

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**KONTROLLÜ BMP SALAN DİSTRAKTÖR İLE DİSTRAKSİYON
OSTEOGENEZİ HIZLANDIRILABİLİR Mİ?**

Dr. Ersoy KONAŞ

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

UZMANLIK TEZİ olarak hazırlanmıştır

171496

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Emin Mavili**

**ANKARA
2006**

Bu çalışma jürimiz tarafından Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Emin Mavili
(Hacettepe Üniversitesi) İmza

Üye : Prof. Dr. Abdullah Keçik
(Hacettepe Üniversitesi) İmza

Üye : Prof. Dr. Yücel Erk
(Hacettepe Üniversitesi) İmza

Üye : Prof. Dr. Figen Özgür
(Hacettepe Üniversitesi) İmza

Üye : Prof. Dr. Tunç Şafak
(Hacettepe Üniversitesi) İmza

TEŞEKKÜR

Yazar bu çalışmanın gerçekleőmesinde katkılarından ötürü aőađıda adı geçen kiői, kurum ve kuruluőlara içtenlikle teşekkür eder.

Ümed Tıbbi Cihazlar Ltd. Őirketi ve bünyesinde Sayın Haluk Pekgöz distraktörlerin teminini sađlamıőlardır.

Bu alıőma, Hacettepe Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenmiőtir.



ÖZET

Bu çalışmada, kontrollü BMP salan distraktör kullanılarak distraksiyon osteogenezinin distraksiyon ve konsolidasyon evrelerinin kısaltılması ile hızlandırılıp hızlandırılmayacağını araştırılması amaçlanmıştır.

Plastik cerrahi tedavi teknikleri içerisinde distraksiyon osteogenezi, kraniyofasiyal iskeletin hipoplazi ya da defektlerinin tedavisinde giderek önem kazanan bir yer almıştır. Travma, gelişimsel anomaliler, enfeksiyon, geçirilmiş tümör cerrahisi kraniyofasiyal iskelette kemik doku eksikliğine neden olabilmektedir. Sözü edilen eksiklik; yıllar boyunca otogreft, allogreft, metal, seramik gibi sentetik materyaller ve büyüme faktörlerinin kullanımı gibi yöntemlerle giderilmeye çalışılmıştır. Sayılan yöntemlerin her birinin kendine özgü sorunları bulunmaktadır. Distraksiyon osteogenezi, klasik kraniomaxillofasiyal rekonstrüksiyon yöntemlerine oranla daha az invaziv olup aynı zamanda daha az morbiditeye neden olmaktadır. Ayrıca kemik doku onarımı esnasında yumuşak doku harabiyeti en az düzeyde tutulabilmekte ve greftli onarımlarda oluşan donör saha morbiditesi ortadan kalkmaktadır. Sayılan tüm bu avantajlara karşın halen yöntemin en önemli dezavantajı tedavi süresinin uzunluğudur. Tedavi süresinin kısaltılması amacıyla değişik teknik ve tedavi yöntemleri gerek distraksiyon, gerekse konsolidasyon evrelerine yönelik olarak denenmiş, ancak etkin kemikleşmeyi de sağlayacak şekilde süreyi kısaltan bir yöntem geliştirilememiştir.

Buradan yola çıkarak distraksiyon sürecinde kontrollü ilaç salım sistemi taşıyan distraktör kullanılarak distraksiyon zonuna uzun sürede etkiyecek *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2) salınmasının hem distraksiyon süresinin, hem de konsolidasyon süresinin kısaltılmasını sağlayacağı düşünülmüştür. Bu amaçla 20 adet Wistar-Albino sıçan, sağ femurlarına distraksiyon osteogenezi uygulanmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Her iki gruba da günde 1mm olmak üzere toplam 8mm distraksiyon uygulanmış, deney grubundaki sıçanların distraksiyon hattına her gün belirli miktarda kontrollü BMP-2 salan jel yerleştirilmiştir. Distraksiyonun sonlandırıldığı gün ve 30.gün radyografik, yine

30. gün histolojik veriler toplanmıştır. Histolojik veriler, kemik iyileşmesine yönelik bir skora sistemi ve radyografik veriler ise imaj analiz programı ile değerlendirilmiştir.

Araştırmanın sonucunda; distraksiyon osteogenezinde, distraksiyon esnasında oluşturulan kemik defekt alanına, kontrollü osteoindüktif ajan salınmasının sadece distraksiyon uygulanmasına göre daha etkin kemikleşme sağladığı saptanmıştır. Radyolojik ve histolojik veriler, iyileşmenin deney grubunda daha hızlı olduğunu göstermiştir.



ABSTRACT

The aim of this study is to investigate whether distraction with controlled BMP releasing distractor increases distraction osteogenesis rate by means of decreasing distraction and consolidation periods.

Distraction osteogenesis is a well-established and widely accepted technique for bone lengthening and defect filling. The technique has widespread clinical applications in hypoplastic skeleton, cancer surgery, craniofacial anomalies, trauma treatment, traumatic growth disturbances, limb deformities, and non-union. Distraction osteogenesis has several advantages over conventional techniques, including less invasive intervention, easier control of infection and minimal donor site morbidity. However, long period of rigid fixation is the most important disadvantage of this technique. Any decrease of the distraction period would improve patient comfort and compliance. Previous attempts at shortening the distraction osteogenesis duration, by increasing the rate of distraction phase, have been unsuccessful and associated with high incidence of bony non-union.

The drug delivery concept is rapidly developing area of pharmaceutical biotechnology. With the widespread use of biodegradable, biocompatible polymeric materials, substances have been delivered localized areas or specific organs in the body, thus avoiding systemic toxicity and the need for higher quantities of the desired drug to achieve therapeutic levels at the site of action.

In 20 adult Wistar-Albino rats, weighing between 350- 400 gr right femoral osteotomies at diaphyseal region have been performed. All rats are divided in to two groups, distraction only group and BMP releasing group. Controlled drug releasing unit containing costume made distractors have been mounted to the femur. Three days of latent period, the femur has been distracted 8mm in 8 days with the distraction of 1mm per day.

After 4 weeks of consolidation period biopsies have also been performed. Ossification at the distraction zone assessed by means of histological and radiographic analysis.

Radiological analysis demonstrated that although there was no difference on eighth day between two groups, BMP releasing group showed better ossification than the control group at the end of the consolidation period. Histological analysis of the BMP- releasing group also exhibited better ossification than the control group between the distracted segments. These findings suggest, controlled BMP-2 releasing into the distraction zone facilitates and increases the rate of ossification.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Onay Sayfası	iii
Teşekkür	iv
Özet	v
İngilizce özet	vii
İçindekiler	ix
Simgeler ve kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Tablolar	xii
Giriş	1
Genel Bilgiler	3
2.1. Kemik Dokusu	3
2.2. Histogenez	5
2.3. Distraksiyon Osteogenezi	6
2.4. Distraktörler	8
2.5. Osteoindüktif ve Osteokondüktif Ajanlar	9
2.6. Kitosan	20
Gereç ve Yöntem	23
3.1. Deney Grupları	23
3.2. Kontrollü Salım Sistemi İçeren Distraktör	24
3.3. Deney Planı	27
3.4. Cerrahi Yöntem	28
3.5. Postoperatif Süreç	33
3.6. Histolojik Gereç ve Yöntem	33
3.7. Radyolojik Gereç ve Yöntem	36
3.8. İstatistiksel Gereç ve Yöntem	37
Sonuçlar	38
4.1. Histolojik Bulgular	38
4.2. Radyolojik Bulgular	43
4.3. İstatistiksel Değerlendirme	45
Tartışma	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

DO	: Distraksiyon Osteogenezi
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
BMP-2	: Bone Morphogenetic Protein-2
BMP-4	: Bone Morphogenetic Protein-4
BMP-6	: Bone Morphogenetic Protein-6
BMP-7	: Bone Morphogenetic Protein-7
TGF	: Transforming Growth Factor
TGF- β	: Transforming Growth Factor- β
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
ILGF	: Insulin Like Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FGF-2	: Fibroblast Growth Factor -2
LMP-1	: LIM Mineralising Protein-1
VGEF	: Vascular Endothelial Growth Factor
GDF-5	: Growth Differentiation Factor-5
kD	: Kilodalton
PGE-1	: Prostaglandin E-1
IL-2	: Interleukine 2
kGy	: Kilogray

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1.: BMP, hücre içi sinyal iletim sisteminin şematik görünümü	16
2.2.: BMP-4 sinyalizasyonunda chordin inhibisyonu.	17
2.3.: Kitosanın kimyasal yapısı	20
2.4.: Değişik konsantrasyonlu jel formda kitosan	21
3.1.: Kontrollü ilaç salan distraktör	25
3.2.: Distraksiyon ile kontrollü ilaç salımı	26
3.3.: Planlanan insizyon hattı	29
3.4.: Kasların ayrılması.	29
3.5.: Distraktör plaklarının vidalanışı	30
3.6.: Distraktörün implantasyonu	31
3.7.: Separatör yardımıyla femurun osteotomize edilişi.	31
3.8.: Osteotomize segmentlerin birbirinden ayrılışı.	32
3.9.: Kas onarımı	32
3.10.: Radyografik örnekleme.	36
4.1.: Kontrol grubuna ait mikrograflar.	39
4.2.: Deney grubuna ait mikrograflar.	40
4.3.: Deney grubuna ait elde edilen mikrograflar.	41
4.4.: Kontrol grubunda kemikleşmeye dair radyolojik bulgular	44
4.5.: Deney grubunda kemikleşmeye dair radyolojik bulgular	45
4.6.: Gruplar arası zaman bağımlı kalsifikasyon düzeyleri.	46
4.7.: Gruplar arası histolojik skorların karşılaştırılması.	47
4.8.: Gruplar arası 8.gün radyografilerinin karşılaştırılması .	47
4.9.: Gruplar arası 30. gün radyografilerinin karşılaştırılması.	48

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1.: Değişik Kemik Greftleri ve Kemik Greft Öncüleri	11
3.1.: Deney grupları.	24
3.2.: Histolojik skorlam; "kemik defektlerinin onarımı".	35
3.3.: Histolojik skorlama; "biyomalzemeye doku yanıtı".	35
4.1.: Defekt iyileşmesi ve biyomalzemeye doku yanıtı.	43



GİRİŞ

Kemik, skarsız olarak rejenere olabilen dinamik bir dokudur. Travma, gelişimsel anomaliler, enfeksiyon, geçirilmiş tümör cerrahisi kemik dokuda eksikliğe neden olabilmektedir. Sözü edilen eksiklik; yıllar boyunca otogreft, allogreft, metal seramik gibi sentetik materyallerin ve büyüme faktörlerinin kullanımı gibi yöntemlerle giderilmeye çalışılmıştır. Uygulama zorluğu, donör alan morbiditesi, defektin genişliği, enfeksiyon riskini arttırmaları, hasta uyumunun güçlüğü bu yöntemlerin başlıca sakıncalarını oluşturmuştur. Kemik dokusunun replasmanındaki bu güçlükler, 1990 yılında fasiyal bölgeye ilk uygulanişından sonra, distraksiyon osteogenezini bu bölgede her geçen gün daha yaygın kullanılabilir hale getirmiştir.

Distraksiyon osteogenezi (DO), mekanik gerim kuvveti uygulayarak canlının belli bir lokalizasyonundaki kemik dokusunun daha büyük boyutlara ulaştırılması esasına dayanmaktadır. Osteotomi sonrası serbest kemik uçları arasındaki boşluk sürekli genişletilerek kemik rejenerasyonu ve ossifikasyonu sağlanır.

Distraksiyon osteogenezindeki uzun tedavi sürecinin kısaltılması amacıyla yapılan hızlı distraksiyon sonucu mal-union ve non-union oluşması nedeniyle kallus iyileşmesi üzerine odaklanılmıştır. Bunun için; süregen distraksiyon, distraksiyon-kompresyon siklusları ile mekanik stimülasyon, ultrasonografi, elektrostimülasyon, büyüme faktörü enjeksiyonları, hücre transplantasyonları gibi yöntemler denenmiştir. Bahsedilen tekniklerin bazılarının uygulama zorluğu, enfeksiyon riskini arttırmaları, hasta uyumsuzluğu, beklenen etkinliğin sağlanamaması gibi sorunlara neden olduğu bilinmektedir. Uygulanan yöntemlerin neden olduğu sorunlar yeni teknik arayışlarına neden olmuştur. İdeal teknik, daha hızlı, etkin, komplikasyon oranı düşük, maliyeti az ve hasta uyumunun maksimum düzeyde sağlanabileceği bir tedavi yöntemini sağlamalıdır.

Etkin hızlanma için distraksiyon ve konsolidasyon süreçleri kısaltılmalıdır. Daha hızlı distraksiyon uygulanişını sırasında oluşan fibröz

union veya non-union, belirgin osteoindüktif etkinliği olan “Bone Morphogenetic Protein” (BMP) desteği ile kısmen aşılabilmekle birlikte, biyolojik sistemlerde BMP'nin hızlı yıkımı konsantrasyonunun azalmasına ve buna bağlı olarak etki süresinin kısılmasına neden olmaktadır. Bu durumda, daha etkin kemikleşme sağlanabilmesi için distraksiyon alanına sürekli BMP verilme ihtiyacı doğmaktadır. Distraksiyon alanına BMP'nin sık enjekte edilmesi hasta uyumunun düşüklüğü ve osteomyelit riskinin yüksekliği nedeniyle pratik uygulamada kabul görmemektedir. Ancak ortama sürekli ve kontrollü BMP salımının sağlanacağı bir sistem geliştirilmesi, segmentlerin daha hızlı distrikte edilirken kemikleşmenin de hızlı olması nedeniyle non-union oluşumunun önüne geçilebilmesini sağlayacaktır.

Bu bilgiler ışığında distraksiyon sürecinde geliştirilen distrikteör ile distraksiyon alanına uzun süreçte etkiyecek BMP salınmasının hem distraksiyon sürecini, hem de konsolidasyon sürecini kısaltacağı düşünölmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, önceki araştırmalardan osteoindüktif etkisi bilinen BMP'nin sürekli salım halinde hızlandırılmış distrikteyonda kemik iyileşmesi üzerindeki etkinliği araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik Dokusu:

Kemik iyileşmesi, skar dokusu gelişmeden doku rejenerasyonunun olması bakımından, benzersiz dinamik bir mekanizmadır. Kemik, değişen fonksiyonel ihtiyaçlara ve mekanik streslere adapte olup yapısını değiştirebilen bir dokudur (1). Kemik dokusu değişen vasküler, endokrin ve beslenme düzeylerine adapte olabilmektedir. Kemik dokusunun bir özelliği de en sık transplante edilen doku olmasıdır. Kemik iyileşmesinin fizyolojisini bilmek, cerraha uygulayacağı cerrahi tekniği seçmede, donör sahanın tercihinde, uygulanacak kemiğin hacminin belirlenmesinde ve kalıcı güvenilir sonucu almada yardımcı olacaktır.

Kemik Dokusunun Histolojik ve Ultrastrüktürel Olarak İncelenmesi:

Kemik, hücreler arası maddenin kalsifiye olduğu özel bir bağ dokusudur. Yapısında üç ayrı hücre tipi bulundurur: Bu hücreler, matriksin laküna olarak adlandırılan kavitelerinde konuşlanmış olan osteositler, matriksin organik kısımlarının sentezini gerçekleştiren osteoblastlar ve kemik dokusunun rezorpsiyonu ve yeniden şekillenimini sağlayan çok nüveli dev hücre olan osteoklastlardır.

Kemik dokusunun %70'i inorganik bileşiklerden oluşup, bunların başında kalsiyum hidroksiapatit gelir. Kemik dokusunun %30'luk organik kısmını ise kollajen ve osteoid oluşturmaktadır. Organik ve inorganik kısım arasındaki denge kemiğin hücresel elemanları tarafından kontrol edilmektedir.

Osteoprogenitör mezenkimal hücrelerden köken alan osteoblastlar, osteoid adı verilen organik, kollajenden zengin kemik matriksini sentezlerler. Bu kemik matriksin mineralizasyonu osteoblastlar tarafından regüle edilen, ekstraselüler bir işlemdir. Kollajenden zengin matriks, başta bone morphogenic protein(BMP) olmak üzere kemiğin osteoindüktif özelliklerini belirleyen pek çok büyüme faktörünü içerir (2, 3, 4). Osteoblastlar, kemik matriksinin mineralizasyonunu, parakrin etki gösteren bu büyüme faktörlerini salgılayarak kontrol ederler (5).

Matürasyonunu tamamlayarak lakünalar ile çevrilen osteoblastlar osteosit adını alırlar. Osteositler, kanaliküller içinde uzanan sitoplazmik uzantılarını birbirine bağlayan *gap junction*'lar sayesinde iyon, hormon, besin maddelerinin akışını sağlar ve birbirleriyle haberleşir.

Osteoklastlar kemik iliğindeki monositlerden köken alırlar. Fizyolojik olarak bu hücreler kollajenaz ve proteolitik enzimler salgılayarak kemik matriksini yıktıklarından osteoblastların antagonisti olarak görev yaparlar.

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan tabakalarla örtülüdür. Dıştaki örtücü tabakaya periosteum, içteki örtücü tabakaya ise endosteum denir. Periost iki tabakadan oluşur. Dıştaki tabaka kambiyum tabakası adını alır. Periosteum, kollajen kaynaklı Sharpey fibrilleri ile kortikal kemiğe bağlanır. Bu fibriller kas ve tendonların kemiğe bağlanmaları için de zemin hazırlar. Periost, sekonder veya indirek kemik iyileşmesinde kırık hematomundaki *pluripotent* mezenkimal hücrelerin fenotipik değişiminden sorumludur. Özellikle mikro hareketlerin engellenemediği kallus formasyonu ile iyileşen kemik kırıklarındaki temel mekanizma bu sekonder iyileşme esasları ile açıklanmaktadır. Kemikler arasında mikro hareketlerin tamamen ortadan kaldırıldığı rijit fiksasyon uygulanan sistemlerde ise primer, vasküler veya direkt kemik iyileşmesi olarak adlandırılan, direkt aksiyel osteonun oluştuğu iyileşme paterni gözlenir. Cerrahi işlemlerde periost korunarak subperiosteal yapılan diseksiyonlar sonrasında cerrahi işlemi takiben kemik üzerinin periost ile örtülmesinin kemik iyileşmesini iyi yönde etkileyeceği düşünülmektedir.

