T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

RATLARDA DENEYSEL KIRIK MODELİNDE ÇÖZÜNEBİLİR GUANİLİL SİKLAZ AKTİVATÖR (VERİCIGUAT) TEDAVİSİ

Dr. Azat DZHUMUKOV

TIPTA UZMANLIK TEZI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. Muhammed Çağatay ENGİN

ERZURUM-2024

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİ ve TEZİ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Adı, Soyadı : Azat DZHUMUKOV	**Sınav tarihi:** 04/10/2024
Ana Bilim Dalı : Ortopedi ve Travmatoloji	
Tez Danışmanı ve Atanma Tarihi: Doç. Dr. Muhammed Çağatay ENGİN-2019	
Tezin Konusu ve Başlığı : Ratlarda Deneysel Kirik Modelinde Çözünebilir Guanilil Siklaz Aktivatör (Vericiguat) Tedavisi **Belirlenme Tarihi : 17.12.2021**	
Tezin Niteliği : ☒ Tıpta Uzmanlık Tezi ☐ Klinik Çalışmalar ( ) Prospektif ( ) Retrospektif ( ) Kesitsel ☒ Laboratuvar Çalışmaları ( ) Invitro (Cansız) Çalışmaları (x) Hayvan Çalışmaları	
Tez Sınavının Nasıl Yapıldığı: ☒ Yüz yüze katılım sağlanarak ☐ Online (Jürinin teşkil edilmesinde kurum dışından belirlenecek olan jüri üyesi, aynı il sınırları içerisinde bulunmadığından, tez sınavı dijital ortamda yapılmıştır.)	

II. KARAR
Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunma sınavının tamamlanması sonucunda adı geçenin tezinin, jüri üyelerince "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak; ☒ Kabulüne 1.Tez Sınavı ☐ Reddine (Eksikliklerin tamamlanması ve gerekli düzeltmelerin yapılması için uzmanlık öğrencisine, TUEY'nin 19. Maddesinin 6. fıkrası gereğince altı aylık ek bir süre verilmesine) 2.Tez Sınavı ☐ Reddine (TUEY'nin 19. Maddesinin 7. fıkrası gereğince, uzmanlık öğrencisinin uzmanlık öğrenciliği ile ilişiğinin kesilmesine) ☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

III. AÇIKLAMALAR

	IV. JÜRİ ÜYELERİ			
	Unvanı Adı Soyadı	**Uzmanlık Dalı**	**Kurum Bilgisi**	**İmza**
Jüri Başkanı	Prof. Dr. Orhan KARSAN	Ortopedi ve Travmatoloji	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Sinan YILAR	Ortopedi ve Travmatoloji	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Muhammed Çağatay ENGİN	Ortopedi ve Travmatoloji	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi	

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **I**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **III**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **IV**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VI**
TEŞEKKÜR ..... **VIII**
ÖZET ..... **IX**
ABSTRACT ..... **X**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER. **2**
2.1. Kemik Doku ve Yapısı 2
2.2. Kemik Histolojisi 2
2.3.Kemik Zarları 2
2.4. Kemik Hücreleri 3
2.5. Kemik Matriksi 5
2.6. Kemik Dolaşımı ve Fizyolojisi 5
2.7. Kemik Oluşum Tipleri 6
2.8. Kırık İyileşmesi 7
2.9. Kırık İyileşmesinde Etkili Faktörler 10
2.10. Kırık İyileşmesinin Biyomekaniği 13
2.11. Kırık İyileşmesini Artırmak İçin Uygulanan Yöntemler 13
2.12. Çözünür Guanilat Siklaz Aktivatörü: Vericiguat (Verquvo) 14
2.12.1. Vericiguat'ın Farmakodinamik Mekanizması 14
2.12.2. NO-cGMP Sinyal Yolu ve Kemik Metabolizması 15
2.12.3. Farklı Çalışmalarda Çözünebilir Guanilat Siklaz (sGC) Agonistlerinin Kemik Fonksiyonel Etkileri 16
3. GEREÇ VE YÖNTEM **19**
3.1. Denekler 19
3.2. Çalışma Grupları 21
3.3. Cerrahi Prosedür 22
3.4 İlaç Uygulaması 27
3.5. Deneylerin Sonlandırılması 28

