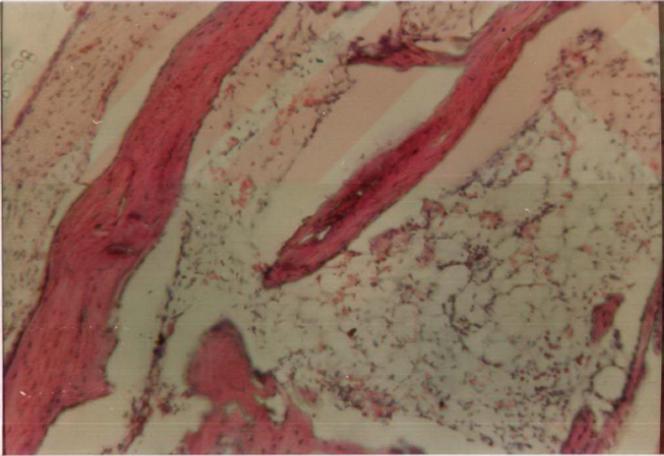
**Resim 1:** Otojen greft, 3. gün çekilen İ.F.A.de çevresinde minimal opak madde birikimi mevcut, greft içersinde vaskülarizasyonu gösteren opak madde birikimi yok.



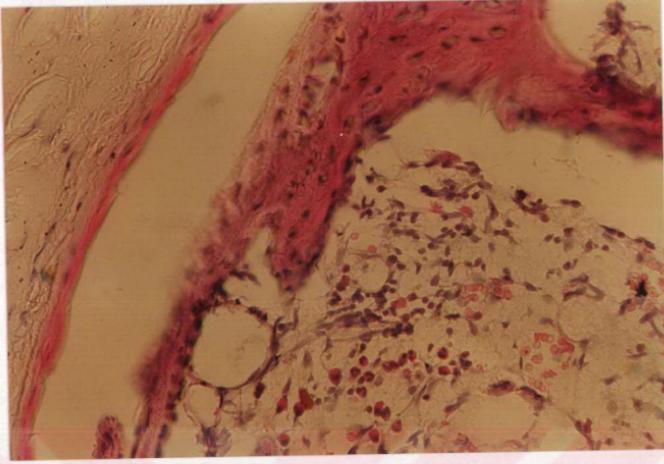
**Resim 2:** Otojen greft, postoperatif 6 gün çekilen İ.F.A.de greft ortasında revaskülarizasyonu gösteren opak madde birikimi.



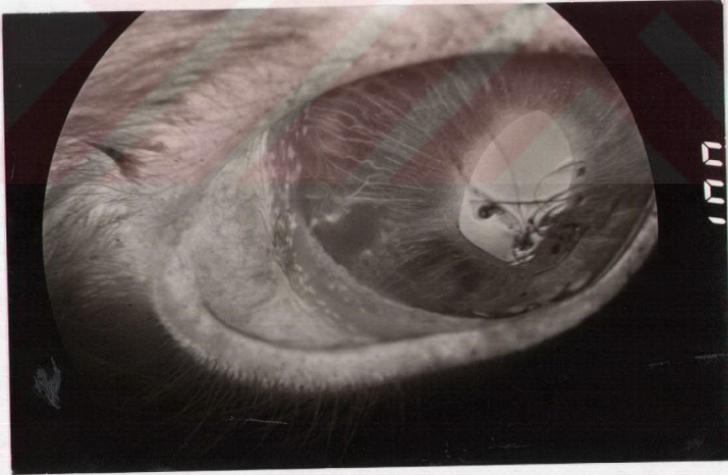
**Resim 3:** Otojen greft, 9.gün çekilen İ.F.A. de greft revaskularizasyonu belirgin olarak gözlenmekte.



**Resim 4:** Otojen greft, greft üzerinde belirgin damarlanma , yeni kemik oluşumu ve kemik iliği gözlenmekte.(H.E x 20)



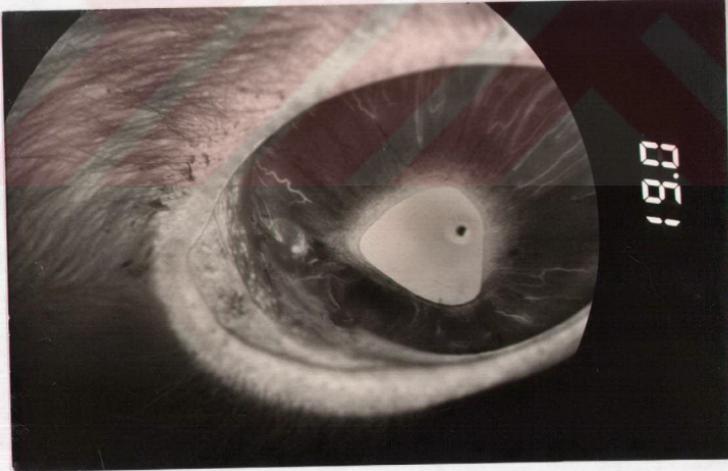
**Resim 5:** Otojen greft, periferde yeni kemik oluşumu, merkezde ise vasküler yapılar ve kemik iliği. (H.E x 50)



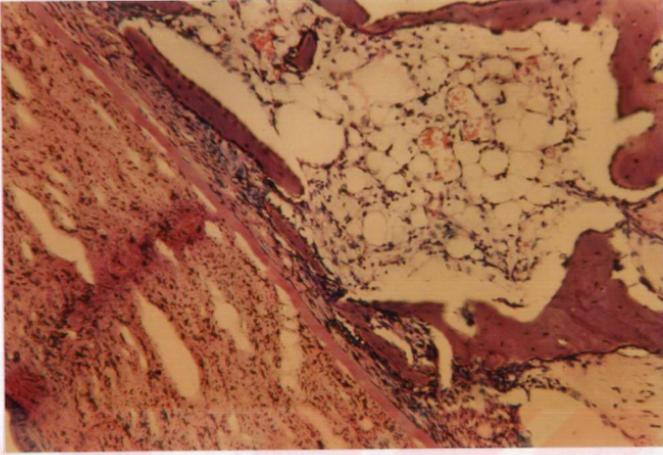
**Resim 6:** Dondurulmuş allogreft, 7.gün çekilen İ.F.A.de greft çevresinde minimal opak madde tutulumu mevcut. Greft içersinde vaskularizasyona ait bulgu yok.