Endosteum, kemiklerin iç yüzeylerini kaplar ve biyolojik olarak periosteum ile aynı yapıdadır. Kemik içindeki tüm boşlukları örter ve tek katlı yassı osteoprogenitör hücreler ile çok az miktarda bağ dokusundan oluşur. Endosteum ve periosteumun temel işlevleri, kemik dokusunun beslenebilmesi ve onarımı için gerekli yeni osteoblastların sürekli üretilmesidir.

Kemik dokusuna yönelik çalışmalarda sık kullanılan kemik iyileşmesi ile ilgili bazı kavramların tanımları şunlardır:

Osteogenezis: Yeni kemik oluşumu,

Osteoindüksiyon: Matriksin (greftin) yapısındaki biyokimyasal faktörlerin etkisiyle mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik hücrelere dönüşmesi,

Osteokondüksiyon: Matriksin (greftin) osteojenik differansiyasyona başlamış mezenkimal kök hücrelerine etki ederek revaskülarizasyonu, rezorpsiyonu ve yeniden yapılanmayı indüklemesi (150-500µm'lik birbiri ile ilişkili gözeneklere sahip olması),

Osteointegrasyon: Uygulanan matriks (greft) ile alıcı kemik arasında bütünlüğün sağlanması (5, 6).

2.2 Histogenez:

Kemik dokusu iki yolla şekillenir: osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu (intramembranöz kemikleşme) veya daha önce var olan kıkırdak matriksin üzerine kemik matriksinin çöküşü ile (endokondral kemikleşme)

Mezenkimal (Intramembranöz) Kemikleşme: Pek çok yassı kemiğin kaynaklandığı intramembranöz kemikleşmeye mezenkimal doku yoğunlaşmaları içinde olduğu için bu ad verilmiştir. Bu tür kemikleşmede geçici kıkırdak çatı olmaksızın bir zarın içinde mezenkimal hücre organizasyonu ile kemik gelişimi gerçekleşir (7, 8). Mezenkimal kemik oluşumu kafa kaidesinin lateral kesimlerinde mezenkimal hücrelerin yoğunlaşması ile başlar. Mezenkimal hücre organizasyonu ile osteojenik aktiviteye sahip hücreler orta hatta doğru ilerler. Bu mezenkimal hücrelerden köken alan osteoblastlar kemik matriksi sentezler. Bu matriks içinde gömülen osteoblastlar diferansiye olarak osteositlere dönüşür. Her iki taraftan ilerleyen kemik oluşumu orta hatta sütür hattını oluşturur (9). Kafa kaidesi kemikleri, frontal ve paryetal kemikler, yüz kemikleri, maksilla ve mandibulanın bir kısmı intramembranöz olarak kemikleşir. Intramembranöz kemikleşme kısa kemiklerin büyümesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında rol almaktadır.

Endokondral Kemikleşme: Bu tür kemikleşmede kemik hiyalin kıkırdak çatının içerisinde gelişmektedir. Mezenkimal hücre organizasyonu ile ilk olarak kondrositler gelişir. Çatının merkez kesimine yerleşimli kondrositler aktif olarak bölünerek çoğalırlar. Daha perifer yerleşimli kondrositler ise mitotik aktivite göstermeyen hipertrofik kondrositlerdir. Kondrositlerin bu sıralı dizilimi epifizyal büyüme plağı olarak adlandırılır. Epifizyal büyüme plağının distal kesiminde yer alan kondrositler kendilerini çevreleyen ekstraselüler matriksi mineralize eder. Bu alanı çevreleyen ince mezenkimal hücre tabakasından (periost) köken alan hücreler (osteoblastlar), osteoklastlar ve kan damarları, epifizyal büyüme plağının distal kesimindeki mineralize matriksi işgal eder. Osteoklastlar hipertrofik kondrositlerin sentezlediği matriksi parçalarken osteoblastlar kemik matriksi sentezler. Bu sayede kemikleşme tamamlanır (9). Aksiyel kemikler, kafa tabanı kemikleri, mandibulanın bir kısmı endokondral kemikleşir.

2.3 Distraksiyon Osteogenezi:

Distraksiyon osteogenezinde sağlıklı kemik yüzeylerinin birbirinden kontrollü uzaklaştırılmasıyla yeni kemik dokusunun oluşturulması sağlanmaktadır.

İlk ekstremitte uzatma işlemi 20.yy'ın başlarında elektif osteotomi ve eksternal distraksiyon uygulanarak Codivilla tarafından yapılmıştır (10). Putti 1921'de tek taraflı femoral uzatma amaçlı sürekli kemik uçlarını birbirinden ayıran bir gereç geliştirmiştir (11). Codvillanın çalışmaları uzun yıllar bir köşede kalmış, yaygın olarak klinik uygulamaya aktarılmamıştır. Bu deneyimden yaklaşık 30 yıl kadar sonra bir Rus ortopedist olan Gavriil Ilizarov'un tekniği geliştirmesi, metodun yararlarının 15000'den fazla hastada gösterilmesi, sözü edilen tekniğin tüm dünyada kabul görmesini sağlamıştır (12, 13, 14, 15).

Distraksiyon osteogenezinin kraniofasial alanda kullanımı 1972'de Snyder'ın Swenson eksternal fiksator ile köpek mandibulasında oluşturduğu 1.5cm'lik defekti DO ile doldurmasına dayanmaktadır (16). Distraksiyon osteogenezinin insanda kranio-maksillofasial cerrahi alanında ilk uygulanması 1989'da McCarthy ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (17). Takip eden yıllarda bu teknik, kraniofasial cerrahide ise son 15 yıldır tümör cerrahisi, travmaya sekonder oluşan defektlerin tedavisi ve hipoplastik iskeletin rekonstrüksiyonunda başarı ile kullanılmaktadır.

Distraksiyon osteogenezi ile kemik doku rekonstrüksiyonu süreci üç evrede gerçekleşmektedir.

Latent dönem: Osteotomi uygulanımından distraksiyona kadar geçen süre, latent dönem olarak ifade edilmektedir (18). Literatürde maksillofasial distraksiyon osteogenezi sürecinde 0-14 gün arasında , sıçanlar için ise 3 ile 5 gün arasında değişen latent dönem uygulamaları bildirilmiştir.(18, 19).

Distraksiyon dönemi: Belirli aralıklarla, belirli miktarda ve belirli süre distraksiyonun yapılmış olduğu evredir. Yine literatürde deneydel çalışmalar için sıçanlarda 0,25-3mm arasında değişen günlük distraksiyon hızları uygulandığı vurgulanmaktadır (19).

Konsolidasyon dönemi: Distraksiyon sonrası distraksiyon alanında yeni kemik oluşumunun gerçekleştiği evredir. Konsolidasyon süresi, distraksiyon evresinin sona ermesinden itibaren yeni oluşan kemiğin kemiğin fonksiyon görebilecek düzeyde olgunlaşmasına kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır (20).Sıçanlarda yürütülen deneysel çalışmalarda 1-6 hafta arasında değişen uygulamalar gözlenmektedir (19).

Distraksiyon osteogenezi(DO) sonrası distraksiyon alanındaki kemik rejenerasyonunu etkileyen birkaç faktör vardır. Bu etkenler arasında, latent dönemin uzunluğu, distraksiyon hızı, distraksiyon frekansı, distraktörün stabilitesi, hastanın yaşı, metabolik ve endokrinolojik durumu (rikets, hipokalsemi), distraksiyon bölgesinin vaskülaritesi, kemik uçlarının yaşamsallığı, kemik üzerindeki mekanik yük, distraktörün çıkarılma zamanı ve kas prolapsusu gibi çevresel faktörler sayılmaktadır (21, 22).

DO'nin serbest kemik grefti uygulama tekniklerine düşük enfeksiyon riski ve neredeyse sınırsız denilebilecek kemik dokusu sağlaması gibi üstünlükleri olmasına rağmen en önemli dezavantajı ise tedavi süresinin oldukça uzun olmasıdır. Sürenin uzun olmasındaki en önemli faktör ise konsolidasyon süresinin uzun olmasıdır.

Tedavi süresinin uzunluğuna katkıda bulunan bir diğer etken ise yavaş distraksiyon uygulamasıdır. Hızlı uzatma ile kıyaslandığında yavaş distraksiyon ile hücresel gen ekspresyonunun arttığı, bunun da hücre dışı matriks ürünlerinin sentezinin artışına katkıda bulunduğu bildirilmektedir (23).

2.4 Distraktörler:

Geçtiğimiz iki dekat boyu distraksiyon osteogenezi pek çok araştırmaya konu olmuş ve değişik distraksiyon modelleri ve distraktör çeşitleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında; süregen distraksiyon, iki boyutlu ,üç boyutlu distraksiyon, eş zamanlı çoklu yönelimli distraksiyon, ikili odaklı, üçlü odaklı, dörtlü odaklı distraksiyonlar sayılabilmektedir (24, 25).

Distraktörlerler implantasyon yerlerine göre internal ve eksternal olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Eksternal distraktörlerin distraksiyon kolları ve distraksiyon mekanizmaları vücut dışarısında olup kemik tesbitleri cildi veya mukozayı delerek kemiğe giren millerle sağlanmaktadır. Internal distraktörler ise doku içerisinde distrakte edilecek kemik üzerine yerleştirilmektedirler. Internal distraktörlerin distraksiyon mekanizmaları doku içerisinde yerleşmiş olup distraksiyon kollarının uç kısmı dış ortama uzanmaktadır. Klinikte internal distraktörlerin kullanılmasının birtakım avantajları vardır. Bunlar arasında, travmaya ve enfeksiyon gelişimine açık olmaması, daha az skar bırakarak estetik sonuçlarının daha iyi olması, hastanın günlük aktivitesini engellememesi, bu sayede iş gücü kaybının ve dolayısıyla maliyetinin daha az olması ve eksternal distraktörlere göre daha stabil olması sayılabilmektedir (26, 27, 28). Eksternal distraktörlerin ise çoklu yönelimli ve çoklu odaklı distraksiyona olanak sağlamaları gibi avantajları vardır.

Bu alanda mekanik teknolojiden de faydalanılarak uzaktan kumanda edilebilen mikrohidrolik distraktörler, distraksiyon kuvvetinin kemiğe distraksiyonun yapıldığı ilk anda değil, süregelen uygulanımını amaçlayan yaylı distraktörler geliştirilmiştir (29, 30). Son olarak rezorbe olabilen materyalden üretilen tek basamaklı distraktör geliştirilerek klinikte uygulanmıştır (31). Emilebilir materyal kullanılarak üretilen distraktörün ikinci bir ameliyatın maliyetini ve muhtemel morbiditesini ortadan kaldırması araştırmacıların bu alana ilgilerinin artmasına neden olmuştur. Ancak bu teorik avantajlar, uygulanan distraktörlerin çok geç emilmesi nedeniyle geri planda kalmıştır. Hatta bu nedenle sözü edilen araçlar klinikte henüz yaygın kullanım alanı bulamamışlardır.

2.5 Osteoindüktif ve Osteokondüktif Ajanlar:

Kemik rekonstrüksiyonunda egzojen doku kaynaklı greft materyalleri arasında çeşitli işlemlerden geçirilerek hazırlanan kemik allogreftler en yaygın kullanılan materyallerdendir. Literatürde hazırlanma şekillerine göre dört çeşit allogreft tanımlanmıştır: a) taze dondurulmuş, b) dondurularak kurutulmuş, c) demineralize, d) çözücü ile dehidrate edilmiş kemik allogreftleri (32). Allogreftlerin üstünlükleri ameliyat ve anestezi süresini kısaltması, kemik grefti alınımının getirdiği morbiditeyi ortadan kaldırması (ek cerrahi skar, ameliyatın uzaması, kan kaybı, donör saha enfeksiyon riski vb) ve ihtiyaca uygun şekil ve miktarda kemiğin her an bulunabilmesidir (32, 33, 34). Allogreftlerin en önemli dezavantajları arasında doku nakli ile bulaşan hastalıkların geçişi, şekillendirme imkanının kısıtlılığı ve osteoindüktif potansiyele sahip olamaması sayılabilmektedir (35).

Demineralize kemik greftlerinin BMP'lere kıyasla osteoindüktif etkileri milyonlarca kat daha düşüktür. Eşit osteojenik etkinliği sağlayacak BMP dozuna karşı kullanılması gereken demineralize kemik grefti miktarı 100 kg 'ın üzerindedir. Ayrıca bu materyallerin etkinliği, maruz kaldıkları işlemlere göre değişkenlik sergilemektedir (35).

Sentetik greft materyalleri, biyoseramikleri, kompozitleri ve polimerleri içermektedir. Seramikler kemik iyileşme sürecine sadece osteokondüktif etkileriyle katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle osteoindüktif ajanlarla kombine edilmeleri gerekmektedir. Hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat ve kalsiyumsülfat örnek olarak sayılabilmektedir. Bu sentetik malzemeler, değişik rezorbsiyon hızlarına sahip olup enjekte edilebilen çimento veya kompresyon kuvveti çok yüksek materyal formunda bulunabilmektedir (36). Trikalsiyum fosfat, hidroksiapatitten 10 ile 25 kat daha hızlı rezorbe olup daha hızlı *remodelling* sergilemektedir, ancak yapısal desteği daha zayıftır. Seramiklerin bir diğer özellikleri ise yüksek abrazyon potansiyellerinin olmasıdır. Bu nedenle eklem komşuluğunda kullanılmamalıdır. Sözü edilen özellikler bu materyallerin kullanım alanları konusunda seçici olunmasını gerektirmektedir. Kalsiyum sülfat ise yüz yılı aşkın bir süredir kullanılan ve oldukça hızlı rezorbe olan bir materyaldir. Bu özelliği nedeniyle antibiyotik ve büyüme faktörleri için taşıyıcı olarak kullanılmıştır (35).

Tablo 2.1.: Değişik Kemik Greftleri ve Kemik Greft Öncüllerinin Karşılaştırılması (Kaynak 35'ten modifiye edilmiştir).

Greft Tipi	Osteokondüksiyon	Osteoindüksiyon	Osteoprogenitör Hücre	İmmünojenite	Erken Dönemde Direnç
Taze dondurulmuş kemik allogreft	+	+/-	+/-	++	++
Dondurularak kurutulmuş kemik allogreft	+	+/-	-	+	+
Seramikler	+	-	-	-	+/-
Deminerale kemik matriksleri	+	++	-	-	-
Bone morphogenetic protein	+	+++	+/-	-	-
Kemik iliği	-	+/-	+	-	-
Kompozit greftler	++	+/-	+	-	+/-

Doku mühendisliği ile gerçekleştirilen kemik rekonstrüksiyonunda doğal ya da sentetik biyoyıkılabilir polimerlerden de faydalanılmaktadır. Kollajen (37), fibrinojen (38), kitosan (22), nişasta (39), hyalüronik asit (40), polihidroksibütirat (41) doğal biyoyıkılır polimerler olup hayvan veya bitkilerden elde edilmektedirler. Doğal polimerlerin en önemli avantajları; düşük immünojenik özellikleri, alıcı doku hücreleri ile etkileşimini sağlayan biyoaktiviteleri ve bazılarının doğada sınırsız miktarda bulunmalarıdır (42).

Sentetik biyoyıkılır polimerler biyomedikal mühendislikte en sık çalışılan alanlardan birisidir. Kimyasal kullanım amaçları ve işlenebilirlikleri yapısal düzenlerine göre değiştirilebilmektedir. Poli(α -hidroksi asit) (43, 44), poli(ϵ -caprolakton) (45, 46), poli (propilen fumarat) (47), polikarbonatlar (48), polianhidratlar (49) sık kullanılan polimerlerdir.

Kemik, kemik iliği ve yumuşak doku yaralanmaları, yaralanmanın olduğu alanda değişik hücre tiplerinin uyarılmasını tetikler. Yaralanma ile

hücrelerin diferansiyasyonunu ve ya çoğalmasını sağlayan, lokal etkili biyokimyasal ve biyofiziksel etkinliği olan birtakım mesajcı medyatörler açığa çıkar (50, 51). Böylece yaralanma bölgesinde otojen osteoindüksiyon başlamış olur.

Urist devitalize kemiğin deney hayvanlarına implantasyonunun yeni kemik oluşumunu tetikleyen hücrenel bir yanıt oluşturduğunu saptamış, ardından kemikten elde ettiği organik materyallerin bu etkiden sorumlu olduğunu göstermiştir. Daha sonra bu organik materyali "bone morphogenetic protein" olarak adlandırmıştır (52, 53, 54, 55).

Büyüme faktörleri, değişik hücre tiplerinden salınan sinyal molekülü olarak fonksiyon gören sitokinlerdir. Büyüme faktörlerine yönelik çalışmalarda kemik dokusunun gelişmesinde "Bone Morphogenetic Protein"leri (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7), "Transforming Growth Factor- β " (TGF- β), "Platelet-derived Growth Factor" (PDGF), "Insulin-like Growth Factor" (IGF), "Fibroblast Growth Factor" (aFGF, bFGF), "LIM Mineralization Protein-1" (LMP-1) gibi pekçok faktörün etkinliği gösterilmiştir (2, 56, 3, 4, 57). Ancak bu faktörlerin birbirleri ile olan ilişkileri, kemikleşme sürecinin hangi aşamalarına etki ettikleri ve etki mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yapılan çalışmalarda, adı geçen faktörler arasında BMP'lerin en yüksek etkinliği gösterdiği, TFG- β 'nın tek başına etkinliğinin fazla olmayıp daha çok BMP'lerin etkisini arttırdığı vurgulanmaktadır (58, 59, 60). BMP 'ler arasında ise BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7(Osteojenik protein-1)'in osteoindüktif potansiyeli daha fazla olarak bildirilmektedir (61, 62).

Transforming Growth Factor- β : TGF- β genel bakıldığında çok değişik biyolojik aktiviteler sergilemektedir. İn-vitro çalışmalarda hücrenel proliferasyonu arttırdığı, hücrenin hipertrofi ve diferansiyasyonunu arttırdığı bildirilmiş, ayrıca hücrenel migrasyon ve diferansiyasyonu başlatıp durdurabildiği gösterilmiştir (63). İn-vivo çalışmalarda ise TGF- β 'nın kırık hattında kallus oluşumunu arttırdığı ifade edilmektedir (64).