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi 29
3.6.1. Radyografik İnceleme 29
3.6.2. Biyomekanik İnceleme 33
3.6.3. Histopatolojik İnceleme 34
3.6.4. İstatiksel Analiz 35
4. BULGULAR 36
4.1. Klinik Bulgular 36
4.2. Radyolojik Bulgular 36
4.3. Biyomekanik Bulgular 37
4.4. Histopatolojik Bulgular 43
5. TARTIŞMA 51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 60
7. KAYNAKLAR 61
EKLER 67

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Deney Gruplarının Tanıtımı 21
Tablo 3.2. Lane ve Sandhu'nun Radyografik Skorlaması 32
Tablo 3.3. Huo ve Arkadaşlarının Histolojik Skalası 35
Tablo 4.1. Kırık Oluşturulan Grupların Kaynama Ölçümlerinin Karşılaştırılması 37
Tablo 4.2. 28. Günlük Tüm Grupların Biyomekanik Değerleri 40
Tablo 4.3. 28. Günlük Tüm Grupların Yük ve Sertlik Değerlerininin Karşılaştırılması 42
Tablo 4.4. Kırık Oluşturulan Grupların 28. Günlük Histopatolojik Değerlendirmesi 44
Tablo 4.5. Tüm Grupların 28. Günük Nekrozun Histolojik Değerlendirmesi 44
Tablo 4.6. Tüm Grupların 28. Günlük İnflamasyonun Histolojik Değerlendirmesi 45
Tablo 4.7. Kırık Oluşturulan Grupların Kallus Oluşumu Değerlerinin Karşılaştırılması 49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Grupların Kendi İçinde Adlandırılması 21
Şekil 3.2. Isıtıcı ve Ped Kumandası 22
Şekil 3.3. Steril Cerrahi Masası ve Aletleri. 22
Şekil 3.4. İnsizyon Şekli ve Femur Kondillerinin Ortaya Konması 23
Şekil 3.5. Femurda İntramedüller Giriş Deliğinin Hazırlanması 23
Şekil 3.6. Kirshner Telin Yerleştirilmesi 24
Şekil 3.7. Kendi Tasarımımız Olan Pense İle Kapalı Kırık Oluşturulması 24
Şekil 3.8. K-Tel Ucunun Cildi Rahatsız Etmeyecek Şekilde Kesilmesi 25
Şekil 3.9. İnsizyon Sahasının Dikilmesi 25
Şekil 3.10. Röntgen Cihazının Ayarlanması 26
Şekil 3.11. Kırık Oluşumunun Radyolojik Olarak Doğrulanması 26
Şekil 3.12. İlacın Oral Gavajla Uygulaması 28
Şekil 3.13. Kontrol Grubu (Kemik Kırığı Olmayan) Ratların Femurlarının Örnekleri 29
Şekil 3.14. Deney Grubu (Kemik Kırığı Olan) Ratların Femurlarının Örnekleri 29
Şekil 3.15. Ratlara Direk Röntgenografi Çekimi 30
Şekil 3.16. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 1'in Ratların Görüntüsü 30
Şekil 3.17. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 2' in Ratların Görüntüsü 31
Şekil 3.18. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 3'ün Ratların Görüntüsü 31
Şekil 3.19. 7., 14 ve 28. Günlük Grup 4' ün Ratların Görüntüsü 31
Şekil 3.20. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 5'in Ratların Görüntüsü 32
Şekil 3.21. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 6'ın Ratların Görüntüsü 32
Şekil 3.22. Biyomekanik Test İçin Cihaz "İNSTRON 5982" 33
Şekil 3.23. İNSTRON Cihazının Kırma Aparatı 34
Şekil 4.1. Kırık Oluşturulan Grupların 7., 14. ve 28. Günlük Radyografik Değerlerinin Çizgi Grafisi 37
Şekil 4.2. 28. Günlük NK Grubunun Biyomekanik İncelemesi 38
Şekil 4.3. 28.Günlük PK Grubunun Biyomekanik İncelemesi 38
Şekil 4.4. 28.Günlük DVN Grubunun Biyomekanik İncelemesi 39
Şekil 4.5. 28.Günlük YVN Grubunun Biyomekanik İncelemesi 39
Şekil 4.6. 28.Günlük DVP Grubunun Biyomekanik İncelemesi 40
Şekil 4.7. 28. Günlük YVP Grubunun Biyomekanik İncelemesi 40
Şekil 4.8. Tüm Grupların 28. Günlük Biyomekanik Verileri. 43
Şekil 4.9. 28. Günlük NK Grubunun Doku Örneği 46