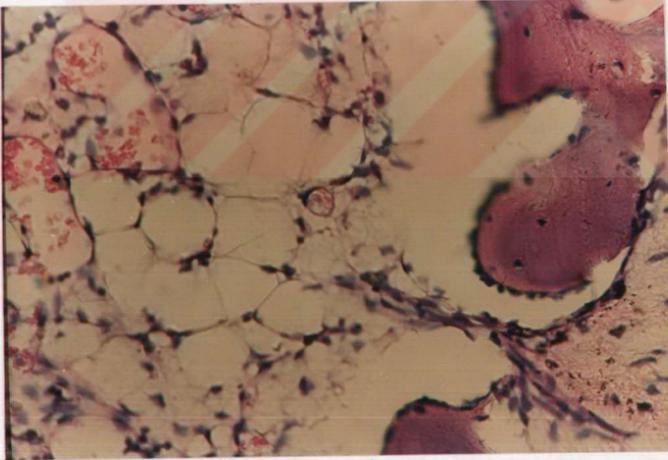
**Resim 7:** Dondurulmuş allogreft, 46. gün çekilen İ.F.A.de greft üzerinde minimal opak madde tutulumu mevcut.



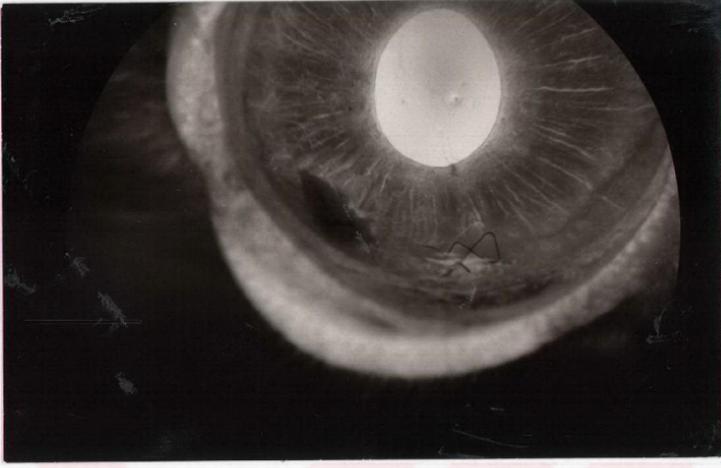
**Resim 8:** Dondurulmuş allogreft, 96.gün çekilen İ.F.A.de greft üzerinde parsiyel opak madde tutulumu mevcut.



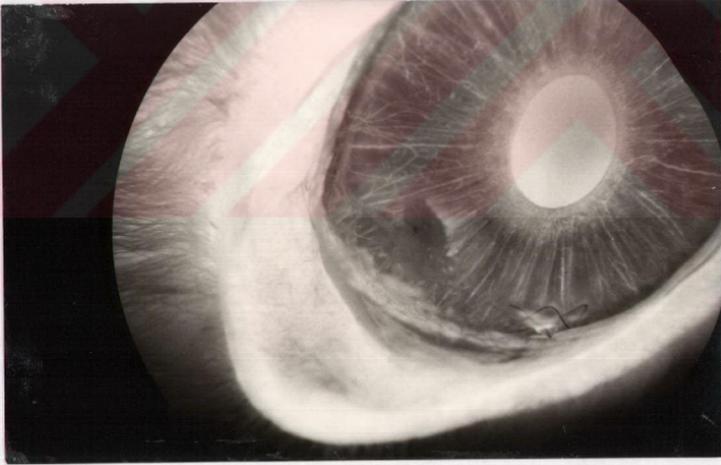
**Resim 9:** Dondurulmuş allogreft, matür kemik ve osteoblastlar bir alanda.  
Vasküler yapılar, kemik iliği mevcut. (H.E x 20)



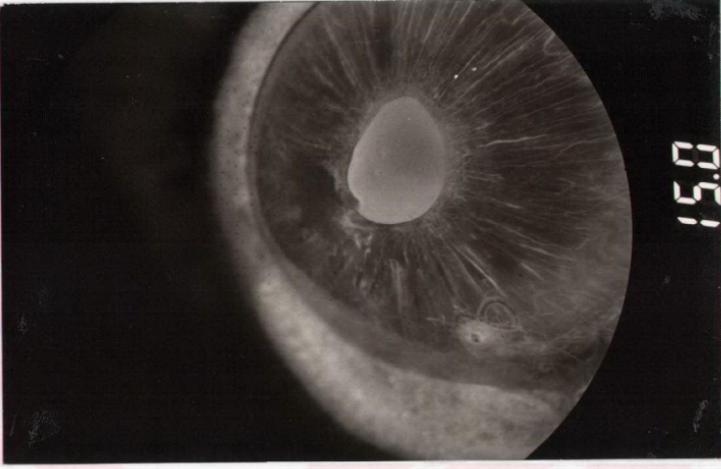
**Resim 10:** Dondurulmuş allogreft, Ortada vasküler yapılar ve kemik iliği  
kemik dokusunda periferde yeni kemik oluşumu. (H.E x50)