Insulin-like Growth Factor : IGF-I ve II iskelet dokusunda üretilen büyüme faktörlerinden olup her ikisinin de kemik metabolizmasındaki rolü aynıdır. Ancak IGF-I , IGF-II'den daha potent bir ajandır. Kemik yaralanması sonrası kırık iyileşme hattında tip I kollajen sentezini arttırmaktadırlar (65).

Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF): Vaskülaritesi yüksek olan değişik dokulardan sentezlenen ve güçlü anjiyojenik potansiyeli olan bir sitokindir (66). Kırık iyileşme hattında bulunup iyileşme alanındaki endotelial hücre regülasyonundan sorumludur (67). Ayrıca iyileşme alanındaki osteogenez ile anjiyogenez etkileşiminin regülasyonunda da rol almaktadır (42).

Fibroblast Growth Faktör-2(FGF-2) : Kemik iyileşmesinin remodelling fazında etkin olan bir diğer sitokindir. Bunun yanısıra kemik oluşumunu ve yıkımını sağlayan hücreler arasındaki hassas dengeyi regüle ettiği düşünülmektedir (68). Bir diğer özelliği ise vasküler gelişimi desteklemesidir (61).

Platelet Derived Growth Factor (PDGF): Kemik rejenerasyonunda rolü olduğu düşünülen bir sitokindir. Osteoblastlar, trombositler, monosit ve makrofajlardan sentezlenip mezenşimal kök hücrelerin yara iyileşme bölgesine migrasyonunu sağladığına inanılmaktadır (69).

Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2): Kemik matriksi, içerisinde değişik büyüme ve diferansiyasyon faktörleri de içeren değişik protein yapılar bulundurmaktadır. Urist'in araştırmalarından günümüze kadar 30 civarında BMP molekülü tanımlanmış olup bunların birkaçının (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7) belirgin osteojenik etkinliğinin olduğu ifade edilmektedir (61, 62). Bu moleküller suda çözünebilen, lokal etkili sinyal proteinleri olup değişik hücre tiplerinde değişik biyolojik aktiviteler sergileyen çok fonksiyonlu karakterdedirler. Büyüme regülasyonu, diferansiyasyon, kemotaksis,

apoptozis gibi görevlerinin yanısıra değişik doku ve organların morfogenezinde önemli rolleri vardır (70).

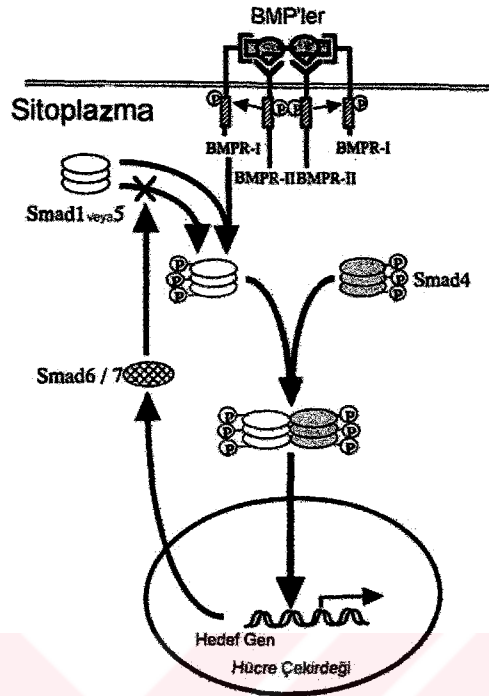
In-vitro koşullarda mezenkimal hücelere BMP uygulandığında matriks üretiminde, alkalen fosfataz düzeyinde ve tip I kollajen sentezinde artış gözlenir (71, 72). Ancak mezenkimal hücelerde sayıca artış olmaz (71). Bu nedenle BMP'ler daha çok morfojen ajan olup mitojen olarak görev yapmamaktadırlar.

BMP molekülleri, hücre üzerindeki biyolojik etkilerini kendilerine özgül transmembranöz heteromerik reseptör kompleksine bağlanarak yapmaktadırlar (52, 73, 74). Bu reseptörler aldıkları sinyalleri "Smad" olarak adlandırılan proteinler ile nükleusa taşıyarak ilgili genlerin aktivasyonuna neden olurlar.

Bone Morfogenetik Protein (BMP) aminoasit homolojisine göre Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ailesine bağlıdır. İlk defa 1960'lı yıllarda demineralize kemikten izole edilmiştir. Günümüzde 30 civarında BMP molekülü tanımlanmıştır. Bunların birkaçının belirgin osteojenik etkinliğinin olduğu ifade edilmektedir. Bu proteinler etkilerini osteoblast, osteoklast ve mezenşimal kök hücreleri içeren değişik hücre tiplerine özgül reseptörlerine bağlanarak göstermektedirler. Uyarılan reseptörler stoplazmadaki sekonder mesajcıları aktive etmektedirler. Bu mesajcılar ise nükleusta BMP yanıtı oluşturan genlerin ekspresyonunu uyarmaktadırlar. Sonuç olarak BMP reseptör uyarımı, hücreleri direk ya da indirek yoldan etkileyerek hücrelerin kemotaksis, proliferasyon ve diferansiyasyonuna neden olmaktadır. BMP, düşük konsantrasyonlarda mezenşimal kök hücrelerin kıkırdak matriks içerisinde konuşlanan kondrositlere diferansiyasyonunu uyarmaktadır. Daha sonra matriks kalsifiye olmakta ve remodelling ile kemikleşme sağlanmaktadır ki, bu kemikleşme modeline endokondral kemikleşme denilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ise BMP intramembranöz kemikleşme ile doğrudan kemikleşmeyi uyarmaktadır. BMP uyarımı ile oluşturulan kemik doku histolojik ve biyomekanik olarak normal kemik ile aynı özelliklere sahip olup normal remodeling ve kırık iyileşme süreci sergilemektedir (75).

BMP aktivitesi pek çok basamakta sıkı kontrol altında tutulmaktadır. Hücre dışı ortamda çözünebilir inhibitör proteinler moleküle bağlanarak molekülün hücre yüzey reseptörü ile etkileşimini önlerler. BMP molekülleri, sözü edilen inhibitör proteinlerin ekspresyonunu arttırarak bir anlamda kendi aktivitelerini sınırlayan bir negatif feed back mekanizmasını da kontrol ederler. Hücre içerisinde ise molekülün aktivitesi sinyal ileten Smad proteinleri ile inhibitör Smad proteinlerinin etkileşimleri ile sağlanmaktadır. Inhibitör Smad proteinlerinin ekspresyonu da BMP moleküllerince arttırılabilir. Bu sıkı regülasyon mekanizmaları altında BMP'lerce oluşturulan kemikleşme indüksiyonu, molekülün uygulandığı veya matriks yerleştirilen lokalize bir alanda gerçekleşmektedir. Bu indüksiyon, ortamda BMP molekülü bulunduğu sürece devam etmektedir (70). (Şekil 1)



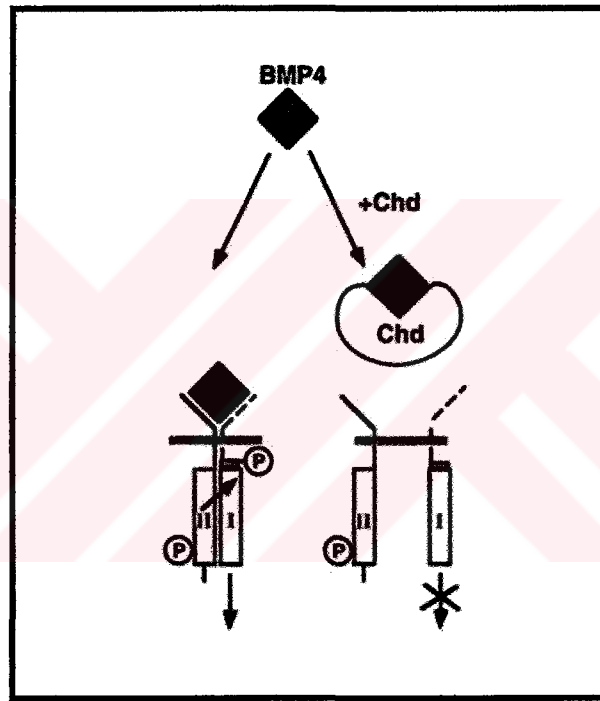


Şekil 2.1. :BMP'lerin hücre içi sinyal iletim sisteminin şematik görünümü
 BMP'ler veya TGF- β 'lar ile aktive edilen Smad proteinleri (Smad1, Smad5, Smad8 veya Smad2, Smad3) intraselüler Smad4 proteini ile birleşerek hücre çekirdeğinde hedef genetik kodlar üzerinde etkili olur. Smad6 ve Smad7 BMP'lerin ve TGF- β 'lar için inhibitör etki göstermektedir. (Kaynak 74'den modifiye edilmiştir.)

BMP ailesinin değişik türleri farklı Smad proteinlerini aktive ederek intrasellüler fonksiyonlarını gerçekleştirmektedirler. BMP moleküllerinin transmembranöz reseptörü sayesinde Smad 1, Smad 5 ve Smad 8 proteinleri fosforilasyon ile aktif hale geçer. Aktif haldeki Smad 1/Smad 5 veya Smad 8 proteini Smad 4 ile ağırlaşarak hücre çekirdeğinde hedef genetik kod üzerinde etki göstermektedir (73, 74). Smad 6 ve Smad 7 molekülleri BMP'lerin ve TGF'lerin etkilerini inhibe etmektedirler (74).

BMP molekül ailesinin üyeleri ortama aktif hallerinde salınmaktadırlar. Ancak moleküller reseptörlerine bağlanmadan önce

regülatuar nitelikteki birkaç protein ile kompleksler oluşturmaktadırlar (70). "Noggin", BMP-4 ve BMP-2'ye doğrudan yüksek afiniteli bağlanıp moleküllerin kendi reseptörlerine bağlanımını engellemektedir (76). *Xenopus* ve *Drosophila*'da "chordin" gen ürünleri BMP-4 ve BMP-2 ile etkileşmektedir (77) (Şekil 2). "Follistatin", BMP-7 (78) ve BMP-2 (79) ile bağlanarak inhibitör rol üstlenirken, "Tolloid" ise BMP koaktivatörü olarak çalışmaktadır (70).



Şekil 2.2.: BMP-4 sinyalizasyonunun chordin tarafından engellenmesinin moleküler modeli. BMP'lerinde üye olduğu TGF-B ailesi hücre uyarımını Tip I ve Tip II reseptörler aracılığı ile yapmaktadır. BMP-4 dimeri aktif serin-treonin kinaz reseptörüne (reseptör II) bağlanır, reseptör I'in fosforillenmesini sağlar ve intrasellüler aktivasyonu gerçekleştirir. Chordin BMP moleküllerine hücre dışı ortamda bağlanarak moleküllerin reseptörleri ile etkileşimini önler-(Kaynak 77'den modifiye edilmiştir).

Osteotomi-BMP ilişkisi: Endojen BMP salınımı hem osteotomiye bağlı olarak latent dönemde, hem de mekanik gerilim stimulusu ile distraksiyon sırasında uyarılmaktadır. BMP-2 ve BMP-4'ün osteotomi sonrası subperiosteal prekondrojenik hücreleri uyardığı gösterilmiştir. Bu iki BMP molekülünün gen ürünlerinin hücrelerin osteojenik/kondrojenik hücre diferansiyasyonunu otokrin veya parakrin mekanizmalar ile hızlandırdığı düşünülmektedir. BMP-6 ve GDF-5(growth/differentiation factor-5) genlerinin ekspresyonu osteotomi sonrası daha diferansiye olmuş kondrositlerde saptanmış, kırıldak kallusun rezorbe olup bunun yerini kemik kallusun aldığı döneme kadar birkaç hafta devam ettiği bildirilmiştir. BMP-2 ve BMP4 ile BMP-6 ve GDF-5 genlerinin ekspresyon paternlerindeki farklılık birbirlerinden bağımsız aktivasyon yollarının olduğunu düşündürmektedir. BMP-7 geninin osteotomi ile ekspresyon sergilemediği, muhtemelen endojen BMP-7'nin erişkinlerde kırık iyileşmesinde rol almadığı ifade edilmiştir (80).

Distraksiyon-BMP ilişkisi: Latent periyodun sonlarına doğru iyice azalmaya başlayan BMP-2 ve BMP-4 distraksiyonun başlaması ile ciddi bir artış sergiler. Northern blot analizi BMP-4'ün distraksiyon ile osteotomiye göre 20 kat fazla uyarıldığını göstermiştir. BMP-2 ve BMP-4 mRNA'larının güçlü sinyalleri kondrojenik ve osteojenik hücreler ile bunların öncüllerinde de saptanmıştır (80).

Osteodistraksiyon sırasında süregen kemik oluşumu tekrarlayan mikrofraktürlere değil yükselmiş endojen BMP-2 ve BMP-4'e bağlanmaktadır. Distraksiyon ilerledikçe kırıldak kallusun progresif olarak rezorbe olduğu ve kemikleşmenin doğrudan intramembranöz ossifikasyon ile gerçekleştiği ifade edilmiştir. Distraksiyon devam ettikçe BMP-6 ve GDF-5'in yavaş yavaş azaldığı, BMP-2 ve BMP-4'ün ise distraksiyon sürdükçe yüksek seyrettiği saptanmıştır (80). TGF ailesine bağlı olan BMP grubu protein yapısının homolojisine göre birkaç alt gruba ayrılmıştır. BMP-2 ve BMP-4 aynı subgruba ait olup aynı ekspresyon paternini sergilemektedir. BMP-6 ile GDF-5'in farklı subgruplara ait oldukları halde aynı ekspresyon paternine sahip

oldukları görülmüş, BMP-7'nin ise BMP-6 ile aynı subgrupta olmasına rağmen Sato ve arkadaşlarının çalışmasında saptanamadığı bildirilmiştir (80).

BMP-2 ve BMP-4'ün immünolojik boyamalarının primitif mezenseşimal hücreler ile erken osteoblast ve kondrositlerde yoğunlaştığı görülmüştür (81). In vitro çalışmalarda BMP-2 kemik oluşumunu uyarmakta (82, 83, 72) miyogenezi inhibe etmekte (72), hatta miyoblastik hücre klonunu osteoblastik diferansiyasyon yolağına yönlendirmekte (83), kondrogenezi ise etkilememektedir-65. In vivo çalışmalarda ise BMP-2'nin doz bağımlı olarak kemikleşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir (84). Ayrıca Li ve arkadaşları tarafından tavşanlarda yapılan bir diğer araştırmada da BMP-2'nin distraksiyon osteogenezinin konsolidasyon evresini belirgin olarak hızlandırdığı ifade edilmektedir (85).

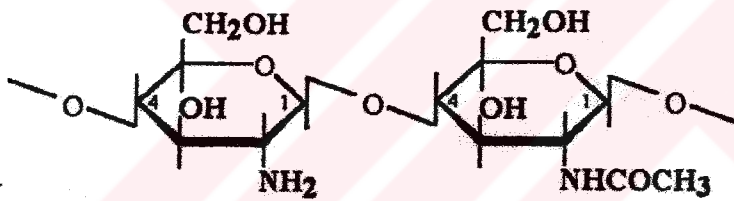
Saflaştırılmış çözünebilen BMP fraksiyonu (20kDa), uygun taşıyıcı ile uygulandığında aktivitesini daha iyi sergilemekte iken, çözünür olmayan BMP fraksiyonu(14kDa'luk proteinden ayrılmamış form), taşıyıcı bir sistem olmaksızın da kemikleşmeyi uyarmaktadır. Çözünebilir saflaştırılmış form tek başına uygulandığında ise kemikleşmeyi uyarmamaktadır (86). Bu nedenle BMP molekülünün biyoaktivitesinin optimum düzeyde sağlanabilmesi için uygun taşıyıcı sistemler kullanılmalıdır.

Günümüzde osteoindüktif osteokondüktif materyallerin beraber kullanımı ile kemik doku mühendisliğinde büyük aşamalar kaydedilmiştir. Kusumoto ve arkadaşları 1998'de atelopeptid tip I kollajen taşıyıcı içerisine karıştırılmış BMP-2 ile elde edilen implantı sıçan latissimus dorsi kas flebi içerisine yerleştirmişlerdir. Araştırmanın sonucunda BMP-2 dozu ile bağıntılı oranda kemikleşme sergileyen bir kas-kemik flebi prefabrike etmişlerdir (87). Bu çalışmanın ardından Warnke ve arkadaşları bu alandaki araştırmaları kliniğe taşımışlardır. Mandibula defekti olan bir hastada latissimus dorsi kas flebi içerisine titanyum meş kafes içinde kemik mineral blokları, BMP-7 ve hastadan aldıkları 20cc kemik iliğinin entegre edilmesiyle elde edilen implant yerleştirilmiştir. Daha sonra mandibula defekti, elde edilen heterotopik kemik ile rekonstrüksiyon plağı üzerinden rekonstrükte edilmiştir. Geç postoperatif

dönemde iyi bir çiğneme fonksiyonu ile tatminkar üç boyutlu estetik kazanım sağlanmıştır (88).

2.6 Kitosan:

Kitosan molekül ağırlığı 300-1000 kD arasında değişen hidrofilik bir biyopolimerdir. Kitinden eldedilmektedir. Kitin, doğada selülozdan sonra en sık rastlanan doğal biyopolimer olarak bildirilmektedir (22). Moleküler formülü poly-1,4 D-glukozamine (amino polisakkarid, poly-N-acetil glukosaminoglikan) olup, deniz kabuklularının sert kabuklarında doğal olarak bulunmaktadır. (Şekil 2.3.) α -helikal yapısı intramoleküler hidrojen bağları ile stabilize olmaktadır (89).



Şekil 2.3.: Kitosanın kimyasal yapısı

Çeşitli ülkelerde (Japonya, ABD, Hindistan, Rusya, İtalya, Norveç) farklı formlarda ticari olarak bulunmaktadır. Çözelti, toz pudra, granüller ve fibriler halinde ticari preparat olarak saf elde edilebilmektedir. Kitosan, kullanım amacına göre ince film tabaka, fibriller, granüller, çözelti ve jel haline getirilerek farmasötik, kozmetik, biyomedikal ve zirai alanlarda kullanılmaktadır (Şekil 2.4.) (89).