Şekil 4.10. 28. Günlük PK Grubunun Doku Örneği 46
Şekil 4.11. 28. Günlük DVN Grubunun Doku Örneği 47
Şekil 4.12. 28. Günlük YVN Grubunun Doku Örneği 48
Şekil 4.13. 28. Günlük DVP Grubunun Doku Örneği 48
Şekil 4.14. 28. Günlük YVP Grubunun Doku Örneği 49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACEİ : Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Inhibitörü
AP : Anterior-Posterior Röntgenografi
ATADEM : Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi
ARNI : Anjiyotensin Reseptör-Neprilisin Inhibitörleri
BMD : Kemik Mineral Yoğunluğu
BMP : Kemik Morfogenetic Protein
β-TCP : Beta Trikalsiyum Fosfat
Ca+2 : Kalsiyum
cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat
cGMP : Siklik Guanozin Monofosfat
DVN : Düşük Vericiguat Negatif
DVP : Düşük Vericiguat Pozitif
FDA : Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
HADYEK : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HE : Hematoksilen-Eosin
IGF : Insülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1 : İnterlökin 1
İM : İntramedüller
K- TELİ : Kirschner Teli
Mikro-BT : Mikro Bilgisayarlı Tomografi
mM : Mikro Moll
MRA : Mineralokortikoid Reseptör Antagonistleri
N : Newton
NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B
NK : Negatif Kontrol
nM : Nano Moll
NO : Nitrik Oksit
NOS : Nitrik Oksit Sentaz

NSAID **:** Non-Steroid Anti İnflamatuar İlaç

PDGF **:** Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PK **:** Pozitif Kontrol

PO4 **:** Fosfat

PPMH **:** Pluipotent Mezenkimal Hücreler

PTH **:** Paratiroid Hormonu

sGC **:** Çözünür Guanilat Siklaz Uyarıcısıdır

SGLT 2 **:** Sodyum-Glukoz Taşıma Proteini 2

TGF-α **:** Dönüştürücü Büyüme Faktörü-alfa

TGF-β **:** Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta

VASP **:** Vazodilatörü Stimule Eden Fosfoprotein

VEGF **:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

YÜTAM **:** Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi

YVN **:** Yüksek Vericiguat Negatif

YVP **:** Yüksek Vericiguat Pozitif

TEŞEKKÜR

2019 aralık ayında ihtisas eğitimine başladığım tarihten bu yana, gelişimimde büyük katkıları bulunan ve bilgi ile tecrübelerini bizlerden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Muhammed Çağatay ENGIN'e teşekkürlerimi sunarım. Beş yıllık asistanlık eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma minnettarlığımı ifade ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca üzerimdeki emekleriyle katkıda bulunan Prof. Dr. Orhan KARSAN, Prof. Dr. Naci EZIRMIK, Prof. Dr. Ömer Selim YILDIRIM, Prof. Dr. Ali AYDIN, Doç. Dr. Sinan YILAR, Doç. Dr. Emre PAKSOY, Doç. Dr. Kutsi TUNCER, Doç. Dr. Mehmet KÖSE, Dr. Öğrt. Üyesi Eyüp ŞENOCAK, Dr. Öğrt. Üyesi Cenk TURGUT, Dr. Öğr. Üyesi Ömer AYIK'a ve bana her konuda sürekli destek olan Uzman Dr. Bilal KARABAK'a, tezime verdikleri destek için hastanemiz "Patoloji Anabilim Dalı" öğretim üyesi Doç. Dr. Sevilay ÖZMEN, Doç. Dr. Onur CEYLAN'a "Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anabilim Dalı" nın öğretim üyesi Doç. Dr. Mümin Gökhan ŞENOCAK'a, "Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı''nın öğretim üyesi Kamber KAŞALI'ye ve hastanemiz klinikleri ile ameliyathanelerinde beraber çalıştığım doktor, hemşire, teknisyen ve diğer çalışanlara teşekkür ederim. Ayrıca çalışmanın gerçekleşmesine olanak sağlayan ve laboratuvar imkanlarını sağlayan "Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel ve Araştırma Merkezi" nde çalışanlarına da minnettarlığımı sunarım.