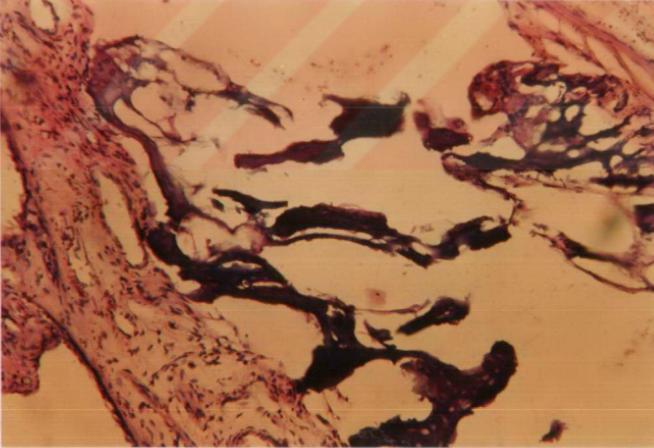
**Resim 11:** Otojen otoklavize greft, 7.gün çekilen İ.F.A.de greft çevresinde minimal opak madde tutulumu mevcut. Grefte ait revaskularizasyon bulgusu gözlenmedi.



**Resim 12:** Otojen otoklavize greft, 73.gün çekilen İ.F.A.de greft çevresinde opak madde tutulumu mevcut. Graft içersinde vaskularizasyon düşündürecek bulgu yok.



**Resim 13:** Otojen otoklavize greft, 167. gün çekilen İ.F.A. de greft çevresinde opak madde tutulumu var. Greft içersinde vaskülarizasyonu gösteren opak madde tutulumu yok.



**Resim 14:** Otoklavize otojen kemik grefti, nekrotik kemik spikülleri gözlenmekte. Kemik iliği alanları boş. Kemik vakuolar görünümünde. (H.E x 20)



**Resim 15:** Otoklavize otojen kemik grefti, nekrotik kemik spikülleri görülmekte. Boş lakünalar izlenmekte. Vaskülarizasyon gözlenmemekte. (H.E x 50)

Otojen greftlerin 4 tanesinin 6. gün çekilen çekilen İ.F.A'de, 1 tanesinin de 7. gün çekilen İ.F.A'de revaskularize olmaya başladığı gözlemlendi. Ortalama revaskularizasyon başlama zamanı  $6,2 \pm 0,2$  gün olduğu saptandı. Otojen greftlerin 4 tanesi revaskularizasyonunu 9. günde tamamlarken 1 tanesi 11. günde tamamladı. Ortalama vaskularizasyon tamamlanma zamanı  $9,4 \pm 0,9$  gün olarak bulundu.

Dondurulmuş allogreftlerin izlem süresi uzunluğu nedeniyle korneal iritasyona bağlı olarak kornea üzerinde neovaskularizasyon gelişti. Bu durum greftlerin revaskularizasyonunu değerlendirmemizde sorunlara yol açtı. Dondurulmuş allojen 4 adet greftin 46. günde 1 tanesinde, 55. günde revaskularizasyonunun başladığı gözlemlendi. Ortalama revaskularizasyon zamanı  $47,8 \pm 4,0$  gün olarak bulundu. Postoperatif 96. güne kadar çekilen İ.F.A.de greftlerin tamamının revaskularize olduğu gösterilemedi.

Otoklavize otojen greftlerin postoperatif 167. güne kadar çekilen İ.F.A.lerinde revaskularizasyonu gösteren bulguya rastlanmadı (Tablo 2).

Histolojik olarak incelenen 5 adet otojen greftte çevre dokuda fibrozis, damarlanma, kemik iliği ve greft içersinde damarlanma gözlenmiştir. 2 greftte kemik iliğinde minimal fibrozis gözlenmiştir. 2 adet greftte osteoblastik aktivitenin tamamlandığı greftteki hücrelerin olgun kemik hücrelerine yani osteositlere dönüştüğü gözlenmiştir. Diğer 3 grefteyse yeni kemik oluşumuyla birlikte olgun kemik hücreleri birlikte gözlenmiştir. Greftlerin 1 tanesinde osteoklast gözlenmiş ancak dejenere kemiğe rastlanmamıştır.

Dondurulmuş allogreftlerde de otojen greftlerde olduğu gibi çevre dokuda fibrozis ve damarlanma vardı. Tüm allogreftlerde otojen greftlere oranla daha az damarlanma, daha az yoğunlukta kemik iliği ve otojen greftlere oranla artmış bir kemik iliği fibrozisi gözlemlendi. Tüm allogreftlerde otojenlere oranla yeni kemik oluşumu artmış, ancak matür kemik hücresi azdı. Allogreftlerin 1 tanesinde çok küçük bir alanda dejenere kemik gözlemlendi.

Otoklavize greftlerin tümü avasküler, kemik iliğinden yoksun, dejenere bir görünüme sahipti. Hiçbirinde matür kemik hücresine rastlanmadı. Otoklavize greftlerin 4 tanesinin çevre dokusunda damarlanma artışı, fibrozis gözlenirken; bir tanesi çevre dokudan ayrı, serbest haldeydi. 3 otoklavize greftin kenarında çok sınırlı bir alanda osteoblastik aktivite gözlemlendi (Tablo 3).