Şekil 2.4.: Değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış jel formda kitosan

Çözeltilerde iyon dansitesinin artması nedeniyle polianyonik ajanlar ile iyonik kompleksler oluşturur. Bu sayede büyüme faktörleri, antibiyotikler ve anti-inflamatuvar ilaçlar kitosana yüklenebilir (90, 91, 92, 93, 94, 95). Kitosan, hemostazı artırır, yara iyileşmesini olumlu yönde etkiler, mineralize kemik matrikslerin osteokondüktif özelliklerini artırır, ilaçların kontrollü yavaş salınımlarını sağlar. Bunların yanısıra biyoparçalanabilir nontoksik bakteriostatik, fungistatik, spermisidal, antikanserojen ve antikoolesteremik olduğu bildirilmiştir (96).

Biyofarmasötiklerden inek serum albumini, amino asitler (metionin ve lizin), antitrombotik ajanlar (hirudin, PGE1, antitrombin-III, heparin), interlökin 2 (IL-2), insülin ve bazı enzimlerin kitosan mikrokürelere yüklenerek taşınabileceği gösterilmiştir (89).

Kitosan kişisel bakım ürünlerinde (saç bakım ürünleri, cilt bakım ürünleri, nemlendiriciler, yara bakım ürünleri), yiyeceklerde koruyucu ürün olarak (şarap ve meyva suyu endüstrisinde, koruyucu tabaka olarak meyvelerde, kolesterolü düşüren içeceklerde), zirai alanda (ürün veriminin artırılmasında, tohumların kaplanmasında, pestisit ve herbisitlerin kontrollü

salımı ile zirai ilaçlamada) ağır metallerin ve radyoaktif materyallerin şelasyonunda, çöp arıtma sektöründe ve biyoteknoloji ürünlerinde (biyolojik ajanların ayrıştırılma ve saflandırılması, enzim ve hücrelerin immobilizasyonu) kullanılmaktadır (89).

Kitosan kolay elde edilebilir, ucuz, yara iyileşmesine katkısı olan, ayrıca distraksiyon osteogenezinde osteojenik aktivite sergileyen bir biyopolimerdir (22). Sayılan özellikler kitosanın osteoindüktif materyallerin taşıyıcı ortamı olarak kullanımı için uygun bir materyal olduğunu göstermektedir.



GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Deney Hayvanı Kullanım Protokolü çerçevesinde 2004/38-3 numaralı kurul onayı alınarak yürütülmüştür. Çalışma iskelet gelişimi tamamlanmış, 350-400gr ağırlığındaki 20 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan üzerinde yapılmak üzere planlanmıştır. Denekler veteriner hekim idaresindeki Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilmiştir.

BMP-2 %2'lik kitosan solüsyonu içerisinde çözdürülerek jel kıvamında viskoziteye sahip materyal hazırlanmıştır. Yüksek ısı altında kitosanın degrade olduğu bilinmektedir. Ultrafiltrasyon ile sterilizasyon için viskozitesinin yüksek olması nedeniyle bu materyalin sterilizasyonu, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda 25-kGy total dozda gama ışınına maruz bırakılarak sağlanmıştır (97). Distraktörlerin sterilizasyonu otoklavda gerçekleştirilmiştir. İlaç cerrahi işlem sırasında distraktörlerin yerleştirilmesinden hemen önce steril şartlarda distraktörlerin haznelere enjekte edilerek doldurulmuştur.

3.1. Deney Grupları:

Her bir grupta 10'ar adet olmak üzere toplam 20 adet sıçan kullanılmıştır (Tablo 3.1.). Deney hayvanı olarak sıçanın seçilme nedeni, yapılacak deneyin karmaşık yapısı ve planlanan cerrahi yöntemin kolay uygulanacağı, filogenetik açıdan en basit tür olmasıdır. Bunların yanısıra temin ve bakım maliyetinin düşük olması diğer bir nedendir. Daha da önemlisi, postoperatif süreci oldukça ağırlı olan ve uygulanan operasyonun denek için büyük bir cerrahi girişim olduğu böyle bir deney için en dayanıklı tür olması sayılabilmektedir.

Tablo 3.1.: Deney grupları

Deney ve kontrol gurupları	Grup başına denek adedi	Tekrar sayısı	Kullanılan toplam denek sayısı
Distraksiyon grubu	10	1	10
BMP+Kitosan yüklü distraksiyon grubu	10	1	10

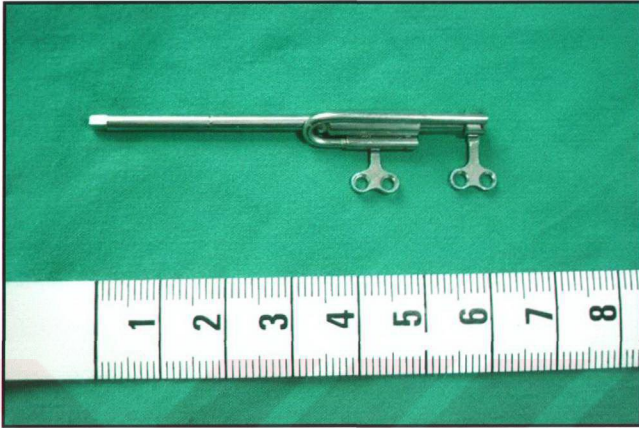
1.Gurup: Kontrol gurubu (Sadece distraksiyon uygulanacak gurup).

2.Gurup: BMP ve Kitosan (BMP taşıyıcısı) yüklenmiş distraktör ile distraksiyon uygulanan, deney gurubu.

Birinci gurupta deneklere osteotomi sonrası sadece distraksiyon uygulanmıştır. İkinci guruptaki deneklere ise aynı distraktörlere BMP ve kitosan yüklenerek distraksiyon yapılmıştır.

3.2. Kontrollü Salım Sistemi İçeren Distraktör:

Kontrollü ilaç salımı yapmayı sağlayacak bu işe özgül distraktör sistemi geliştirilmiştir. Distraktör, kabaca distraksiyon sağlayan destek ve tesbit ünitesi ile etken maddenin yerleştirildiği hazne ve piston ünitelerinden oluşmaktadır (Şekil 5). Distraktörün üretiminde plak-vida sistemlerinde kullanılmakta olan paslanmaz çelikten faydalanılmıştır.



Şekil 3.1.: Kontrollü ilaç salan distraktör

Tutamağın her 360° lik hareketi ile dişli gövdeden ana gövdeye aktarılan hareket ana gövde ile dış gövdenin birbirinden 0,25mm uzaklaşmasını sağlamaktadır. Bir başka deyişle her bir turda 0.25 mm'lik distraksiyon oluşturulmaktadır. Buna göre her 1mm'lik distraksiyon için tutamağın dört tur çevrilmesi gerekmektedir. Bu hareket J şırıngaya da aynı miktarda yansımakta ve şırınga her bir turluk hareket ile 0.5mm^3 lük hacim kaplayacak şekilde, diğer bir deyişle 0.5mm^3 ilaç içeren sıvağı salacak şekilde hazne içerisinde ilerlemektedir (Şekil 6).



Şekil 3.2.: Distraksiyon ile kontrollü ilaç salımı

Hazneye kitosan mikrokürecikler içerisinde entegre edilmiş BMP-2 molekülü jel kıvamlı bir ortam içerisinde yerleştirilmiştir. Hazne 8mm uzunlukta ve 16mm³ hacimde olacak şekilde dizayn edilmiştir. Haznenin ön tarafta tek bir açıklığı bulunmakta olup açıklık hazne çapından daha dar ancak 24G iğne girebilecek kadar geniş dizayn edilmiştir. Her gün distraktör ilerletildikçe pistonun hazne içerisinde 1mm ilerlemesi ve 2mm³lük jelin distraksiyon hattına salınması planlanmıştır. Hazne içerisindeki toplam BMP-2 dozu 2µg olup her gün yaklaşık 0.25µg BMP-2 içeren jelin distraksiyon hattına bırakılması öngörülmüştür.

3.3 Deney Planı:

- Genel anestezi altında uyluk anterolateral bölgeden longitudinal insizyon ile cilt, ciltaltı geçilip kaslar ayrıldıktan sonra kontrollü salım sistemi taşıyan distraktör femura tesbit edilmiştir.
- Femurun vaskülarizasyonu korunarak uzun aksa dik olarak osteotomi yapılmıştır.
- Osteotomi sonrası femur, kontrollü BMP salım sağlayacak bu işe özel üretilmiş distraktör yerleştirilerek tesbit edilmiştir.
- Üç günlük latent periodu takiben günde bir defa 1mm distraksiyon, 8 gün yapılarak 8mm'lik distraksiyon mesafesi elde olunmuştur.
- Distraksiyonun sonlandığı gün ilk radyografik değerlendirme yapılmıştır.
- Deney grubunda her bir distraksiyon işlemi ile distraktörün haznesinden özel hazırlanmış olan belli miktarda BMP distraksiyon alanına salınmıştır.
- Distraksiyon fazının sona ermesini takiben 4 haftalık bir konsolidasyon süresi beklenmiştir.
- Konsolidasyon süreci sonrasında ikinci radyografik değerlendirme yapılarak denekler kurban edilmektedir. Morfolojik çalışmalar için

bilateral sağlam segmentlerle beraber distraksiyon zonu çıkartılarak deney sonlandırılmıştır.

3.4 Cerrahi yöntem:

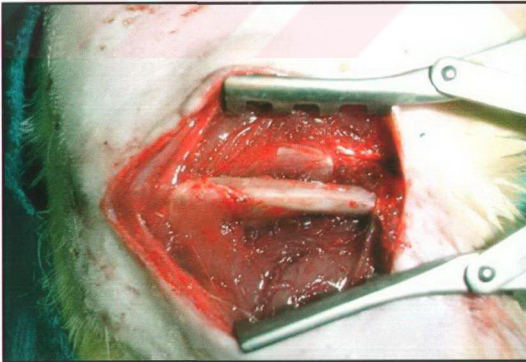
Tüm deneklere 90mg/kg ketamin ve 10mg/kg xylazine intramusküler enjekte edilerek genel anestezi uygulanmıştır. Ayrıca 10mg/kg Cephazolin dozu ile antibiyotik profilaksi yapılmıştır (23). Girişim alanı traşlandıktan sonra povidon iyodin kullanılarak saha temizlenerek asepsi-antisepsi kurallarına uygun biçimde örtülmüştür (şekil 3.3.) .





Şekil3.3.: Planlanan insizyon hattı

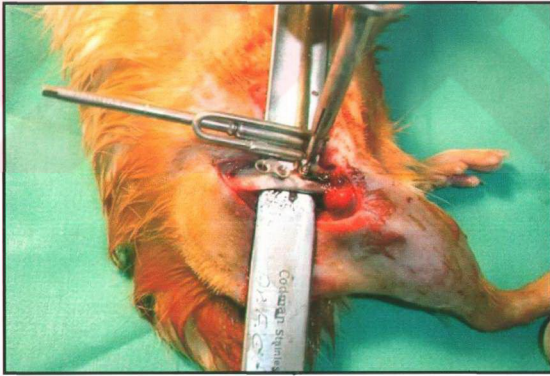
Genel anestezi altında uyluk anterolateral bölgeden longitudinal insizyon ile cilt, ciltaltı geçilip biceps femoris ve vastus lateralis lifleri ayrılmıştır. Sonra, cerrahi sahada periost üzerinden femura insersiyoy yapan veya origosunu femurdan alan kaslar kemikten ayrılmıştır (Şekil 3.4.).



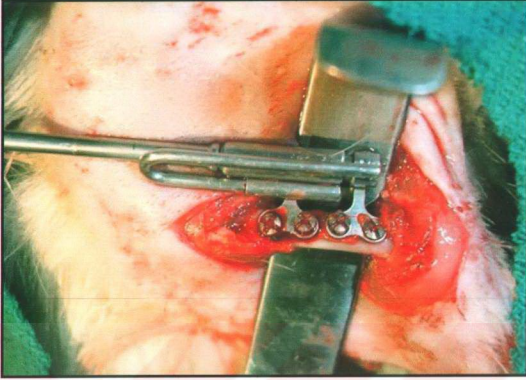
Şekil 3.4.: Kasların ayrılması.

Femur vaskülarizasyonu medial proksimal lokalizasyondan kemiğe giren vasküler yapılar ile sağlandığından sözü edilen bölgede diseksiyon yapılmayarak vasküler destek korunur.

Ardından distraktörün yerleştirileceği alan saptanıp tesbit vidaları için plak delikleri üzerinden 1,2mm kalınlıkta matkap ucu ile planlanan osteotomi hattının her iki lateraline ikişer adet vida delikleri açılmıştır. Daha sonra distraktör tesbit plaklarından 1,6mm kalınlık, 7mm uzunlukta mikro vidalar ile femura sabitlenmiştir (Şekil 3.5., 3.6.). Femurun vaskülarizasyonu korunarak uzun eksene dik olarak separatrator yardımıyla (10000 devir/dakika) serum fizyolojik ile yıkanarak osteotomi yapılmıştır (Şekil 3.7., 3.8.).



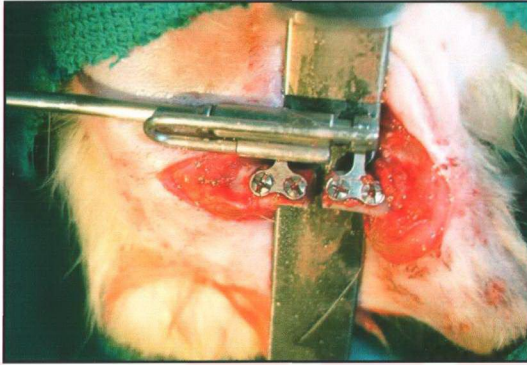
Şekil 3.5.: Distraktör plaklarının vidalanışı



Şekil 3.6.: Distraktörün implantasyonu

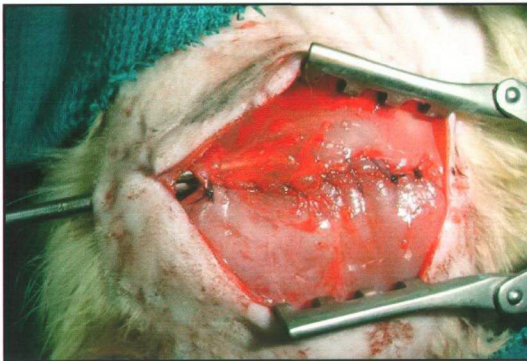


Şekil 3.7.: Separatör yardımıyla (10000devir/dakika) femurun osteotomize edilişi.



Şekil 3.8.: Osteotomize segmentlerin birbirinden ayrılışı.

Femur diyafizine yapılan osteotominin ardından ayrılmış olan kaslar 5.0 vikril kullanılarak devamlı dikişler ile kapatılarak cilt 4.0 ipek ile dikilmiştir. (Şekil 3.9.). İntraperitoneal 4cc serum fizyolojik uygulandıktan sonra insizyon hattı povidon iyodin ile temizlenip uygun pansuman ile operasyon sonlandırılır. Postoperatif süreçte analjezik olarak 20mg/kg/gün parasetamol içme suyuna karıştırılarak kullanılmıştır.



Şekil 3.9.: Kas onarımı

3.5 Postoperatif süreç:

Üç günlük latent dönemin ardından günde 1 defa 1mm olmak üzere distraksiyona başlanır. Toplam distraksiyon tüm guruplarda 8 gün boyunca toplam 8mm olacak şekilde sürdürülmüştür. Distraksiyonun sonlandırıldığı gün yeterli distraksiyonun sağlanıp sağlanamadığı radyografik olarak değerlendirilmiştir. Distraksiyonun sona ermesinden sonra 4 haftalık konsolidasyon süresi beklenmiştir. Konsolidasyon süresinin sonunda tekrar direkt grafi ile distraksiyon hattı değerlendirilerek histolojik inceleme için denekler sakrifiye edilmiş, herbir deneğin sağ femur proksimal diyafizi ile diz eklemi arasındaki segment spesmen olarak hazırlanmıştır. Spesmenler 20 kat hacimli %10 formaldehit solusyonu içerisinde saklanmıştır.

3.6 Histolojik Gereç ve Yöntem:

Proksimal ve distal osteotomi kaynaması, kallus oluşumu, biyomalzemenin rezorpsiyonu, defekt alanındaki yeni kemik oluşumu, korteksin ve kemik iliğinin yeniden yapılanması (remodeling) ve malzemeye ait hücre infiltrasyonu ile fibröz doku oluşumu skorlanarak değerlendirilmiştir.

Doku örnekleri fosfat tamponu içinde hazırlanmış %10'luk formalin çözeltisiyle tesbit edildikten sonra Decastro çözeltisinde oda sıcaklığında kontrollü olarak dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyon sonrası dereceli alkollerden geçirilen örnekler sabit vakum uygulamasıyla parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan rotary mikrotomda (Microm, Almanya) 5-7 mikrometre kalınlığında kesitler alınmıştır.

Elde edilen histolojik kesitler hematoksilin-eozin ve Goldner'in modifiye mallory trikrom tekniği ile boyanmıştır. Doku örnekleri ışık mikroskobu düzeyinde temel olarak defekt alanındaki onarım işlemi ile bağlantılı yeni kemik oluşumu ve etkin madde yüklenmiş kitosan mikrokürelerinin doku ile uyumluluğu açısından değerlendirilmiştir. Bu amaçla iki aşamalı, semi-kantitatif bir skorlama sistemi, ilgili literatürden modifiye

edilerek kullanılmıştır. Biyomalzemeyle ilgili doku yanıtı Royals ve arkadaşları (Royals, 1999) ve kemik defektinin iyileşmesi An YH ve Friedman RJ (AN, 1999) tarafından bildirilen yöntemlere göre skorlanmıştır (98, 99). Kullanılan skorlama sistemi Tablo 3.2 ve 3.3'de özetlenmektedir. Adı geçen yöntemlere göre proksimal ve distal osteotomi kaynaması, kallus oluşumu, biyomalzemenin rezorpsiyonu, defekt alanındaki yeni kemik oluşumu, korteksin ve kemik iliğinin yeniden yapılanması (*remodelling*) ve malzemeye ait hücre infiltrasyonu ile fibröz doku oluşumu skorlanarak değerlendirilmiştir. Bunun için her doku örneğinden farklı düzeylerde elde edilen en az on kesit, iki araştırmacı tarafından Leica DMR (Almanya) model, bilgisayar bağlantılı ışık mikroskopunda incelenmiştir. Elde edilen görüntüler, Leica DC500 dijital kamera (Almanya) aracılığıyla bilgisayara aktarılarak kaydedilmiştir.