Hayatım boyunca manevi desteğini her daim arkamda hissettiğim, başta annem Aygül DZMUMANALIEVA olmak üzere, babam Tegisbek DZHUMUKOV'a, aileme ve sevgili eşime Shirin SHATMANOVA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Azat DZHUMUKOV

ÖZET

Ratlarda Deneysel Kirik Modelinde Çözünebilir Guanilil Siklaz Aktivatör (Vericiguat) Tedavisi

Amaç: Literatürde, Vericiguat'ın doza bağlı, osteoblastların proliferasyon ve farklılaşmalarında etkileri olduğu, ayrıca ratlarda kemik mineral yoğunluğunu artırdığına yönelik çalışmalar yer almış, ancak kırık iyileşmesine etkilerine ilişkin deneysel bir araştırma bulunamamıştır. Bu kapsamda, vericiguat'ın kırık iyileşmesine doğrudan katkı sağlayacağı değerlendirilerek, vericiguatın doza bağlı femur cisim kırıklarının kaynamasındaki etkisi; radyolojik, biyomekanik ve histolojik olarak incelenmiştir.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada 60 dişi rat kullanılmıştır. Genel anestezi altında ratların yarısına (Grup 2, Grup 5 ve Grup 6) sağ femurlarında standart kapalı cisim kırıkları oluşturulmuştur. Kırık sonrası aynı günden başlamak üzere hayvanlar sakrifiye edilene kadar deney gruplarına (Grup 3, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6) günlük vericiguat oral uygulanmıştır. 7., 14. ve 28. günlerde radiyolojik inceleme yapılmıştır. Ayrıca 28. gün sonra sakrifiye edilerek, kaynama dokuları biyomekanik ve histolojik olarak incelenmiştir.

Bulgular: 28. günlük biyomekanik değerlendirmede: kırık oluşturulan gruplar (Grup 2 ve Grup 6, Grup 5 ve Grup 6) arasında yük ortalamalarında anlamlı fark bulunurken (p=0,003), kırık oluşturulmayan gruplarda fark saptanmamıştır. 28. günlük histolojik incelemede kallus oluşumunda Grup 5 ve Grup 2 arası anlamlı fark bulunmuştur (p=0,014). 7., 14. ve 28. günlük radyolojik değerlendirmede gruplar arası istatiksel fark saptanmamıştır.

Sonuç: Vericiguat'ın ratlarda kırık iyileşmesi üzerine yapılan çalışmada, histopatolojik açıdan düşük dozda vericiguat'ın olumlu etkiler sağladığı, ancak biyomekanik açıdan yüksek dozun olumsuz etkileri gözlemlenmektedir. Radiyolojik olarak vericiguat kullanımı kırık iyileşmesi üzerinde hem olumlu hem olmsuz ekisini olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Rat, Vericiguat, Kırık Kaynaması, Doz Etkisi.

ABSTRACT

The Effect of Soluble Guanylate Cyclase Activator (Vericiguat) Treatment in an Experimental Fracture Model in Rats

Aim: Vericiguat has been reported to affect osteoblast proliferation and differentiation in a dose-dependent manner, increasing bone mineral density in rats. However, no studies have focused specifically on its role in fracture healing. This study evaluates Vericiguat's direct contribution to femoral shaft fracture healing, analyzing its effects using radiological, biomechanical, and histological methods across different doses.

Materials and Methods: In this study, 60 female rats were used. Under general anesthesia, standard closed shaft fractures were created in the right femurs of half of the rats (Groups 2, 5, and 6). Starting from the same day after the fracture, daily oral Vericiguat was administered to the experimental groups (Groups 3, 4, 5, and 6) until the animals were sacrificed. Radiological examinations were conducted on days 7, 14, and 28. Additionally, after day 28, the healing tissues were biomechanically and histologically evaluated post-sacrifice.