**Tablo 2:** Greftlerin revaskülarizasyonunun İ.F.A. ile değerlendirilmesi.

Graft no	Otojen revasküla		Donduru. Revasküla		Otoklav. Revasküla	
	Başlangıç	Sonlanmış	Başlangıç	96. gün	Başlangıç	167. gün
1	6. gün	9. gün	46. gün	tam değil	-	-
2	6. gün	9. gün	55. gün	tam değil	-	-
3	7. gün	11. gün	46. gün	tam değil	-	-
4	6. gün	9. gün	46. gün	tam değil	-	-
5	6. gün	9. gün	46. gün	tam değil	-	-

**Tablo 3: Greftlerin histolojik bulgularının tablo halinde gösterimi**

Greft no	Dejenere kemik	Yeni kemik	lamellöz kemik	osteklast	Kemikte damarlanma	Kemik iliği varlığı	K.İ fibrozisi	çevre dokuda fibrozis	çevrede damarlanma
Otojen 1	-	++	++	+	+++	+++	Minimal	+	+
Otojen 2	-	-	+++	-	+++	+++	minimal	+	+
Otojen3	-	++	++	-	+++	+++	-	+	+
Otojen 4	-	-	+++	-	+++	+++	-	+	+
Otojen 5	-	++	++	-	+++	+++	-	+	+
Dondu. 1	+	++	++	-	++	++	+	+	+
Dondu. 2	-	++	++	-	++	+	minimal	+	+
Dondu. 3	-	++	++	-	++	+	+	+	+
Dondu. 4	-	++	++	-	++	++	+	+	+
Dondu. 5	-	++	+++	-	++	+	-	+	+
Otokla. 1	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Otokla. 2	+++	minimal	-	-	-	-	-	+	+
Otokla. 3	+++	minimal	-	-	-	-	-	+	+
Otokla. 4	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
Otokla. 5	+++	minimal	-	-	-	-	-	+	+

## 5. TARTIŞMA

Ortopedik cerrahinin en önemli problemlerinden birisi de konjenital anomali, travma, tümör gibi nedenlerle oluşan büyük kemik defeklerinin ortadan kaldırılarak iskelet sistemi bütünlüğünü sağlamaktır. Bu amaçla otojen, allojen, otoklavize kemik greftleri, protezler, kemik görevini üstlenebilecek biyolojik olmayan materyeller, İizarov yöntemiyle uzatma teknikleri kullanılmıştır .

Yapılan deneysel çalışmada kemik greftlerinin revaskülarizasyonu ile internal onarımı yani "creeping substitution" değerlendirildi.

Çalışmayı deneğe zarar vermeksizin uzun süre izleyebilmek amacıyla anjiyografik tetkik üzerine kurduk. Sonuçlarımızı direk gözleyebilmek amacıyla greftleri göze implante ettik. İ.F.A.ni ve biomikroskopik muayeneyi sağlıklı yapabilmek için tüm tavşanları albino seçtik ve greftlerin revaskülarizasyonunun değerlendirileceği İ.F.A çekimlerinde kolaylık sağlamak amacıyla greftleri ön kamaranın temporaline yerleştirdik.

Otojen ve dondurulmuş allogreftler transplante edildikten sonra üzerleri bir pıhtıyla kaplandı . Pıhtı 2 gün süreyle ortadan kalkmadı. Böylelikle greft içerisinde canlı kalabilmiş hücrelerin diffüzyonla beslenmesine olanak sağlanmış oldu. Otoklavize otojen greftlerde bu olay gözlenmedi.

Otojen greftlerde vaskülarizasyon ortalama  $6,2 \pm 0,4$  günde başladı ve  $9,4 \pm 0,9$  günde tamamlandı. Dondurulmuş allogreftlerde ise vaskülarizasyon başlangıcı ortalama  $47,8 \pm 4,0$  gündü. Vaskülarizasyonun 96. günde çekilen İ.F.A'lerinde henüz tamamlanmamış olduğu düşünüldü. Otoklavize otojen greftlerde 167 gün süresince çekilen İ.F.A'de revaskülarizasyona ait bulgu saptanmadı.

Deleu (48) yaptığı deneysel anjiografik çalışmada 8. günde otojen spongios kemikte, 45. günde dondurulmuş allojen grefte vaskularizasyon gözlemiş ancak kaynatılarak sterilize edilmiş otojen greftlerde vasküler invazyon görmemiştir. Mikroskopik incelemede allojen greftlerin vasküler yapılarının ve hücre sayısının otojenlere oranla daha az olduğu, kaynatılmış greftlerde ise vasküler yapıların greft içersine girmediği ve hücre yönünden çok fakir olduğunu belirtmiştir.

Goldberg (74) yaptığı çalışmada otojen greftlerin genelde taze olarak kullanıldığını, bu greftlerin üzerinde osteoblastik aktivite gösterebilecek hücrelerin bulunduğunu, allogreftlerin genetik farklılıklar nedeniyle vasküler yapısının geç ve zayıf olduğunu belirtmiştir.

İnternal onarımı geciktiren immünolojik reaksiyonlardır. İmamaliyev (75) dondurmanın immünolojik olayları baskıladığını, dondurarak optimal saklama derecesinin ise -70 °C'de olduğunu belirtmiştir. İmmünolojik olayların başlamasına neden olan major histokompatibilite antijenlerdir ki bunlar iki gruptur. Birinci grup HLA-A, HLA-B, HLA-C antijenlerini barındırır. Bu antijenler vücutta bütün çekirdek içeren hücrelerde gözlenir. Bu antijenler T hücreleri aktive ederler. İkinci grup ise HLA-D ve alt gruplarını içerir. B lenfositlerde yoğun olarak bulunurlar (76).

Horowitz ve Friedlander (77) yaptığı in vitro çalışmada major histokompatibilite antijenlerinin % 90'dan daha fazla T hücrelerini aktive ettiğini gözlemiş ve allogreftlerin internal onarımının hücre sel immü nitenin aktive edilmesi nedeniyle geciktiğini belirtmiştir.

Yapılan klinik çalışmalarda vasküler invazyonun greft inkorperasyonunu doğrudan ilgilendirdiği gözlenmiştir. Allogreft uygulamasını takiben kırılan 16 allogrefti histolojik olarak inceleyen Bobby ve arkadaşları (78) kırığın oluşmadığı bölgelerin vaskularize olduğu, kırık gözlenen bölgelerde ise vaskularizasyona ait bulguların

olmadığını gözlemişlerdir. Allojen greftlere oluşan 16 kırığın 8 tanesini otojen greftle tedavi edebilmişlerdir.