Tablo 3.2.: Histolojik skorumu sistemini oluşturan iki aşamadan ilki; "kemik defektlerinin onarımı". Kemik defektinin iyileşmesi için beklenen maksimum skor 18'dir.

Aşama 1 Kemik Defektinin Onarımı	Skorlar			
	3	2	1	0
Ölçütler				
Fibröz kallus oluşumu	Defekt boyunca tam fibröz kallus oluşumu	Orta derecede fibröz kallus oluşumu	Düşük derecede fibröz kallus oluşumu	Fibröz kallus oluşmaması
Proksimal osteotomi kaynaması	Tam kemikleşme (union)	Orta derecede kemikleşme (> %50)	Düşük derecede kemikleşme (< %50)	Kaynama yokluğu (non-union)
Distal osteotomi kaynaması	Tam kemikleşme (union)	Orta derecede kemikleşme (> %50)	Düşük derecede kemikleşme (< %50)	Kaynama yokluğu (non-union)
Defekte yeni kemik oluşumu	Defekte tam kemik oluşumu	Orta derecede kemik oluşumu (> %50)	Düşük derecede kemik oluşumu (< %50)	Yeni kemik oluşmaması
Kemik iliği değişiklikleri	Erişkin tipi yağlı kemik iliği	Orta derecede yeni doku oluşumu (> %50)	Düşük derecede yeni doku oluşumu (< %50)	Fibröz doku
Kortikal yeniden yapılanma /remodeling	Tümüyle yeni yapılanan korteksin varlığı	Orta derecede yeniden yapılanma (> % 50), intramedullar kanal	Düşük derecede yeniden yapılanma (< % 50), medulla boşluklarının varlığı	Yeniden yapılanmanın hiç olmaması

Tablo 3.3.: Histolojik skorumu sistemini oluşturan iki aşamadan ikincisi; "biyomalzemeye doku yanıtı". Doku yanıtı için beklenen maksimum skor 0'dır.

Aşama 2 Biyomalzemeye Doku Yanıtı	Skorlar				
	4	3	2	1	0
Ölçütler					
Fibröz doku oluşumu	İmplant çevresinde ciddi/ bol miktarda, sıkı, kollajenden zengin fibröz bağ dokusu oluşumu	Normal doku yapısının kesintiye uğraması ve orta derecede sıkı fibröz bağ dokusu oluşumu	Orta derecede bağ dokusu oluşumu	Az miktarda iç biçimli hücrelerin varlığı ya da hafif fibroplazi	
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	İmplantta karşı ciddi hücre infiltrasyonu ya da bölgede doku nekrozunun varlığı	çok miktarda lenfosit, makrofajın, yabancı cisim dev hücrelerinin, belirgin eozinofil ve nötrofillerin varlığı	Orta derecede lenfosit, makrofaj, az sayıda yabancı cisim dev hücresi ve küçük bir odak şeklinde nötrofillerin varlığı	Az sayıda lenfosit ya da makrofajın varlığı, yabancı cisim dev hücresi, eozinofil ya da nötrofillerin bulunmaması	Normal kontrol dokusu ile farklılık olmaması ya da implant alanında bağ dokusunun oluşmaması

3.7 Radyolojik Gereç ve Yöntem:

Distraksiyon hattı, radyolojik olarak direk radyografi ile değerlendirilmiştir. Film çekimi ve banyolanma işlemleri Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Diyagnoz ve Radyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Deneklerden distraksiyon sürecinin tamamlanmasının (8. gün) ve konsolidasyon sürecinin tamamlanmasının (30. gün) ardından olmak üzere iki defa direk radyografi örnekleri alınmıştır. Film çekilirken X-ışını kaynağı tüm deneklere dokunacak kadar yaklaştırılarak kaynak ile kemik arasındaki mesafe standardize edilmiştir (Şekil 16). Tüm deneklere eşit doz ve sürede X ışını uygulanarak örnekleme yapılmış ve elde edilen tüm filmler aynı banyoda yıkanmıştır. Elde edilen radyografların eşit uzaklıktan standart olarak dijital fotoğrafları alınıp bu görüntülerdeki kemikleşme düzeyi *Scion Image software Beta 4.02 (Scion Corp., Frederick, Md.)* adlı imaj analiz programı ile değerlendirilmiştir (100).



Şekil 3.10.: Radyografik örnekleme. Denek yüz üstü yatar pozisyonda yatırılıp femura kalça ekleminde 90° fleksiyon ve abdüksiyon yaptırdıktan sonra X-ışını kaynağı cilde dokunacak kadar yaklaştırılarak film çekilir.

3.8 İstatistiksel Gereç ve Yöntem:

Histolojik ve radyolojik skorlama sonuçlarının deney ve kontrol gruplarındaki dağılımının farklılığı Man Whitney U testiyle değerlendirilmiştir. Deney ve kontrol gruplarının 8. ve 30. gün elde edilen radyolojik sonuçlarının aynı grup içerisindeki farklılıkları ise Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi'yle irdelenmiştir. Gruplar arası farklılık 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir. Tüm istatistik işlemleri PC bilgisayarda; *SPSS for Windows release 11.5* istatistik paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



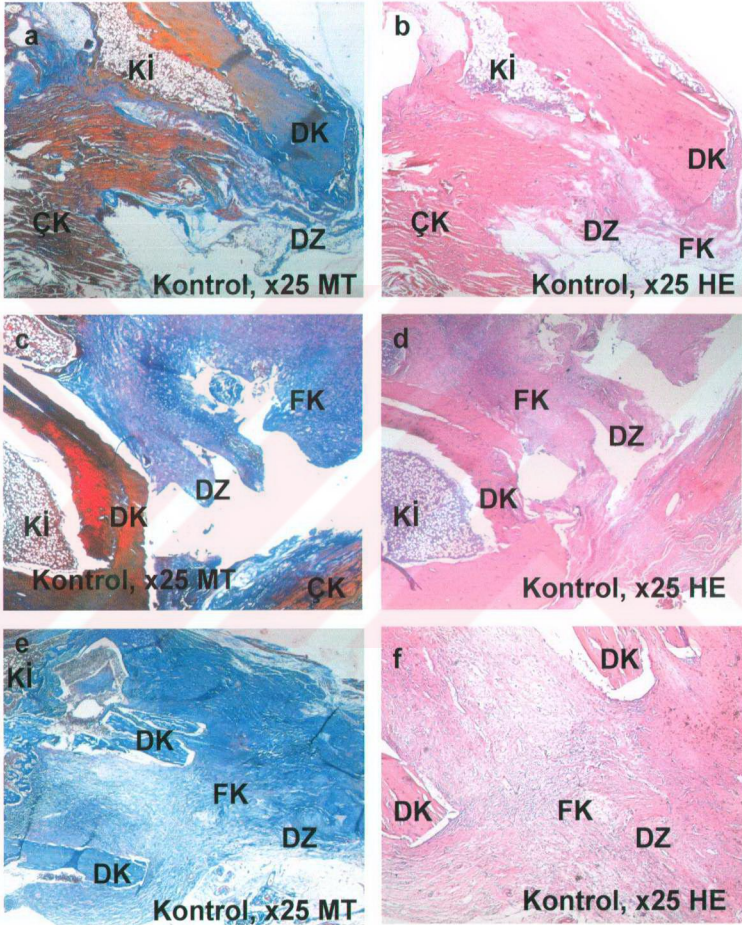
SONUÇLAR:

4.1 Histolojik Bulgular:

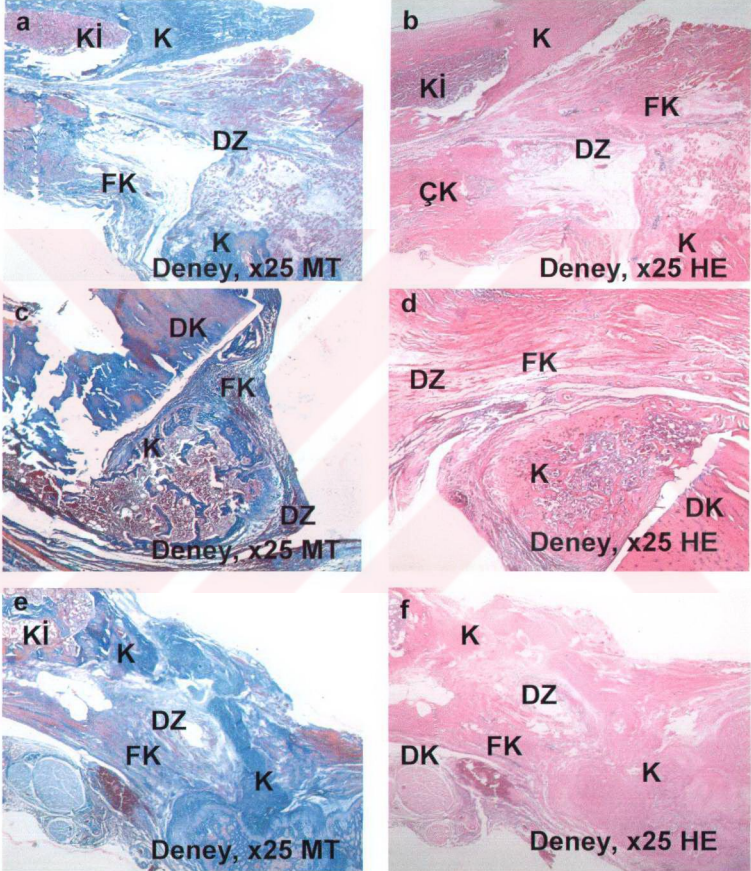
Tüm gruplardan, distraksiyon ve konsolidasyon sonrası elde edilen doku örnekleri, yöntemde belirtilen doku iyileşme aşamaları için skorlandıktan sonra ulaşılan veriler Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Deney ve kontrol gruplarının tümünde, oluşturulan defekt alanında doğrudan bağ dokusu üzerinden ya da bir hiyalin kıkırdak aracılığıyla kemikleşme ve iliğin yeniden yapılanma sürecini izleyen onarım işleminin çeşitli evreleri izlenmiştir (Şekil 4.1.,4.2.,4.3.). Histolojik iyileşme süreci, deney grubunda kontrol grubuna göre hızlanmıştır.

Biyomalzeme olarak kitosan, yapılan ön çalışmaları doğrular biçimde doku ile uyumlu bulunmuştur. Malzemeye ait tanecikler, izlenen dönemde nadir olarak mononükleer inflamatuvar hücreleri barındıran birkaç kollagen fibril ve fibroblast sırasıyla çevrili olarak izlenmiştir. Bu ince fibröz kapsül, kemikleşme sürecine ait fibröz ve osseöz kallus ile devamlı, çoğu kez tamir dokusundan ayrılamayacak kadar belirsiz olarak izlenmiştir (Şekil 4.3.c, d). Kitosan uygulanan grupların hiçbirinde yabancı cisim dev hücresi gözlenmemiş; kitosana ait taneciklerin, kemiğin kendi ekstraselüler matriksi gibi davranarak doku ile kaynaştığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.3.c, d).

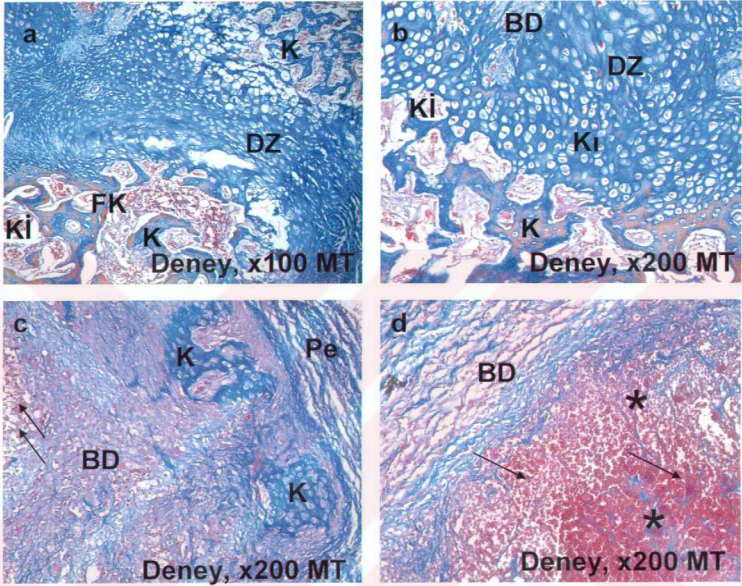
Distraksiyon uygulanan kortikal kemik kenarlar ile sınırlanmış distraksiyon zonu, deney ve kontrol gruplarında fibröz kallus ile dolu olarak izlenmiştir (Şekil 4.1a-f, 4.2.a-f). Kontrol grubuna ait kesitlerde distraksiyon alanında; çevredeki çizgili kasların içeri doğru kıvrılması ile düzensiz biçimli; kollagen fibrillerden zengin fibröz bağ dokusunun varlığı dikkati çekmiştir. Bu grupta proksimal ve distal osteotomi hatlarındaki yeni kemik oluşumu minimal düzeydedir (Tablo 4.1., Şekil 4.1.a-f). Deney grubuna ait örneklerde fibröz kallusun hücre ve damarlardan daha zengin, proksimal ve distal osteotomi hatlarındaki kemikleşmenin daha ileri düzeyde olması nedeniyle kontrol grubundakine göre daha düzgün biçimli olduğu izlenmiştir (Şekil 4.2.a-f).



Şekil 4.1.: Kontrol grubuna ait mikrograflarda, distraksiyon kenarlarının (DK) henüz yeni kemik trabekülleri ile devam etmediği, distraksiyon zonunun (DZ) fibröz kal (FK) ile dolu olduğu ve buraya yer yer çevredeki çizgili kolların (ÇK) girdiği izlenmektedir. Kİ: Kemik iliği; HE: Hematoksilen eozin; MT: Mallory trikrom.



Şekil 4.2.: Deney grubuna ait mikrograflarda, distraksiyon kenarlarının (DK) yeni kemik trabekülleri ile devam etmekte olduğu, (a) ve (b) de distraksiyon zonunda (DZ) kemik uçların birbirine iyice yaklaştığı; (e) ve (f) de bir kenarda kemik köprüünün oluştuğu izlenmektedir.



Şekil 4.3.: Deney grubuna ait, büyük büyütmede elde edilen mikrograflarda, distraksiyon zonundaki (DZ) yeni kemik trabeküllerinin (K), kırıkta model (Kı) aracılığıyla (b) ya da doğrudan bağ dokusundan (BD) farklandığı (c) alanlar izlenmektedir. Oluşan yeni kemik mavi izlenirken, olgunlaştıkça kırmızı olarak görülmektedir. Genç spongiyöz kemiğe yeniden yapılanmakta olan ilik bileşenlerinin (Kı) eşlik ettiğine dikkat ediniz (a, b). (d)'de fibröz kılı (FK) oluşturan bağ dokusu içinde kitosana ait kırmızı renkli taneciklerin (oklar) birkaç sıra ince kollagen fibril ve az sayıda bağ dokusu hücresi ile sarılı olduğu ve içlerine doğru kemikleşmeye izin verdiği (*)görülmektedir. Pe: Periost; MT: Mallory trikrom.

Deney grubunda proksimal ve distal osteotomi hatlarında genç spongiyöz kemik kitleleri ile kemikleşmenin gerçekleştiği, fibröz kallusun oldukça daraldığı izlenmektedir (Şekil 4.2.c, d). Hatta bazı deneklerde distraksiyon zonunun; bir kenarında tümüyle kemikleştiği saptanmıştır (Şekil 4.2.e, f). Osteotomi hatlarındaki kemikleşme sürecinin doğrudan bağ dokusu üzerinden gerçekleştiği alanlarda; fibröz kallus komşuluğunda ekstrasellüler matriks yapılarını yeni şekillendiren genç kemik trabekülleri mallory trikromla boyalı preparatlarda mavi kırmızı arası renklerde görülmektedir. (Şekil 4.3.a, b). Aynı bölgede endokondral kemikleşmenin süregeldiği sınırlı alanlarda ise yeni kemik spikülleri bazofilik (mavi) boyalı küçük kırık adaları ile yakın komşuluk göstermektedir (Şekil 4.3.a, b). Osteotomi hattına bitişik kortikal kemiğe komşu alanlardan başlayarak kemik trabeküllerinin, yüzeylerindeki aktif osteoblastlarla sıklıkla birbirleriyle ağızlaşır görünümüne verdiği dikkati çekmiştir (Şekil 4.2.c, d). Osteoklastların yeni oluşmuş kemik trabeküllerini tıraşlayarak aralarda kemik iliği bileşenlerinin gelişimine olanak sağladığı saptanmıştır. Distraksiyon alanında oluşan spongiyöz kemikte değişen aşamalarda yeniden yapılanma (*remodeling*) sürecinin başladığı izlenmiştir (Şekil 4.2.c, 4.2.d, 4.3.a, 4.3.b).

Hem deney hem de kontrol gruplarına ait örneklerde, distraksiyon uygulanan kortikal kemiğin; periostun da desteği ile sağlıklı bir yeniden yapılanma sürecinde olduğu izlenmiştir. Ancak kontrol grubunda distraksiyon kenarının oldukça sınırlı kemikleşme göstermesi nedeniyle bu grupta iliğin yeniden yapılanma süreci distraksiyon zonu boyunca kesintiye uğramıştır (Şekil 4.1.a-d). Deney grubuna ait kesitlerde osteotomi hatlarındaki genç spongiyöz kemik adacıklarının komşuluğunda; yağlı, erişkin tipi ilik elemanlarının yapılanmakta olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.2.c, d).