Results: At the 28th-day biomechanical assessment, a significant difference in load averages was observed between the fracture-induced groups (Groups 2, 5, and 6) ($p=0.003$). However, no significant differences were found among the non-fracture groups. In the histological analysis at 28 days, a significant difference in callus formation was identified between Group 5 and Group 2 ($p=0.014$). Radiological evaluations on the 7th, 14th, and 28th days did not reveal any statistical differences between the groups.

Conclusion: In the study on vericiguat's effects on fracture healing in rats, low-dose vericiguat showed positive histopathological effects, improving callus organization. However, high-dose vericiguat negatively affected biomechanical strength. Radiological analysis revealed no significant positive or negative impact on fracture healing.

Keywords: Rat, Vericiguat, Fracture Healing, Dose Effect.

1. GİRİŞ

Karmaşık biyolojik bir süreç olan kırık iyileşmesinde, kırık kemiğin onarımı kırık anında başlar. ABD'de bir yılda meydana gelen kırıkların %5-%10'unda çeşitli derecelerde iyileşme problemlerinin olduğu bildirilmiştir (1). Bu sorunlar, konunun önemini daha da artırmaktadır. Kaynamanın gecikmesi veya kaynamaması, ek medikal tedavilere, cerrahi müdahalelere, iş gücü kaybına ve maddi zararlara yol açabilmektedir. Bu sorunların kökeni genellikle tam olarak bilinmemekle birlikte, yaş, beslenme durumu ve hormonal değişiklikler, yetersiz redüksiyon, eşlik eden hastalıklar, enfeksiyonlar, kullanılan ilaçlar ve travmanın özellikleri gibi çeşitli faktörlerin kırık iyileşmesini etkilediği bilinmektedir (2).

Guanilat siklaz, siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezinden sorumlu bir enzimdir ve hücrelerde sinyal iletimi, gen ifadesi ve hücre hareketliliği gibi çeşitli işlevlerde karmaşık bir rol oynamaktadır (3,4). Kemik metabolizması bağlamında, guanilat siklaz aktivasyonu, osteoklast farklılaşması üzerinde hem inhibe edici hem de uyarıcı etkilere sahiptir (5). Araştırmalar, mekanik stimülasyonun guanilat siklaz aktivitesini artırarak osteoblast proliferasyonunu indükleyebileceğini göstermektedir (6). Vericiguat, yeni bir oral çözünür guanilat siklaz uyarıcısı olarak, doğrudan cGMP üretir ve 2020 yılında kalp yetmezliği hastalarında kardiyovasküler nedenlerden kaynaklanan ölüm yada hastaneye yatış sıklığını azaltma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (7).

Bu bulgular, guanilat siklazın kemik metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olduğunu ve modülasyonunun kemik hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde önemli etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır (3).

Bu bulgular ışığında, Vericiguat'ın kırık iyileşmesine etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotez doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmamızda, Vericiguat'ın ratlarda kapalı femur kırıkları ve sağlıklı kemik üzerindeki doza bağlı etkileri; klinik, radyolojik, biyomekanik ve histolojik açıdan incelenmiştir. Literatürde Vericiguat'ın kırık iyileşmesi üzerindeki etkisine dair herhangi bir deneysel çalışmanın bulunmadığı görülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER.

2.1. Kemik Doku ve Yapısı

Kemik dokusunun vücut için kritik rolü şöyle özetlenebilir: Kemik, organları ve boşlukları destekleyerek vücudun dengesini korur ve minerallerin depolanmasını sağlar. Ayrıca, kasların kuvvetini kemikler aracılığıyla harekete dönüştürür (8).

2.2. Kemik Histolojisi

Kemik dokusu genellikle iki ana yapıya sahiptir: sıkı (kortikal) ve süngerimsi (trabeküler). Kompakt kemik, çoğunlukla uzun kemiğin diyaframında bulunurken, trabeküler kemik ise iç organların desteklenmesi ve hücrelerin beslenmesi için boşluklu bir yapı oluşturur (9).