Otojen ve dondurulmuş allojen greftlerde spinal füzyonlarda kaynamamayı araştıran Auori ve arkadaşları (79) 114 otojen kemik grefti kullanılan hastaların 5 tanesinde, 94 dondurulmuş allojen greft kullanılan hastaların da 5 tanesinde kaynamama gözlemişlerdir. İstatiksel olarak kaynamama açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptayamamışlardır.

Burchard (69) köpek fibular allogreftleri histolojik ve radyolojik olarak değerlendirmiş ve 3 tip inkorporasyon gözlemiştir. Tip 1, genelde otojen greftlerde gözlenen yeterli inkorporasyondur. Çalışmasında otojen greftlerin %85'inde Tip1 %15'indeyse Tip 2 internal onarım gözlemiştir. Tip 3, alıcı ve greft arasında büyük uyumsuzluk olduğunda kırık ya da kaynamama ile karakterize olan iyileşme tipidir. Çalışmasında allojen greftlerin %20 sinde bu tip internal onarım gözlenmiştir. Tip 2, onarım ise greftle alıcı arasında az da olsa doku uyumsuzluğu olduğunda ortaya çıkan onarım tipidir. Allojen greftlerin %60'ı bu şekilde iyileşmiştir. Allojen greftlerin kalan %20'sinde iyileşme Tip 1iyileşme şeklinde olmuştur.

Allojen greftlerin pahalı bankacılık yöntemleri gerektirmesi, uygun boyutlarda greft bulma zorluğu nedeniyle otojen greftler sterilizasyon ve devitalizasyon amacıyla otoklavize edilerek kullanılmışlardır( 12, 80).

Otoklavizasyon süresi ve ısısını belirlemek için Köhler (81) greftin mekanik direncini 131 °C 2 dakika, 121°C 20 dakika, 110 °C 225 dakika otoklavize ederek ölçmüş en iyi sonucu 131 °C'de 2 dakikalık otoklavizasyonda, en kötü sonucu 110 °C'de 225 dakikalık otoklavizasyonda elde etmiştir.

Ancak 131°C'de 2 dakikalık otoklavizasyon süresinin çok kısa olması ölçümlerde hata yapılabileceği kuşkusunu nedeniyle 121 °C 20 dakika süreyle

otoklavizasyon standart cerrahi otoklavizasyon olarak kabul edilmiştir. Biz de çalışmamızda greftleri bu şekilde hazırladık.

Köhler (82) demineralize kemik matriksiyle desteklenen ve desteklenmeyen iki grup dondurulmuş allojen ve otoklavize otojen greftleri izlemiştir. Demineralize kemik matriksiyle desteklenmemiş grupta her iki tip grefte yeni kemik oluşumu ve inkorporasyonun zayıf olduğu, ancak dondurulmuş greftlerde mineral içeriğinin fazla olduğunu gözlemiş ve sonuç olarak iki greftin inkorporasyonları arasında fark olmadığını, bu greftlerin demineralize kemik matriksiyle desteklenmesini önermiştir.

Kemik morfojenik protein (BMP) kemik dokusu yıkıldığında ortaya çıkan ve plüripotansiyel mezenkimal hücreleri uyararak onların osteoblastlara farklılaşmasını sağlayan proteindir (43). Dondurma işleminden sonra BMP fizyolojik özelliklerini kaybetmediği saptanmıştır (83). Ancak otoklavizasyon sonucu BMP denatüre olduğu ve kemiğin osteoindüktif yeteneğini yitirdiği gözlenmiştir (84).

Yalnız ve ark. (85) 3 hafta süreyle dondurulmuş ve 120 °C'de 20 dakika süreyle otoklavize edilmiş greftleri elektron mikroskopunda gözlemişler; dondurulmuş greftin osteosit ve osteoblastlarında hücre organel sayısında azalma olmasına karşın canlı olduğu, kollejen liflerinin düzenli bir dizilim gösterdiği saptanmış, ancak otoklavize edilen greftlerde osteosit ve osteoblastların boşluklar halinde görüldüğünü, çekirdeklerini ve diğer hücre organelerini kaybetmiş olduklarını, kollejen liflerin destrükte olduğunu gözlemişlerdir.

Johnston (86) tümör nedeniyle rezeksiyon yapılarak otoklavizasyon sonrası protezle birlikte implante edilen 15 hastanın 9 tanesinde fonksiyonel olarak iyi sonuç almış. Ancak 1 yıl sonra yapılan biopsilerinde inkorporasyonun olmadığı, kemiğin involukrum görünümünde olduğu çevresinin fibröz bir dokuyla çevrili olduğunu gözlemiştir. Aynı yazarların daha önce yaptığı deneysel çalışmalarda da otojen greftlerin iyileşmesi hızlı, dondurulmuş allojen greftlerin daha yavaş, otoklavize greftlerin iyileşmesini ise çok yavaş olduğunu gözlemişlerdir.

Çalışmamızda otoklavize otojen greftlerde 167. gün çekilen anjiografide vaskularizasyona rastlanmaması ve daha sonra yapılan histolojik kesitlerde 3 tanesinde çok sınırlı bir alanda ihmal edilebilecek derecede az osteblastik aktivite gözlenmesi osteoindüktif ve osteokondüktif etkilerinin çok az olmasına bağlanmıştır.



## 6. SONUÇ

Ortopedik cerrahı en çok düşündüren ve uğraştıran başlıca problemlerden biri tümör, konjenital anomali, travma ve osteomyelit gibi nedenlerle gelişebilen büyük kemik kayıplarının onarımı ve iskelet sisteminin olağan fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için kemiksel bütünlüğün yeniden kurulabilmesidir. Bu defektlerin onarımında otojen, dondurularak saklanmış allojen, otoklavize edilerek devitalize edilmiş otojen kemik greftlerinin kullanımı akla gelen ilk tedavi seçeneklerindedir .