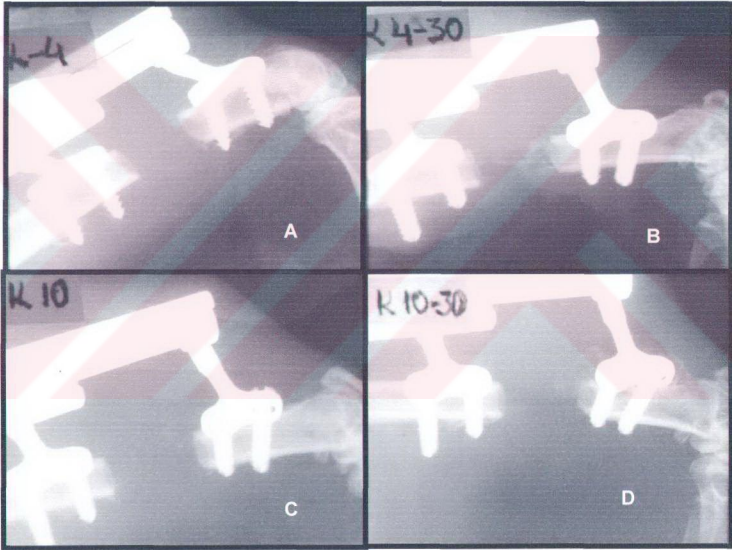
Tablo 4.1.: Histolojik olarak defekt iyileşmesi ve biyomalzemeye doku yanıtının, zamana göre ham skorları

	Kontrol n=6	Deney n=6
Defektin iyileşmesi	Ham	Ham
Fibröz kallus oluşumu	3, 3, 3, 3, 3, 3	3, 3, 3, 3, 3, 3
Proksimal osteotomi kaynaması	1, 2, 1, 1, 1, 1	3, 3, 2, 2, 2, 2
Distal osteotomi kaynaması	1, 2, 1, 1, 1, 1	3, 3, 2, 2, 2, 2
Defekte yeni kemik oluşumu	1, 2, 1, 1, 1, 1	3, 3, 2, 2, 2, 2
Kemik iliği değişiklikleri	0, 1, 0, 0, 0, 0	2, 2, 1, 1, 1, 1
Kortikal yeniden yapılanma	0, 1, 1, 1, 1, 1	2, 2, 1, 1, 2, 2
Toplam	6, 11, 7, 7, 7, 7	16, 16, 11, 11, 14, 12
Biyomalzemeye doku yanıtı		
Fibröz doku oluşumu	0, 0, 0, 0, 0, 0	1, 0, 0, 0, 1, 0
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	0, 0, 0, 0, 0, 0	1, 0, 1, 1, 1, 1
Toplam	0, 0, 0, 0, 0, 0	2, 0, 1, 1, 2, 1

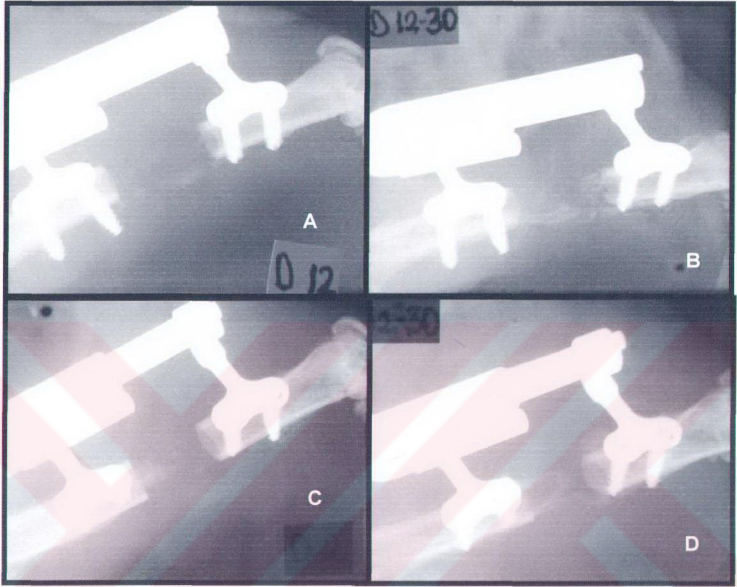
4.2 Radyolojik Bulgular:

Postoperatif süreçte deneklerden distraksiyon başlangıcının 8. ve 30. günlerinde radyografik örnekleme yapılmıştır. Sekizinci günde çekilen grafilerde kontrol ve deney gruplarında planlanan distraksiyonun gerçekleştirildiği, distraktörlerin vidalar ve tesbit plakları aracılığı ile heriki kemik ucunu stabilize ettiği görülmüştür. Her iki grupta da distraksiyonun bu erken evresinde kemikleşmeyi telkin eden radyografik bulgu

saptanmamıştır (Şekil 4.4.a, c, 4.5.a, c). Distraksiyonun 30. gününde çekilen radyografilerde her iki grupta da distraktörler ile kemik stabilitesinin korunduğu görülmüştür. Kontrol grubunda bu evrede elde edilen örneklerde distraksiyon alanında minimal kalsifikasyon saptanmıştır (Şekil 4.4.b, d). Aynı gün deney grubundan elde olunan radyografilerde ise distraksiyon alanında belirgin kalsifikasyon gözlenmiştir (Şekil 4.5.b, d).



Şekil 4.4.: Kontrol grubunda distraksiyonun sona erdiği 8.gün distraksiyon hattında kemikleşmeye dair radyolojik bulgu izlenmemekte (a, c), 30. gün ise sınırlı düzeyde kemikleşme bulgusu gözlenmektedir (b, d).

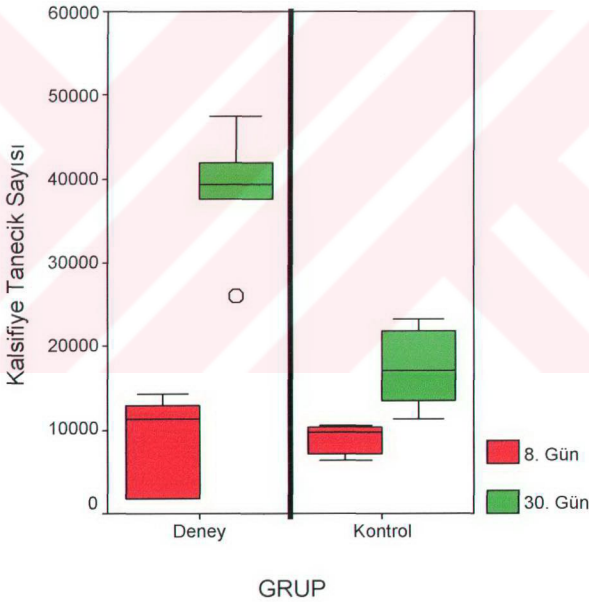


Şekil 4.5.:Deney grubunda distraksiyonun sona erdiği 8.gün distraksiyon hattında kemikleşmeye dair radyolojik bulgu izlenmemekte (a, c), 30. gün ise distraksiyon hattındaki belirgin kemikleşme dikkati çekmektedir(b, d).

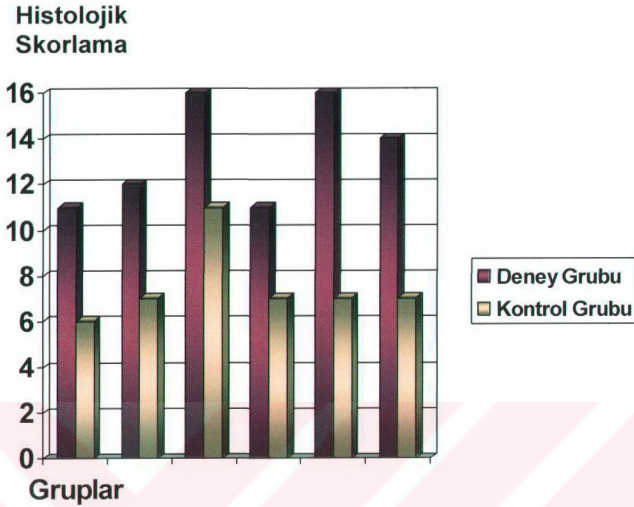
4.3 İstatistiksel Değerlendirme:

Radyolojik inceleme ile çekilen filmler Scion Image software Beta 4.02 adlı imaj analiz programında analiz edilmiştir. İnceleme ile distraksiyon alanında oluşan kalsifiye tanecik sayısı piksel birimi olarak sayılmış ve elde olunan veri, Mann- Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonunda deney ve kontrol grupları arasında kalsifiye tanecik sayısı

açısından 8. günde farklılık olmadığı ($p=0,33$) 30. günde ise anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır ($P=0,006$). Deney ve kontrol gruplarının kemikleşme düzeyleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise 30.günlerde saptanan kemikleşme düzeyinin 8. günden anlamlı şekilde farklı olduğu saptanmıştır ($P=0,028$). Her iki gruptan elde edilen histolojik veriler, Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiş, kemik defekt onarımının deney ve kontrol grupları arasında farklılık gösterdiği izlenmiştir. ($p=0,005$)

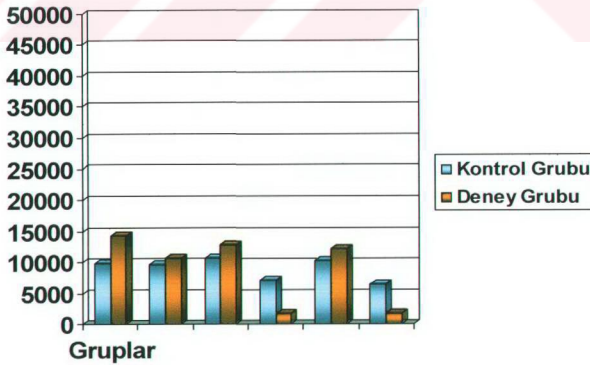


Şekil :4.6. Deney ve kontrol gruplarında distraksiyonun sonlandığı 8. gün kalsifikasyon gösteren tanecik sayısı birbirine yakın iken 30. günde kalsifikasyon gösteren tanecik sayısı deney grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak fazladır.



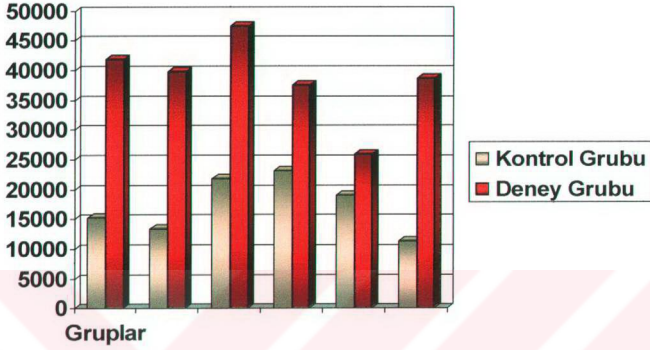
Şekil 4.7.: Kontrol ve deney gruplarından distraksiyonun 30. gününde alınan örneklerin histolojik skorlamalarının karşılaştırılması.

8.Gün Kalsifiye Tanecik Sayısı



Şekil 4.8.: Kontrol ve deney gruplarında 8.gün çekilen radyografilerde kalsifiye tanecik sayıları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

30. Gün Kalsifiye Tanecik Sayısı



Şekil 4.9.: 30. gün çekilen radyografilerde kalsifiye tanecik sayısının deney grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı görülmektedir.

TARTIŞMA

Distraksiyon osteogenezi ile vital kemik yüzeylerinin birbirinden uzaklaştırılmasıyla yeni kemik dokusunun oluşturulması sağlanmaktadır. Bu teknik, son on yılda tümör cerrahisi, travmaya sekonder oluşan defektlerin tedavisi ve hipoplastik iskeletin rekonstrüksiyonunda başarı ile kullanılmıştır. Plastik cerrahi tedavi teknikleri içerisinde distraksiyon osteogenezi, kraniofasiyal iskeletin hipoplazi ya da defektlerinin tedavisinde giderek önem kazanan bir yer almaktadır. Bu teknik daha az invaziv olup klasik kraniofasiyal rekonstrüksiyon yöntemlerine oranla çok daha az morbiditeye neden olmaktadır. Ayrıca kemik doku onarımı esnasında yumuşak doku harabiyeti en az düzeyde tutulabilmekte, bunun yanısıra yumuşak dokunun da distraksiyon ile ekspansiyonu onarılan kemik defektinin üzerini örten yumuşak dokunun rekonstrüksiyonuna katkıda bulunmaktadır. Greftli onarımlarda oluşan donör saha morbiditesi ortadan kalkmaktadır. DO'nin serbest kemik greftine düşük enfeksiyon riski ve neredeyse sınırsız denilebilecek kemik dokusu sağlaması gibi üstünlükleri olmasına rağmen en önemli dezavantajı ise tedavi süresinin oldukça uzun olmasıdır.

Sürenin uzun olmasındaki en önemli faktör ise konsolidasyon süresinin uzun olmasıdır. Konsolidasyon süresi, distraksiyon fazının sona ermesinden rejenere kemiğin fonksiyon görebilecek düzeyde olgunlaşmasına kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır (20). Genellikle 1mm'lik uzatma için yaklaşık 3 gün gerekmektedir ki, bunun bir günü uzatma, iki günü ise konsolidasyon için harcanmaktadır. Buna göre 10cm'lik bir defektin rekonstrüksiyonu için 100 günlük distraksiyon ve 200 günlük konsolidasyon süresine gereksinim duyulmaktadır (101).

Tedavi süresinin uzunluğuna katkıda bulunan bir diğer etken ise yavaş distraksiyon uygulamasıdır. Hızlı uzatma ile kıyaslandığında yavaş distraksiyon ile hücresel gen ekspresyonunun arttığı, bunun da hücre dışı matriks ürünlerinin sentezinin artışına katkıda bulunduğu bildirilmektedir (23). Hızlı distraksiyon uygulandığında hücre dışı matriksteki moleküler

döngünün azalmasının sonucu olarak mezenkimal hücrelerin diferansiyasyonundan sorumlu moleküllerin de ortama salınmasında azalma oluşacaktır. İşte bu noktada osteoprogenitör hücre diferansiyasyonuna neden olan ve distraksiyon sürecinin sonlanması ile ortamda az miktarda bulunup, hızlı harcanan BMP'lerin ortama kontrollü, sabit miktarda ve daha uzun süre ile salınmasının kemikleşmeyi arttıracığı düşünülmektedir.

Konsolidasyon süresinin uzunluğu ile komplikasyon gelişme riskindeki artış arasında ilişki mevcuttur. Bu komplikasyonlar arasında distraktörün kırılması, kemiğin kırılması, distraktöre bağlı artan enfeksiyon riski, kemik segmentlerde pozisyon değişikliği sayılabilmektedir. Hızlı distraksiyon bu riskleri azaltacaktır.

Yürütülen araştırmada distraksiyon oluştururken tam kemikleşmenin olamayacağı hızda ve genişlikte kemik defekti oluşturmak hedeflenmiştir. İdealden uzak bu iyileşme içerisinde uygulanacak osteoindüktif madde ve uygulama tekniğinin sadece distraksiyon yapılan grup ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Literatürde kritik boyuttaki kemik defekti sıçan femuru için kimi yayınlarda 5mm, kimi yayınlarda ise 6mm olarak bildirilmektedir. Distraksiyon hızı ile ilintili kritik boyutta defektten bahseden herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenlerden ötürü defektin planlanması aşamasında günde bir defa 1mm'lik ilerletme ile 8mm'lik distraksiyon mesafesi oluşturulması düşünülmüştür. Yapılan ön çalışmada sözü edilen distraksiyon hızında ve defekt boyutunda non-union geliştiği gözlenmiştir. Yine günde bir defa 1mm'lik distraksiyon planlanmasının nedeni hem deney, hem de kontrol gruplarında etkin kemikleşmenin önüne geçmektir. Bu hızda distraksiyon insanda veya büyük hayvanlarda, osteotomize kemik temas alanı geniş olduğundan (ortalama $300-400\text{mm}^2$) normal bir hız iken, ortalama $10-12\text{mm}^2$ kemik temas yüzeyi olan küçük bir denekte oldukça büyük bir distraksiyon hızıdır. Çünkü kemikleşmeyi sağlayan ve proksimal ve distal osteotomi uçları arasında oluşan erken kal dokusu daha az miktarda oluşup, bu hızda distraksiyon ile her iki tarafa çekilerek daha çabuk incelmektedir.

Kallus olgunlaşmasının değişik faktörlere bağlı olduğu bildirilmiştir. İyileşme kapasitesini etkileyen hasta yaşı, distraksiyon uygulanan bölgenin vaskülaritesi önemli etkenlerdir (21). Ayrıca günlük distraksiyon hızı, distraksiyon şekli (sürekli ya da tek), distraktör stabilitesi de gözardı edilemez faktörlerdendir (102). Kallus olgunluğunu saptamayı sağlayan basit bir tetkik yöntemi yoktur. X-ray ile oldukça geç evrede yanıt alınabilmekte, ultrasonografi her zaman güvenilir sonuç vermemektedir. Ortopedik cerrahide stabilite düzeyinin tayini için değişik çalışmalar yapılmıştır (103). Kallus olgunluğundan emin olunamaması da fiksatorün geç çıkarılmasında etkin nedenlerdendir. Buradan yola çıkarak distraksiyon ve konsolidasyon hızının artırılmasının tedavi sürecini kısaltacağı düşünülmektedir. Literatürde değişik distraksiyon hızları denenmiş, ancak hızlı distraksiyonun bir aşamadan sonra non-union veya fibröz-uniona neden olduğu ifade edilmiş ve distraksiyon osteogenezi sürecinin kısaltılmasının hızlı distraksiyon dışında bir yöntemle gerçekleştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (14, 104, 105).

Distraksiyon osteogenezinde kallus iyileşmesini hızlandırmak amacıyla literatürde uygulanan yöntemler arasında hidrolik distraktörlerle süregen devamlı distraksiyon (29), kompresyon-distraksiyon siklusları ile mekanik stimülasyon (106), düşük yoğunluklu ultrasonografi (107), osteoblast benzeri hücre transplantasyonu (108), elektrostimülasyon (109), kalsiyum sülfat enjeksiyonu (110), sistemik rekombinant growth hormon uygulaması (111), BMP-7 enjeksiyonu (20, 112) sayılabilmektedir. Sözü edilen tekniklerin kimilerinin uygulama zorluğu, enfeksiyon riskini arttırmaları, hasta uyumunun güçlüğü, kimilerinde beklenen etkinliğin gösterilememesi, veya uygulanan osteoindüktif faktörlerin biyoyıkımının hızlı olması gibi sebeplerle sınırlı etkinlik sergilemesi gibi dezavantajları vardır. Sayılan nedenlerden ötürü literatürde halen distraksiyon osteogenezini hızlandıracak etkin ve yaygın kabul görmüş bir yöntem bulunmamaktadır. Bununla beraber son yıllarda osteoindüktif ve osteokondüktif ajanların kemik iyileşmesi ve distraksiyon osteogenezinin etkinliğini arttırmaya yönelik

çalışmalar hız kazanmıştır. Literatürde bu iki ajanın kombine edilerek kullanıldığı araştırmalar skafoldlar yardımı ile defekt rekonstrüksiyonu esasına dayanmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz araştırmada ise distraksiyon ilerletildikçe hem osteoindüktif (BMP-2), hem osteokondüktif (kitosan mikrokürecikler) ajanlar birbirine entegre edilmiş halde distraksiyon alanına ihtiyaç gerektiğçe, kontrollü miktarda uygulanarak bu alandaki kemikleşme miktarı artırılmıştır. Bir başka deyişle literatürdeki gibi bir kemik defekt oluşturulup buraya skafoldlar ile osteoindüktif ve osteokondüktif ajanlar yerleştirilerek defekt doldurulmamış, kemik defekti yavaş yavaş oluşturulurken bir yandan da defekt sözü edilen teknik ile kemikleştirilmiştir. BMP'nin kemikleşmeyi doz bağımlı olarak arttırdığı ve distraksiyonun konsolidasyon evresini kısalttığı bilinmektedir (84, 85). Bu nedenle deney grubunda gözlenmiş olan kemikleşme, daha yüksek dozlarda BMP kullanımı ile hem daha belirginleşecek, hem de daha hızlandırılacaktır.