I. Kortikal kemik. Kemiğin dışını saran sert bir dokudur ve osteon adı verilen yapı elemanlarını içerir. Havers kanalları ise osteon içerisinde arteriyol, venül, lenfatik ve sinirleri barındıran uzunlamasına kanallardır. Volkmann kanalları ise periost altından başlayarak kompakt dokuyu enine kesen ve Havers kanallarını bağlayan kanallardır (9).

II.Spongioz kemik. Kompakt dokunun içinde bulunan trabeküllerin birbirleriyle birleşmesi, kemiğin dayanıklılığını sağlar. Trabeküllerin düzeni ve sayısı, kemik üzerindeki yüklenmelere bağlı olarak değişebilir ve bu değişiklikler kemiğin yeniden şekillenmesine yol açar. Kemik iliği, trabeküller arasındaki boşlukları dolduran bir yapıdır. Ayrıca, kemiğin dış yüzeyini kaplayan zar periosteum, iç yüzeyini örten zar ise endosteum olarak adlandırılır (10).

2.3.Kemik Zarları

Kemiklerin iç ve dış yüzeyleri, iki temel zar tarafından korunur: içte endosteum (iç zar) ve dışta periosteum (dış zar). Bu zarlar, kemiklerin büyümesi, onarımı ve metabolizmasında hayati rol oynayan, kemik oluşturan hücreler ve bağ dokusundan oluşur.

I.Periosteum

Periosteum, kemiğin yüzeyini (eklem yüzeyi hariç) örter ve kemiğin yaklaşık 1/3 dış kısmının beslenmesine katkıda bulunur. Çocuklarda periosteum kalın ve gevşek bağlı iken, erişkinlerde daha ince ve sıkı yapışır. Bu değişiklikler, kemik büyümesi ve gelişimi ile ilişkilidir. Periosteumun dış tabakası fibroz bağ dokusundan, iç tabakası ise osteojenik hücreleri içeren kambiyum tabakasından oluşur. Kambiyum tabakası pluripotent hücreler içerir ve kemikte enine büyümeyi sağlar. Bu özellikleriyle periosteum, kemiklerin gelişim ve büyüme süreçlerinde önemli bir görevesahtir (11).

II. Endosteum

Kemik iliği (medulla) dokusunu ifade etmektedir. Kemik iliği, kemiklerin merkezinde bulunan ve kan hücrelerini üreten hücreleri içeren bir doku tabakasıdır. Ayrıca osteojenik hücreleri de içerir. Bu yapı, kemiklerin iç kısmında bulunur ve kan elemanları oluşmasında önemli bir işleve sahiptir (12).

2.4. Kemik Hücreleri

Kemik dokusunda bulunan dört ana hücre tipi vardır.

I. Osteoprogenitör hücreler; kemik dokusunun ana hücreleri olarak bilinir ve mezenşimal kök hücrelerden türetilirler. Bu hücreler endosteum, periosteum gibi bölgelerde bulunur ve mitoz bölünme yoluyla olgun kemik hücrelerine farklılaşabilirler. Kemik büyümesi, zedelenme veya kırık tamiri gibi durumlarda aktif hale geçerek osteoblastlara dönüşebilirler. Bu süreç kemik dokusunun yeniden yapılanmasını sağlar (13).

II. Osteoblastlar; kemik matriksinin organik kısmının üretiminden sorumludur. Bu matris, Tip I kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler gibi çeşitli elementler içerir. Osteoblastların varlığı, kemik dokusunun inorganik bileşenlerinin çökelmesini sağlar. Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde bulunurlar ve yan yana dizilmiş tek katlı epiteli andırırlar. Osteoblastların osteositlere dönüşmesi sürecinde, lakuna adı verilen küçük boşluklar oluşur. Bu lakünaların içinde, osteositlerin

uzantılarıyla birlikte kısmen kalsifiye olmayan matriks bulunur. Osteoblastların salgıladığı matriks elemanları hücre yüzeyinden ayrılır ve yeni ancak henüz kalsifiye olmamış bir tabaka olan "osteoid" oluşturur. Kalsiyum tuzları bu osteoid yapısının içine çökerek organik matrisin sertleşmesini sağlayarak mekanik dirence karşı kemik dokusunun dayanıklılığını arttırır. Ayrıca, osteoblastlar tarafından üretilen alkalen fosfataz enzimi, kalsiyum tuzlarının fosfat (PO4) grupları ile birleşmesini sağlayarak ara maddede birikmesine yol açar ve böylece mineralizasyon sürecini gerçekleştirir (13).