Yukarda belirtilen tip greftlerle yaptığımız çalışmayı literatür bilgisiyle karşılaştırıp değerlendirdiğimizde aşağıdaki sonuçlara ulaştık.

1. İnternal onarımın hızı kemiğin revaskülarizasyon bağıdır . Otojen kemik greftlerinde canlı kalabilen hücreler hızlı revaskülarizasyon sonucu canlılıklarını devam ettirebilmekte, bu durumda hızlı bir osteoindüktif ve ostekondüktif cevabın oluşmasına ve erken bir internal onarıma yol açmaktadır.
2. Dondurulmuş allojen greftlerde revaskülarizasyon ve internal onarım major histokompatibilite antijenlerine bağlı olarak otojenlere göre geç olmaktadır.
3. Otoklavize edilerek devitalize edilmiş otojen greftlerde kemik morfojenik proteinin de denatüre olması osteoindüktif etkiyi ortadan kaldırmakta, greftin devitalize olması ostekondüktif etkiyi azaltmaktadır. Klinik kullanımlarında demineralize kemik matriksi ya da otojen greftlerle desteklenmesi uygundur.

## 7. ÖZET

Bu deneysel çalışmada taze otojen, dondurulmuş allojen ve otoklavize otojen spongios kemik greftlerinin revaskülarizasyonu ve internal onarımı anjiografik ve histolojik yöntemlerle araştırıldı.

Otojen kemik greftleri tavşan tibia metafizlerinden alındıktan hemen sonra, dondurulmuş allojen greftler  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 3 haftalık saklamayı takiben oda ısısında çözündürdükten sonra, otoklavize otojenler ise her tavşanın tibia metafizinden alınıp  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 20 dakika otoklavize edildikten sonra tavşan gözlerinin ön kamaralarına yerleştirildi.

Belirli aralıklarla çekilen İ.F.A.de otojen greftlerin  $6,2\pm 0,4$  günde vaskülerize olmaya başladığı,  $9,4 \pm 0,9$  günde vaskülarizasyonunu tamamladığı gözlemlendi. Dondurulmuş allojen greftlerin  $47,8 \pm 4,0$  günde vaskülerize olmaya başladığı ancak izledikleri 96 gün boyunca vaskülarizasyonunu tamamlayamadıkları saptandı. Otojen otoklavize greftlerde ise, izledikleri 167 gün boyunca vaskülarizasyona ait bulgu gözlenmedi.

Histolojik değerlendirmelerde ise otojen ve dondurulmuş allojen greftlerde nekrotik kemik yerini tamamen yeni oluşan kemik ve vasküler ve kemik iliği içeren olgun kemiğe bırakmış olmasına karşın; otojen otoklavize kemikte çok sınırlı bir alanda minimal osteoblastik aktivite saptandı.

Spongios otojen kemiklerin revaskülarizasyonun ve internal onarımının en hızlı ve en iyi, dondurulmuş allojen greftlerin revaskülarizasyonunun otojenlere oranla daha yavaş ve az, internal onarımının iyi olduğu gözlemlendi. İzlendiği süre içerisinde otoklavize otojen greftlerin revaskülarizasyonun olmadığı, internal onarımın ise ihmal edilecek düzeyde az olduğu gözlemlendi.

## 8. KAYNAKLAR

1. Prolo DJ, Rodrrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin Orthop.* 200:322-331, 1985.
2. Mankin HJ, Dopelt SH, Sullivan TR, et al. Osteoarticular and intercalary allograft transplantation in the menagement of malignant tumor of bone. *Cancer.* 50: 613-630, 1982.
3. Schneider J, Bright RW. Anterior cervical fusion using freeze-dried bone allograft. *Transplant Proc* 8 (suppl 1): 73-76, 1976.
4. Spence K, Bright R, Fitzgerald S, et al. Solitary unicameral bone cyst: Treatment with freeze-dried crushed cortical bone allograft. A review of 144 cases. *J Bone Joint Surg.* 58A:636-641, 1976.
5. Chase WS, Herndon HC. The fate of otogenous and homogenous bone grafts. *J.Bone and Joint Surg.* 37-A: 809-841, 1955.
6. Gürkan Kİ, Kocaoğlu H. Kemik Bankası. *İstanbul Üniv. Tıp.Fak.Mec.*18:462, 1955.
7. Ege R. 1-Kemik greftleri ve Kemik Bankası 2-Muhtelif Kemik greftlerinin akibeti ve bunların greft yatağı ile münasebetine ait tecrübeler. Ankara Üniv. Tıp. Fak. Mec. Vol 15 No 3 ek 1-63, 1972.
8. Aykurt M. Tibbi prensipleri ve yasal yönleri; Kemik bankası kurulması. *Sendrom:* 9-14, 1991.

9. Burchard H. Biology of bone transplantasyon., *Clin Orthop North Am.* 2:187-196, 1987.
10. Yablon IG, Cooperband S, Covall D. Matrix antigen in allografts (The humoral response). *Clin Orthop.* 168: 243-251, 1982.
11. Yablon IG, Cooperband S, Covall D. Matrix antigen in allografts (The cell mediated response). *Clin Orthop.* 172: 277-280, 1983.
12. Smith WS, Struhl S, Arbor A. Replantation of autoclaved autogeneus segment of bone for treatment of chondrosarkoma. *J Bone Joint Surg.* 70.A: 70-75, 1988.
13. Köhler P, Kreicbergs A. Chondrosarcoma treated by reimplantation of resected bone after autoclaving and supplementation with allogeneic bone matrix. *Clin Orthop.* 249: 281-284, 1993.
14. Lauritzen C, Alberius P, Santenelli F, Vallfors B, Liliija J, Stephensen H. Reposition of craniofacial tumorus bone after autoclaving. *Skand J Plast Reconst Hand Surg.* 25: 161-165, 1991.
15. Daftari TK, Whitesides TE, Heller JG, et al. Nicotine on the revascularization of bone graft. *Spine* 8: 904-911, 1994.
16. Duthie RB, Ferguson AB. The musculo-skeletal system . In: Mercer's Orthopedic surgery, chapter 2, Ed. Edward Arnold , London, 8.ed. 1983, pp 27- 65.
17. Elias H, Pauly JE, Burns ER. Tissu sguelettique. In: Histology. Ed. Elias H, Pauly JE, Burns ER. Piccin Nuova Libreria S.P.A. Padova (Italie), 1984, pp 85-110.

18. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Bone histology. In: Histology a text and atlas. Chapter 8 Bone. Ed. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Williams & Wilkins, 2. ed. Baltimore , 1989. pp 141-178.
19. Marc SC, Papoff SN. Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton . *American J Anatomy* 183:1-44, 1988.
20. Kessel RG, Kardon RH. Tissue and organs. In: A text atlas of scanning , electron microscopy, chapter 3, skeletal tissue. Ed. WH. Freeman company, San Francisco, 1979, pp 19-34.
21. Menton DN, Simmons DJ, Chang SL, et al. From bone lining cell to osteocyte. *Anat Rec.* 209: 29-36, 1984.
22. Bab I, Howlett C R, Ashton BA, Owen ME. Ultrastructure of bone and cartilage forme in vivo in diffusion chambres. *Clin Orthop.* 187: 243-254, 1984.
23. Miller EJ, Martin GR. The collagen of bone. *Clin Orthop.* 59: 195-232, 1968.
24. Urist MR, Silverman BF. The Bone induction principle. *Clin Orthop.* 53: 243-283, 1967.
25. Urist MR. Surface decalcified allogenic bone implants. *Cin Orthop.* 56: 37-46, 1968.
26. Nilsson OS, Urist MR, Davson EG, et al. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs *J Bone Joint Surg.* 68-B: 635-642, 1986.
27. Urist MR. Bone morphogenetic system in residues of bone matrix in the mouse. *Clin Orthop.* 91: 210-223, 1973.

28. Shin SS, Copp DH, Patterson FP. Measurement of the rate and distribution of the nutrient and other arterial blood supply in long bones of the rabbit. *J Bone Joint Surg.* 50-B: 178-183, 1963.
29. Ray RD. Circulation and the skeletal system. *J Bone Joint Surg.* 50-A: 764- 765, 1968.
30. Shim SS. Physiology of blood circulation of bone. *J Bone Joint Surg.* 50-A: 812-824, 1968.
31. Rand JA, Berquist TH. Fractures healing. In: Imaging orthopedic trauma and surgery. Ed. Bequist TH. Philadelphia, W.B. Saunders company, 1986, pp. 51-90
32. Kane WJ. Fundamental concepts in bone blood flow studies. *J Bone Joint Surg.* 50-A: 801-811, 1968.
33. Kelly PJ. Anatomy, physiology and pathology of the blood supply of bone. *J Bone Joint Surg.* 50-A: 766-783, 1968.
34. Mankin HJ, Doppelt S, Tomfort W. Clinical experience with allograft implantation. *Clin Orthop.* 174: 69-86, 1983.
35. Holden CEA. The role of blood supply to soft tissue in the healing of diaphyseal fractures. *J Bone Joint Surg.* 54-A: 993-1000, 1972.
36. Rhinelander FW. The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. *J Bone Joint Surg.* 50-A: 784-800. 1968.
37. Strachan RK, McCarthy I, Fleming R, Hughes SPF. The role of the tibial nutrient arter. *J Bone Joint Surg.* 72-B: 391-394, 1990.

38. Rhinlander FW. The blood supply of the limb bone. In : Scientific foundation of orthopaedics and travmatology. Eds. Owen R., Goodfellow J., Bulloough P. London, William Heinemann, 1980. pp. 126-151.
39. Urist MR, Dowell TA., Hay PH. et al. Inductive substrated for bone formation. *Clin Orthop*. 59: 59-72, 1968.
40. Burchard H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop*. 174: 29-42, 1983.
41. Enneking WF, Burchard H, Puhl JJ, et al. Physical and biologycal aspects of repair in dog cortical bone transplants. *J Bone Joint Surg*. 57-A: 232-257, 1975.
42. Urist MR. Practical application of basic research on bone graft physiology. Instruct Course Lect. 25: 1-12, 1976.
43. Reddi AH. Biologic principles of bone induction. *Clin Orthop North Am.* 2:207-212, 1987.
44. Rath NC, Reddi AH. Collageneus bone matrix is a local mitogen. *Nature*. 278:855-857, 1979.
45. Urist MR. Osteoinduction undemineralized bone implants modified by chemical inhibitors endogenous matrix enzymes. *Clin Orthop*. 87: 132-144, 1972.
46. Reddi AH. Cell Biology and biochemistry of endochondral bone development. *Cell Rel Res*. 1:209-226, 1979.
47. Abbott LC, Schottstaedt ER, Saunders JB, et al. The evaluation of cortical and cancellous bone as grafting material. *J Bone Joint Surg*. 29:381-414, 1947.

48. Deleu J, Trueta J. Vascularization of bone graft in the anterior chamber of eye. *J Bone Joint Surg.* 47-B: 319-329, 1965 .
49. Heslop BF, Zeis I.M, Nisbet NW. Studies on transference of bone. *Br J Exp Pathol.* 41: 269-277, 1960.
50. Anderson KJ, LeCocq JF, Akeson WH, et al. End-point result of processed heterogenous, autogenous and homogenous bone transplants in the human. *Clin Orthop.* 33: 220-236, 1964.
51. Stringa G. Studies of the vascularization of bone grafts. *J Bone Joint Surg.* 39-B: 395-406, 1957.
52. Keith CL, Gutentag J, Glover G.M. Localization of isotopes in bone grafts by autoradiography. *Plast Reconst Surg.* 14: 425-431, 1954.
53. Zeis M, Nisbet NW, Heslop BF. Studies on transference of bone. Vascularization of autologous and homologous implant of cortical bone in rate *Br J Exp Pathol.* 41:345- 352, 1960.
54. Amsel S, Dell ES. Bone marrow repopulation of subcutaneously grafted mouse femurs. *Proc Soc Exs Bio Med.* 138:550-559, 1971.
55. Urist MR, McLean FC. Osteogenic potency and new-bone formation by induction in transplant to the anterior chamber of eye. *J Bone Joint Surg.* 34A: 443-470, 1952.
56. Hammack BL, Enneking WF. Comparative vascularization autogenous and homogeneous bone transplants. *J Bone Joint Surg.* 42-A: 811-817, 1960.