Osteodistraksiyon sırasında süregen kemik oluşumu tekrarlayan mikrofraktürlere değil yükselmiş endojen BMP-2 ve BMP-4'e bağlanmaktadır (80). BMP moleküllerinin ekspresyon paterni, molekülün üretiminde mekanik uyarımın doğrudan veya dolaylı olarak üretime katkıda bulunduğunu göstermektedir (113). Distraksiyon sürdükçe BMP-2 ve BMP-4'ün yüksek seyrettiği saptanmıştır (80). Bu nedenle klinik açıdan bir değerlendirme yapılacak olunursa, distraksiyon osteogenezinin egzojen BMP ile hızlandırılmasında endojen BMP üretiminin durduğu konsolidasyon evresine odaklanılmasının doğru olacağı bildirilmektedir (113). Buradan esinlenilerek distraktör yerleştirilirken uygulanacak tek doz BMP yerine uygun taşıyıcıda depolanıp, kontrollü, süregen ve daha uzun süreli BMP uygulamanın distraksiyon osteogenezini hızlandıracağı düşünülmüştür.

Literatürde sürekli osteoindüktif ajan uygulamasını sağlayan bir distraksiyon sistemi saptanamamıştır. Grayson ve arkadaşlarınca geliştirilen bir eksternal distraktörde dışarı uzanım sergileyen kanüle edilmiş tesbit vidalarının içerisinde açılan bir delikten spongioz kemik içerisine herhengi bir kimyasal ajan enjekte edilebilecek bir düzenek geliştirilmiştir (114).

Ancak sözü edilen distraktör eksternal yerleşimlidir. Klinikte internal distraktörlerin kullanılmasının birtakım avantajları vardır. Bular arasında, travmaya ve enfeksiyon gelişimine açık olmaması, daha az skar bırakarak estetik sonuçlarının daha iyi olması, hastanın günlük aktivitesini engellememesi, bu sayede iş gücü kaybının ve dolayısıyla maliyetinin daha az olması ve eksternal distraktörlere göre daha stabil olması sayılabilmektedir (26, 27, 28). Grayson ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu distraktörde enjeksiyon esnasında kemik içi ortamın dış ortam ile teması söz konusudur (114). Dolayısı ile bu sayılan faktörler enfeksiyon gelişimini kolaylaştıracak etkenler olarak görülmektedir. Ayrıca sistem, sürekli ve kontrollü olarak ilaç uygulama olanağı tanımamaktadır. Sözü edilen distraktörün bir diğer dezavantajı ise uygulanan medikasyonun osteotomi hattına yakın kansellöz kemiğe verilmesi, doğrudan distraksiyon hattının içerisine verilmemesidir. Dolayısı ile distraksiyon hattının uzağında kansellöz kemiğe verilen ajanın distraksiyon alanındaki hücresel yanıtı ne ölçüde etkileyeceği, etkilese de nasıl standardize edileceği tartışmalıdır.

Yeni araştırmalar BMP moleküllerinin ortama aktif halde salındıklarını, bununla beraber birkaç molekülün reseptörlere bağlanmadan önce BMP ile kompleksler oluşturarak bu BMP moleküllerinin fonksiyonlarını regüle ettiğini göstermektedir (115). Uygulanan BMP'nin stabilitesi yapılacak araştırmanın sonucunu etkileyebilecek önemli bir faktör olarak görülmektedir. BMP molekülünün kuvvetli katlanmış yapısı ve disülfid bağları ile stabilize edilmiş olması nedeniyle kendi içinde stabil bir protein olduğu bilinmektedir (52). Ayrıca molekülün orjinal elde edildiği yöntemde, kemik mineral içeriği hidroklorik asit kullanılarak ayrıştırıldığı ve aylarca üreye maruz bırakıldığı halde aktivitesini koruduğu bilinmektedir (52). Bu nedenlerle distraktör içerisine kitosan taşıyıcıya entegre edilerek yerleştirilmiş olan BMP'nin gerek distraksiyon sürecinde gerekse konsolidasyon evresinde stabilitesini koruyarak inaktive olmayacağı düşünülmüştür.

Ekstraselüler matriks lokal BMP konsantrasyonunun ayarlanmasında aktif rol üstlenmektedir. In vitro koşullarda BMP-3 ve BMP-4 ekstraselüler matriksin temel yapı taşlarından olan tip I kollajene ve bazal membranın temel yapı taşı olan tip IV kollajen ve heparin'e bağlanmaktadır. Literatürde BMP-4'ün bu ekstraselüler matriks elemanlarından kontrollü salımının ve bu ekstraselüler matriks elemanlarının spesifik organizasyonu sayesinde mezankimal hücrelerin diferansiyasyonunun ve osteoprogenitör hücrelere vasküler yapıların eşlik etmesinin regüle edildiğine dair yayınlar mevcuttur (116, 117). Saflaştırılmış çözünebilir BMP fraksiyonu (20kDa), uygun taşıyıcı ile uygulandığında aktivitesini daha iyi sergilemekte iken, çözünür olmayan BMP fraksiyonu (14kDa'luk proteinden ayrılmamış form), taşıyıcı bir sistem olmaksızın da kemikleşmeyi uyarmaktadır. Çözünebilir saflaştırılmış form tek başına uygulandığında ise kemikleşmeyi uyarmamaktadır (86). Buradan yola çıkarak BMP ile daha iyi sonuçlar alabilmek amacıyla uygun bir taşıyıcı ortam saptanmasına gereksinim duyulmuştur.

Günümüzde halen literatürde etkin kemik iyileşmesi için uygulanması gereken BMP dozuna yönelik görüş birliği sağlanamamıştır. Çalışmalarda 10 ng'dan 1 mg'a kadar değişen aralıkta farklı dozlar denenmiştir (73). Araştırmamızda, BMP'nin uzun süre yavaş etki göstermesi planlandığından BMP-2 dozu her bir denek için toplam 2µgr olacak şekilde hazırlanmıştır. Literatürde kitosana yüklenerek uygulanan büyüme faktörlerinin yaklaşık %55'inin ilk 24 saatte ortama salındığı, bir hafta sonrasında ise uygulanan dozun yaklaşık %0.5-1'i oranında bir miktarın sürekli salınarak düzeyinin korunduğu gösterilmiştir (93). Doğal ortamda kemik dokusunda 1 µgr/gr BMP bulunmaktadır. 10ngr/ml konsantrasyonda BMP dozu ile ortamdaki potansiyel osteoprogenitör hücre sayısının diferansiyasyonunda, yine aynı doz ile alkalen fosfataz aktivitesinde belirgin artış sağlanabilmektedir. Sonuç olarak ilk yirmidört saatte kitosandan yüksek oranda BMP-2 salınsa da salım kinetiği dengeye ulaştığında salınan miktar, fizyolojik ortamda yeterli osteoindüktif etkiyi sağlayacak düzeydedir (72). Kitosandanki BMP-2 salım

kinetiğinin çalışılabilmesi için bu molekülün I^{125} ile işaretlenmesi gerekmektedir. Ancak bu işaretleme işleminin maliyeti yüksektir. Bu nedenle klinik uygulama öncesi kitosanın *invivo* salım kinetiğinin çalışmasının ayrı bir araştırma konusu olarak düşünülmesi uygun olacaktır.

BMP-2'nin uygun taşıyıcı ortamda korunması ve taşınması çalışma sonucuna doğrudan etkiyecek önemli bir faktördür. Biyomateryaller kullanılarak yapılan araştırmalarda iki nokta göz önünde tutulmaktadır. Bunlardan birisi, materyal ile çevre dokunun kısa süreli etkileşimi, diğeri ise biyomateryalin muhtemel toksisitesi, uygulama alanındaki fonksiyonel performansı ile biyoyıkılabilirliği olarak ifade edilmektedir (118). Taşıyıcı ortam, kolay üretilebilir, kontrolsüz difüzyona izin vermeyen, BMP-2 ile kısmi stabilite sağlayan ve moleküler yapısını değiştirmeyecek nitelikte bir etkileşimi olan, biyouyumlu, immün ve allerjik yanıt oluşturmeyen kolay rezorbe olan, yapısal olarak stabil, kolay şekillendirilebilen niteliklerde olmalıdır. Literatürde bazı biyomateryellerin kemik iliğini baskıladığı bildirilmiştir. Çalışmamızda kitosan böyle bir etki göstermemiştir. Bu yönüyle kitosan, güvenle kullanılabilir bir taşıyıcı ajan olarak görülmektedir. Daha önce yürütülmüş ve kalvaryal kemik defektlerinde kullanılan kemik greftlerinin yaşamsallıklarının biyomateryaller ile artırılmasını konu alan bir çalışmada BMP-2 ile beraber kullanılan kitosanın biyouyumlu bir materyal olduğu saptanmıştır-(Canter H. I . Tez, 2004).

Jel kıvamında viskozitesi olan bir taşıyıcı ortamın seçilme nedeni gerek peroperatif, gerekse implantasyon sonrası distraksiyon süreci sonuna kadar oluşacak hareket sonucu haznenin ilacın kontrolsüz akışının engellenmesidir. Haznenin arka kısmında piston bulunduğu için açıklık sadece ön tarafta bulunmaktadır. Bu nedenle ön açıklıktan hava girdiği takdirde ilacın dışarı akması söz konusu olacaktır. Ancak jel viskozitesindeki taşıyıcı ortamda konuşlanmış ilaç, havanın içeri kolay girişini engellemektedir. Sözü edilen açıklığın çapı hazne çapından daha küçük olarak dizayn edilmiştir. Bu da dışarı akışı engelleyen bir diğer faktördür.

Tüm bu faktörler ilacın ortama istenen zamanda istenen dozda salıverilmesini sağlamaktadır.

Geliştirilen distraktör ile distraksiyon alanına herbir denek için planlanan 2µgr'lık BMP salımı 8 günde sağlanmaktadır. Ancak molekülün serbest hale geçerek etkinliğini sergilemesi kitosan mikroküreciklerden salınması ile gerçekleşmektedir. Bu sayede kemikleşme alanına BMP uygulaması iki ayrı basamakta kontrol edilerek daha geniş bir zamana yayılmaktadır. Bir başka deyiş ile BMP sadece distraksiyon esnasında değil konsolidasyon evresinde de etkinlik gösterecek şekilde distraksiyon hattına bırakılmaktadır.

Kemik oluşumunun incelendiği çalışmalarda bakılması gereken önemli bir parametre de yeni oluşan kemikteki kemik iliği değişiklikleridir. Kontrol grubunda distraksiyon kenarının oldukça sınırlı kemikleşme göstermesi nedeniyle bu grupta iliğin yeniden yapılanma süreci distraksiyon zonu boyunca kesintiye uğradığı, deney grubunda ise osteotomi hatlarındaki genç spongiyöz kemik adacıklarının komşuluğunda; yağlı, erişkin tipi ilik elemanlarının yapılanmakta olduğu dikkati çekmiştir .

Hızlı ve etkin bir distraksiyon yönteminin geliştirilmesi, tümör cerrahisi sonrası vaskülarize kemik greftleri ile rekonstrüksiyona ihtiyaç olmaksızın daha geniş eksizyon marjı ile cerrahi tedavi uygulama şansı sağlayacaktır. Bu sayede kimi olgularda lokal rekürrens gelişme ihtimali azaltılmış olacaktır. Cerrahi tedavinin radyoterapi ile kombine edilmesi gereken durumlarda distraksiyon uygulamak daha mümkün bir tedavi yaklaşımı olarak görülecektir.

Travmaya sekonder oluşan defektlerin tedavisi ve hipoplastik iskeletin rekonstrüksiyonunda daha hızlı ve başarılı sonuçlar alınması sağlanabilecektir. Taşıyıcı ortama osteoindüktif ajanın yanısıra antibakteriyal ajanların da yerleştirilmesi, kontrollü salınan antibiyotikler sayesinde travmatik olgularda enfeksiyon riskinin baskılanması ile distraksiyonun daha erken başlamasına olanak tanıyabilecektir.

Literatürde, BMP'nin distraksiyon osteogenezinde sürekli uygulandığı bir diğer model bulunmamaktadır. Distraksiyon sürecinde tepe yapan BMP moleküllerinin konsolidasyon evresinde de fizyolojik düzeyin üzerindeki bir dozda, kemikleşme alanında bulunması BMP moleküllerinin kemikleşmenin bu evresindeki biyodinamizminin aydınlanmasına katkıda bulunacaktır.

Geliştirilen, sürekli osteoindüktif ajan salımı sağlayan yeni bir distraktör ile osteoindüktif ajanların yanısıra klinik gereksinimlere göre antibakteriyel veya antineoplastik ajanların da kullanılması mümkündür. Bu sayede, sözü edilen diğer ilaçların da kontrollü salım sistemleri kullanılarak daha uzun süreli, lokalize olarak daha yüksek ve sabit dozda ihtiyaç duyulan bölgeye uygulanma şansı doğacaktır.

Bilindiği üzere distraksiyon osteogenezini uygulanan hastalarda tedavi başarısını uygulanan cerrahi tedavinin dışında etkileyen önemli bir faktör de hasta uyumudur. Hastaların, tedavi sırasında günlük aktivitelerini yerine getirebilmeleri, sosyal ortamlarında taşıdıkları distraktör ile rahatsızlık hissetmemeleri ve tedavi süresinin kısa olması uyumlarını arttıracaktır. Kontrollü osteoindüktif madde salarak distraksiyon osteogenezinin hızlandırılmasını sağlayan internal yerleşimli bir distraktörün hasta uyumunu kolaylaştıracağı ve böylece daha iyi klinik sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir.

Kemik doku defektleri rekostrükte edilirken üst düzeyde hasta uyumu ile beraber kısa süreli ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, sağaltım masraflarının en aza indirilmesine yardımcı olacaktır. Dahası, kısa hospitalizasyon süresi ve hızlı sosyal adaptasyonun sağlanması sayesinde hastaların tedavi süreci nedeniyle çalıştıkları iş kolunda neden oldukları iş gücü kaybı en az düzeye indirgenecektir.

Yürütülmüş olan çalışmada, kontrollü BMP salabilen bir distraktör kullanılarak klinikte distraksiyon osteogenezini hızlandırabilecek araştırmalara ışık tutacak deneysel bir model geliştirilmesi amaçlanmıştır. Araştırmanın sonucunda; distraksiyon osteogenezinde, distraksiyon

esnasında oluşturulan kemik defekt alanına, kontrollü osteoindüktif ajan salınmasının sadece distraksiyon uygulanmasına göre daha etkin kemikleşme sağladığı saptanmış, histolojik veriler iyileşmenin deney grubunda daha hızlı olduğunu göstermiştir.



KAYNAKÇA:

1. Habal MB, Reddi AH Bone grafts and bone induction substitutes.
Clin Plast Surg. 1994; 21(4): 525-42
2. Boden SD Bioactive factors for bone tissue engineering
Clin Orthop. 1999; (367 Suppl): S84-94
3. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM Bone growth factors
Orthop Clin North Am. 2000; 31(3): 375-88
4. Zlotolow DA, Vaccaro AR, Salamon ML, Albert TJ The role of human
bone morphogenetic proteins in spinal fusion
J Am Acad Orthop Surg 2000; 8(1): 3-9
5. DeLacure MD Physiology of bone healing and bone grafts.
Otolaryngol Clin North Am. 1994; 27(5): 859-74
6. Uddstromer L, Ritsila V Healing of membranous and long bone
defects. An experimental study in growing rabbits.
Scand J Plast Reconstr Surg. 1979; 13(2): 281-7
7. Costantino PD, Friedman CD Synthetic bone graft substitutes.
Otolaryngol Clin North Am. 1994; 27(5): 1037-74
8. Craft PD, Sargent LA Membranous bone healing and techniques in
calvarial bone grafting.
Clin Plast Surg. 1989; 16(1): 11-9
9. Nakashima K, Crombrughe B Transcriptional mechanisms in
osteoblast differentiation and bone formation.
Trends in Genetics. 2003; 19(8): 458-466

10. Codivilla, A.
On the means of lengthening in the lower limbs, the muscles and tissues
are shortened through deformity.
Am J. Orthop. Surg. 2: 353, 1905
11. Putti V.
The operative lengthening of the femur. 1921.
Clin Orthop. 1990 Jan;(250):4-7.
12. Ilizarov GA, Berko VG.
[X-ray dynamics of bone regenerate development during experimental
lengthening of the femur]
Ortop Travmatol Protez. 1976 Dec;(12):25-31.
13. Ilizarov GA.
The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I.
The
influence of stability of fixation and soft-tissue preservation.
Clin Orthop. 1989 Jan;(238):249-81.
14. Ilizarov GA.
The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II.
The
influence of the rate and frequency of distraction.
Clin Orthop. 1989 Feb;(239):263-85.
15. Ilizarov GA.
Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening.
Clin Orthop. 1990 Jan;(250):8-26. Review
16. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ Jr.
Mandibular lengthening by gradual distraction. Preliminary report.