57. Enneking WF, Eady J.L, Burchard H. Autogeneous cortical bone grafts in the construction of segmental defects. *J Bone Joint Surg.* 62A: 1039-1048, 1980.
58. Stevenson JS, Bright RW, Dunson GL, Nelson FR. Technetium-99 phosphate bone imaging. *Radiology.* 110: 391-398, 1973.
59. Basset CA. Clinical implication of cell function in bone grafting. *Clin Orthop.* 87: 49-55, 1972.
60. Ottolenghi CE. Massif osteoarticular bone grafts .Technic and result of 62 cases. *Clin Orthop.* 87: 156-164, 1972.
61. Tona EA, Cronkite EP. Cellular response to fracture studied with tritiated thymidine. *J Bone Joint Surg.* 43A: 352-358, 1961.
62. Buring K. Orgine of cell heterotopic bone formation. *Clin Orthop.* 110:293-299 1975.
63. Burwell RG. An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow containing bone grafts. *J Bone Joint Surg.* 46B: 110-140, 1964.
64. Burwell RG. Fate of bone grafts. In: Recent advances in orthopaedics. Ed. Apley A.G. London, J and A Churchill Ltd, 1969. pp 115.
65. Burwell RG. The function of bone marrow in the incorporation of bone graft. *Clin Orthop.* 200: 125-140, 1985.
66. Chalmers J, Gray DH, Rush J. Observation in the induction of bone in soft tissues. *J Bone Joint Surg.* 57B: 36-44, 1975.

67. Langer F, Czitron A, Pritzker KP, et al. The immunogenicity of fresh and frozen allogenic bone. *J Bone Joint Surg.* 57A: 216-220, 1975.
68. Bos GD, Goldbert VM, Powel AE , et al. The effects of histocompatibility matching on canine frozen bone allografts. *J Bone Joint Surg.* 65A: 89-96, 1983.
69. Burchard H, Glowczewskie FP, Enneking WF. Allogenic segmental fibular transplants in azathioprine immunosuppressed dogs. *J Bone Joint Surg.* 59A: 881-894, 1977.
70. Bonfiglio M, Jeter WS. Immunological response to bone. *Clin Orthop.* 87:19-27, 1972.
71. Elves MW, Prat IM. The pattern of new bone formation in isografts of bone. *Acta Orthop Scand.* 46:549-456, 1975.
72. Anderson KJ. The behavior of autogenous and homogenous bone transplants in the anterior chamber of the rat's eye: A hitological study of the effect of the size of the implant. *J Bone Joint Surg.* 43A: 980-994, 1961.
73. Heiple KG, Chase SW, Herndon CH. A Comparative study of the healing process following different types of bone transplantasyon. *J Bone Joint Surg.* 45A: 1593-1613, 1963.
74. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autograft and allograft . *Clin Orthop.* 224: 7-16, 1987

75. Imamaliev AS. The preparation, preservation and transplantation of articular bone and. In: Recent advances in orthopaedics. Ed. Apley GA. Baltimore, Williams & Wilkins, 1969.
76. Friedlander EG. The biological consequence of immunological events. *J Bone Joint Surg.* 73-A: 1119-1122, 1991.
77. Horowitz MC, Friedlander EG. Induction of specific T-cell responsiveness to allogeneic bone. *J Bone Joint Surg.* 73-A: 1157-1168, 1991.
78. Boby C, Thompson JR, Pickvance EA, et al. Fractures large- segment allografts. *J Bone Joint Surg.* 75-A: 1663-1763, 1993 .
79. Auorori BF, Weierman RJ, Lowel H.A, et al. Pseudartrosis after spinal fusion for scoliosis. *Clin Orthop.* 199: 153-158, 1985.
80. Osawa M, Hara H, Ichinose Y, et al. Cranioplasty with a frozen and autoclaved bone flap. *Acta Neurochir.* 102: 38-41, 1990 .
81. Köhler P, Kreicbergs A, Strömberg L. Physical properties of autoclaved bone. *Acta Orthop Scand.* 57: 141-146, 1986.
82. Köhler P, Kreicbergs A, Strömberg L. Incorporation of nonviable grafts. *Acta Orthop Scand.* 58:54-60, 1987.
83. Goldberg VM, Stevenson S. Bone transplantasyon. In : Surgery of the musculoskeletal surgery. Ed. by Evarts CM. New York Churchill Livingston, 2. Edit.1990. vol. 1: 115-149
84. Nakanishi K, Sato K, Sato T, et al. Preservatinon of bone morphogenetic protein in heat-treated bone. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 66(9): 949-955, 1992.

85. Yalnız E, Aktaş Ş, Hüseyinova G, Kayapınar R. Otoklavizasyon ve dondurma işleminin tavşan kemik dokusunda oluşturduğu değişiklikler. *Acta Orthop Travmatol Turc.* 1:63-66, 1995.
86. Johnston JO, Harries TJ, Alexander CE, Alexander A.H. Limb salvage procedure for neoplasms about the knee by spherocentric total knee arthroplasty and autogenous autoclaved bone grafting. *Clin Orthop.* 181:137-145, 1983.