- Plast Reconstr Surg. 1973 May;51(5):506-8.
17. McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Thorne CH, Grayson BH.
Lengthening the human mandible by gradual distraction.
Plast Reconstr Surg. 1992 Jan;89(1):1-8; discussion 9-10.
 18. Aida T, Yoshioka I, Tominaga K, Fukuda J.
Effects of latency period in a rabbit mandibular distraction
osteogenesis.
Int J Oral Maxillofac Surg. 2003 Feb;32(1):54-62
 19. Swennen G, Dempf R, Schliephake H.
Cranio-facial distraction osteogenesis: a review of the literature. Part
II:
Experimental studies.
Int J Oral Maxillofac Surg. 2002 Apr;31(2):123-35.
 20. Terheyden H, Wang H, Warnke PH, Springer I, Erxleben A, Ludwig K,
Rueger DC.
Acceleration of callus maturation using rhOP-1 in mandibular
distraction
osteogenesis in a rat model.
Int J Oral Maxillofac Surg. 2003 Oct;32(5):528-33
 21. McCarthy JG, Stelnicki EJ, Mehrara BJ, Longaker MT.
Distraction osteogenesis of the craniofacial skeleton.
Plast Reconstr Surg. 2001 Jun;107(7):1812-27.
 22. Kim IS, Park JW, Kwon IC, Baik BS, Cho BC.
Role of BMP, betaig-h3, and kitosan in early bony consolidation in
distraction osteogenesis in a dog model.
Plast Reconstr Surg. 2002 May;109(6):1966-77.

23. Warren SM, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Paccione MF, Greenwald JA, Spector JA, Longaker MT.
Rat mandibular distraction osteogenesis: part III. Gradual distraction versus acute lengthening.
Plast Reconstr Surg. 2001 Feb;107(2):441-53
24. Labbe D, Nicolas J, Kaluzinski E, Soubeyrand E, Sabin P, Compere JF, Benateau H.
Gunshot wounds: reconstruction of the lower face by osteogenic distraction.
Plast Reconstr Surg. 2005 Nov;116(6):1596-603.
25. Anderson PJ, Tan E, David DJ.
Simultaneous multiple vector distraction for craniosynostosis syndromes.
Br J Plast Surg. 2005 Jul;58(5):626-31.
26. Rubio-Bueno P, Padron A, Villa E, Diaz-Gonzalez FJ.
Distraction osteogenesis of the ascending ramus for mandibular hypoplasia using extraoral or intraoral devices: a report of 8 cases.
J Oral Maxillofac Surg. 2000 Jun;58(6):593-9; discussion 600-1.
27. Klein C, Howaldt HP.
Mandibular distraction osteogenesis as first step in the early treatment of severe dysgnathia in childhood.
J Orofac Orthop. 1996 Feb;57(1):46-54. English, German.
28. Havlik RJ, Bartlett SP.
Mandibular distraction lengthening in the severely hypoplastic mandible: a problematic case with tongue aplasia.
J Craniofac Surg. 1994 Nov;5(5):305-10; discussion 311-2

29. Wiltfang J, Kessler P, Merten HA, Neukam FW.
Continuous and intermittent bone distraction using a microhydraulic cylinder:
an experimental study in minipigs.
Br J Oral Maxillofac Surg. 2001 Feb;39(1):2-7.
30. Tuncbilek G, Mavili ME, Vargel I, Enacar A, Erk Y.
Midface distraction using spring scale attached to rigid external device.
Plast Reconstr Surg. 2004 Apr 15;113(5):1410-6.
31. Burstein FD, Williams JK, Hudgins R, Graham L, Teague G, Paschal M,
Single-stage craniofacial distraction using resorbable devices.
J Craniofac Surg. 2002 Nov;13(6):776-82.
32. Hardin CK.
Banked bone.
Otolaryngol Clin North Am. 1994 Oct;27(5):911-25.
33. Dodd CA, Fergusson CM, Freedman L Allograft vs autograft bone in scoliosis surgery. J Bone Joint Surg (Br) 1988, 70: 431-434
34. Montgomery DM, Aronson DD, Lee CL, LaMont RL Posterior spinal fusion: allograft versus autograft bone. J Spinal Disord. 1990; 3(4) : 370-5
35. Barrack RL.
Bone graft extenders, substitutes, and osteogenic proteins.
J Arthroplasty. 2005 Jun;20(4 Suppl 2):94-7.

36. Parikh SN.
Bone graft substitutes in modern orthopedics.
Orthopedics. 2002 Nov;25(11):1301-9; quiz 1310-1
37. Ueda H, Hong L, Yamamoto M, Shigeno K, Inoue M, Toba T, Yoshitani M, Nakamura T, Tabata Y, Shimizu Y.
Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor-beta1 to promote bone repair in skull defects in rabbits.
Biomaterials. 2002 Feb;23(4):1003-10.
38. Hojo M, Inokuchi S, Kidokoro M, Fukuyama N, Tanaka E, Tsuji C, Miyasaka M, Tanino R, Nakazawa H.
Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute.
Plast Reconstr Surg. 2003 Apr 15;111(5):1638-45.
39. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL.
Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression.
Tissue Eng. 2004 Mar-Apr;10(3-4):465-74.
40. Liu LS, Thompson AY, Heidarman MA, Poser JW, Spiro RC.
An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration.
Biomaterials. 1999 Jun;20(12):1097-108.
41. Lee TT, Wang MM, Hou RC, Chen LJ, Su RC, Wang CS, Tzen JT.
Enhanced methionine and cysteine levels in transgenic rice seeds by the accumulation of sesame 2S albumin.
Biosci Biotechnol Biochem. 2003 Aug;67(8):1699-705.
42. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL.
Bone tissue engineering: state of the art and future trends.

- Macromol Biosci. 2004 Aug 9;4(8):743-65. Review.
43. Wang YC, Lin MC, Wang da M, Hsieh HJ.
Fabrication of a novel porous PGA-kitosan hybrid matrix for tissue engineering.
Biomaterials. 2003 Mar;24(6):1047-57.
44. Taboas JM, Maddox RD, Krebsbach PH, Hollister SJ.
Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds.
Biomaterials. 2003 Jan;24(1):181-94.
45. Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH.
Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications.
Biomaterials. 2002 Feb;23(4):1169-85.
46. Kweon H, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee HS, Oh JS, Akaike T, Cho CS.
A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering.
Biomaterials. 2003 Feb;24(5):801-8.
47. He S, Yaszemski MJ, Yasko AW, Engel PS, Mikos AG.
Injectable biodegradable polymer composites based on poly(propylene fumarate) crosslinked with poly(ethylene glycol)-dimethacrylate.
Biomaterials. 2000 Dec;21(23):2389-94.
48. Kohn J, Langer R.
Poly(iminocarbonates) as potential biomaterials.
Biomaterials. 1986 May;7(3):176-82.
49. Urich KE, Ibim SE, Larrier DR, Langer R, Laurencin CT.

- Chemical changes during in vivo degradation of poly(anhydride-imide) matrices.
Biomaterials. 1998 Nov;19(22):2045-50
50. Frost HM.
The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I.
Clin Orthop Relat Res. 1989 Nov;(248):283-93.
51. Frost HM.
The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II.
Clin Orthop Relat Res. 1989 Nov;(248):294-309.
52. Wozney JM.
Overview of bone morphogenetic proteins.
Spine. 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1):S2-8. .
53. Urist MR.
Bone: formation by autoinduction.
Science. 1965 Nov 12;150(698):893-9.
54. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, Chien C. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 Dec;70(12):3511-5.
55. Urist MR, Mikulski A, Lietze A.
Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Apr;76(4):1828-32.
56. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP.
Biosynthetic bone grafting.
Clin Orthop. 1999 Oct;(367 Suppl):S107-17.
57. Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z.

- Bone and cartilage tissue engineering.
Clin Plast Surg. 1999 Oct;26(4):629-45, ix.
58. Fleming JE, Cornell CN, Muschler GF Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering Orthop Clin North Am. 2000; 31(3): 357-74
59. Karsenty G The genetic transformation of bone biology
Genes Dev. 1999; 13(23): 3037-51
60. Hall BK, Miyake T All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development
Bioessays. 2000; 22(2): 138-47
61. Jadowiec JA, Celil AB, Hollinger JO.
Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents.
Expert Opin Biol Ther. 2003 Jun;3(3):409-23.
62. Yoon ST, Boden SD.
Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies.
Clin Orthop Relat Res. 2002 Feb;(395):33-43.
63. Govinden R, Bhoola KD.
Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta.
Pharmacol Ther. 2003 May;98(2):257-65. Review.
64. Lind M, Schumacker B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bunger C.
Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae.

Acta Orthop Scand. 1993 Oct;64(5):553-6.

65. Canalis E, Agnusdei D.
Insulin-like growth factors and their role in osteoporosis.
Calcif Tissue Int. 1996 Mar;58(3):133-4.
66. Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, Nagashima M, Nakamura T.
Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats.
Bone. 2003 May;32(5):491-501.
67. Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, Nishida K, Manabe H, Oohashi T, Inoue H, Ninomiya Y.
Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis.
J Biochem (Tokyo). 2003 May;133(5):633-9.
68. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF.
Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow.
Tissue Eng. 1998 Winter;4(4):415-28.
69. Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M.
Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats.
Br J Oral Maxillofac Surg. 2003 Jun;41(3):173-8.
70. Ebara S, Nakayama K.

Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity.

Spine. 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1):S10-5

71. **Bottner M, Krieglstein K, Unsicker K The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. J Neurochem. 2000; 75(6): 2227-40**
72. **Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. J Cell Biol. 1991; 113(3): 681-7**
73. **Schilephake H Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. Int J Oral Maxillofac Surg. 2002; 31(5): 469-84**
74. **Sakou T Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone. 1998; 22(6): 591-603**
75. **Helm G, Anderson DG, Anderson GBJ, Boden SD, Damien C, Ebara S, Lane JM, McKay M, Sandhu HS, Seeherman H, Wozney J Summary Statement: Bone Morphogenetic Proteins Spine. 2002; 27(16S):pS9**
76. **Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. Cell. 1996 Aug 23;86(4):599-606.**
77. **Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4.**

Cell. 1996 Aug 23;86(4):589-98.

78. Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K.
Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects.
J Cell Biol. 1995 Jul;130(1):217-26.
79. Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, Steinbeisser H, Blum M.
The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4.
Mech Dev. 1997 Apr;63(1):39-50.
80. Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Yasui N.
Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis.
J Bone Miner Res. 1999 Jul;14(7):1084-95.
81. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM.
Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing.
J Orthop Res. 1995 May;13(3):357-67.
82. Iwasaki M, Nakahara H, Nakase T, Kimura T, Takaoka K, Caplan AI, Ono K.
Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteogenesis but does not affect chondrogenesis in osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells.
J Bone Miner Res. 1994 Aug;9(8):1195-204.

83. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T.
Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage.
J Cell Biol. 1994 Dec;127(6 Pt 1):1755-66. Erratum in: J Cell Biol 1995 Feb;128(4):following 713.
84. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al.
Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Mar;87(6):2220-4.
85. Li G, Bouxsein ML, Luppen C, Li XJ, Wood M, Seeherman HJ, Wozney JM, Simpson H.
Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis.
J Orthop Res. 2002 Jul;20(4):779-88.
86. Bessho K, Iizuka T.
Activity and solubility of bone morphogenetic protein derived from porcine bone matrix.
Br J Oral Maxillofac Surg. 1994 Apr;32(2):86-90.
87. Kusumoto K, Bessho K, Fujimura K, Akioka J, Ogawa Y, Iizuka T.
Prefabricated muscle flap including bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2: an experimental study of ectopic osteoinduction in a rat latissimus dorsi muscle flap.
Br J Plast Surg. 1998 Jun;51(4):275-80.
88. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H.

Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man.

Lancet. 2004 Aug 28-Sep 3;364(9436):766-70.

89. Kaş HS Kitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems.
J Microencapsulation, 1997, 14(6): 689-711
90. Berscht PC, Nies B, Liebendorfer A, Kreuter J Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidinone kitosan fleeces and determination of the in vitro release characteristics
Biomaterials. 1994; 15(8): 593-600
91. Park YJ, Lee YM, Park SN, Sheen SY, Chung CP, Lee SJ Platelet derived growth factor releasing kitosan sponge for periodontal bone regeneration
Biomaterials. 2000; 21(2): 153-9
92. Park YJ, Lee YM, Lee JY, Seol YJ, Chung CP, Lee SJ Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-kitosan sponge for guided bone regeneration
J Control Release. 2000; 67(2-3): 385-94
93. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, Chung CP The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a kitosan/tricalcium phosphate sponge carrier
J Periodontol. 2000; 71(3): 418-24
94. Chandy T, Sharma CP Kitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin
Biomaterials. 1993; 14(12): 939-44
95. Mattioli-Belmonte M, Gigante A, Muzzarelli RA, Politano R, De

- Benedittis A, Specchia N, Buffa A, Biagini G, Greco F N,N-dicarboxymethyl kitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage
Med Biol Eng Comput. 1999; 37(1): 130-4
96. Sanfold PA, 1989, Kitosan: commercial uses and potential applications. In Chitin and Kitosan-Sources, Chemistry, Physical Properties and Applications, edited by G.Skjak-Break, T. Anthonsen and P. Sanford (London: Elsevier), pp 51-70
97. Zahraoui C, Sharrock P.
Influence of sterilization on injectable bone biomaterials.
Bone. 1999 Aug;25(2 Suppl):63S-65S
98. Royals MA, Fujita SM, Yevey GL, Rodriguez J, Schultheiss PC, Dunn RL. Biocompatibility of a biodegradable in situ forming implant system in rhesus monkeys.
J Biomed Mater Res 1999; 45:231-239.
99. An YH and Friedman RJ eds. Animal Models in Orthopedic Research, An YH and Friedman RJ eds., CRC press, Raton, pp 251-259, 1999.
100. Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fang TD, Fong KD, Shi YY, Song HM, Sahar DE, Longaker MT.
Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults.
Plast Reconstr Surg. 2004 Sep 1;114(3):713-20.
101. Windhagen H, Kolbeck S, Bail H, Schmeling A, Raschke M.
Quantitative assessment of in vivo bone regeneration consolidation in distraction osteogenesis.
J Orthop Res. 2000 Nov;18(6):912-9.

102. Claes L, Laule J, Wenger K, Suger G, Liener U, Kinzl L.
The influence of stiffness of the fixator on maturation of callus after segmental transport.
J Bone Joint Surg Br. 2000 Jan;82(1):142-8.
103. Thorey F, Windhagen H, Linnenberg D, Nolle O, Maciejewski O, Spies C.
[Assessment of bone healing during callus distraction by an automatic torsional stiffness metering system]
Biomed Tech (Berl). 2000 Dec;45(12):343-8. German.
104. Stewart KJ, Lvoff GO, White SA, Bonar SF, Walsh WR, Smart RC, Poole MD.
Mandibular distraction osteogenesis: a comparison of distraction rates in the rabbit model.
J Craniomaxillofac Surg. 1998 Feb;26(1):43-9.
105. al Ruhaimi KA.
Comparison of different distraction rates in the mandible: an experimental investigation.
Int J Oral Maxillofac Surg. 2001 Jun;30(3):220-7.
106. Mofid MM, Inoue N, Atabey A, Marti G, Chao EY, Manson PN, Vander Kolk CA.
Callus stimulation in distraction osteogenesis.
Plast Reconstr Surg. 2002 Apr 15;109(5):1621-9.
107. Mayr E, Laule A, Suger G, Ruter A, Claes L.
Radiographic results of callus distraction aided by pulsed low-intensity ultrasound.
J Orthop Trauma. 2001 Aug;15(6):407-14.
108. Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, Tomita K, Minato H.

Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits.

J Bone Joint Surg Br. 1999 Jan;81(1):125-9.

109. Hagiwara T, Bell WH.
Effect of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis.
J Craniomaxillofac Surg. 2000 Feb;28(1):12-9.
110. Cho BC, Park JW, Baik BS, Kwon IC, Kim IS.
The role of hyaluronic acid, kitosan, and calcium sulfate and their combined effect on early bony consolidation in distraction osteogenesis of a canine model.
J Craniofac Surg. 2002 Nov;13(6):783-93.
111. Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, Kolbeck SF, Weiler A, Raun K, Kappelgard A, Skiaerbaek C, Haas NP.
Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis.
Bone. 1999 Feb;24(2):81-8.
112. Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, Cooper VN 3rd, Reddi AH.
Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7.
J Bone Joint Surg Am. 2003;85-A Suppl 3:124-30.
113. Rauch F, Lauzier D, Croteau S, Travers R, Glorieux FH, Hamdy R.
Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits.
Bone. 2000 Sep;27(3):453-9.
114. Grayson BH, Rowe NM, Hollier LH Jr, Williams JK, McCormick S, Longaker MT, McCarthy JG.

Development of a device for the delivery of agents to bone during distraction osteogenesis.

J Craniofac Surg. 2001 Jan;12(1):19-25.

115. Ebara S, Nakayama K.
Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity.
Spine. 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1):S10-5.
116. Reddi AH Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. Cytokine Growth Factor Rev. 1997; 8(1): 11-20
117. Reddi AH Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins.
Curr Opin Cell Biol. 1992; 4(5): 850-5
118. Roach HI, Shearer JR, Archer C.
The choice of an experimental model. A guide for research workers.
J Bone Joint Surg Br. 1989 Aug;71(4):549-53.
119. H.İ. Canter
Kalvarial Kemik Defekti Modelinde Bone Morphogenetik Protein-2 ve Transforming Growth Factor- β Kullanılmasının Allogreft Yaşamına Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi AD. Uzmanlık Tezi, Ankara, 2004.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/

06.01.2005

DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 06.01.2005 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI : 2005/1
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2004/38
KARAR NUMARASI : 2004/38-3
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Dr. Ersoy Konaş
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Wistar Albino Rat (18 adet).

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. M. Emin Mavili' nin araştırma yürütücüsü olduğu 2004/38 kayıt numaralı ve "*Kontrollü ilaç Salım Sistemleri ile BMP Salan Distraktör Kullanılarak Rat Femur Distraksiyonunun Hızlandırılması Mümkün müdür?*" konulu araştırma deney protokolü Hayvan Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Attila Dağdeviren (Başkan)

Prof. Dr. Sevim Dalkara (Üye)

Prof. Dr. Hakan Orer (Üye)

Prof. Dr. Sema Çalış (Üye)

Prof. Dr. Erdem Aydın (Üye)

Prof. Dr. Ömer Görduysus (Üye)

KATILMADI
Doç. Dr. Nuray Er (Üye)

Doç. Dr. Ahmet Alanay (Üye)

KATILMADI
Doç. Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)

Dr. V. H. Hyas Onbaşlar (Üye)

Avukat Oya Soyuer (Üye)