III. Osteositler; esas kemik hücreleri olarak bilinir ve olgun kemik hücreleri olarak adlandırılırlar. Gelişim süreçlerini tamamladıkları için sentez yapma yetenekleri yoktur. Osteositler, lakünalar içinde bulunur; her bir lakünada bir osteosit yer alır. Osteosit uzantılarını ise ince silindirik matriks kanalcıkları içerir. Komşu hücre uzantıları, birbirleriyle iletişim kurarak hücreler arası bağlantılar oluştururlar. Bu yapının yardımıyla moleküller hücreden hücreye transfer edilir. Osteositler kemik matriksinin düzenlenmesinden sorumludur; ölüm durumunda matriksin bozulması gerçekleşebilir (14).

IV. Osteoklastlar. Büyük ve çok sayıda dallanmış hareket yeteneğine sahip hücrelerdir. Hücre gövdesinde genellikle beş ila elli veya daha fazla çekirdek bulunabilir. Kemik rezorbsiyonunun başladığı Howship lakunası adı verilen çukurlarda yer alırlar ve genellikle asidofilik bir sitoplazmaya sahiptirler. Aktif osteoklastlarda, kemik matrisine bakan yüzey düzensiz bir şekilde katlanır ve girintili çıkıntılı bir yapı meydana getirir. Bu fırçamsı kenar, küçük partiküllerin yakalanmasını ve enzimatik aktivitenin gerçekleşmesini kolaylaştırır. Ayrıca, bu yapı aktif rezorpsiyon alanının genişlemesine yardımcı olur. Osteoklastlar içerisinde bulunan yapılar şunlardır: gelişmiş bir Golgi kompleksi, lizozomlar, bol miktarda serbest ribozomlar, granüler endoplazmik retikulum parçaları ve mitokondriler. Kalsiyum kristalleri kırıklar arasında veya sitoplazmik vakuollerde görülebilir, ancak bu olaylar hücre sitoplazmasında gerçekleşmez. Osteoklastlar, kemik matrisine saldırarak asit, kollajenaz ve proteolitik enzimler salgılarlar. Bu süreçte kalsifiye olmuş temel maddeyi serbest bırakarak, kemik rezorpsiyonu sırasında ortaya çıkan artıkların temizlenmesine katkıda bulunurlar (15).

2.5. Kemik Matriksi

Kemik, %60 inorganik bileşenler ve %40 organik bileşenlerden oluşan bir bağ dokusu türüdür (16). Organik bileşenler arasında kollajen, proteoglikanlar ve matris proteinleri bulunur. Kollajen, kemiklerin esnekliğini ve dayanıklılığını sağlar, özellikle Tip 1 kollajen mineral birikimi için iskele görevi görür. Osteokalsin, kemik metabolizmasında rol oynar ve kemik sağlığının değerlendirilmesinde kullanılır. Paratiroid hormonu ve 1,25-dihidroksivitamin D, osteokalsinin aktivasyonunu düzenleyerek kemik sağlığını etkiler. İnorganik bileşenlerden kalsiyum hidroksiapatit, kemiklerin gücünü ve sertliğini artırır (17).

2.6. Kemik Dolaşımı ve Fizyolojisi

Kemikler, kalp debisinin %5-10'unu alır ve uzun kemikler üç ana kaynaktan beslenir: besleyici arter sistemi, metafiz-epifiz sistemi ve periost sistemi.

Besleyici arterler ana sistemik arterlerden türetilir ve bu arterler, diafiz korteksinde bulunan foramen nutricia aracılığıyla medüller kanalda küçük arterlere dönüşürler. Bu küçük arterler, Diafiz korteksinin büyük bir bölümüne oksijen ve besin maddeleri sağlayan damarlar, Havers sistemi içerisindedir. Havers sistemi, kemiklerin iç yapısında yer alan ve yüksek basınçlı kan akışı sağlayan bir damar sistemidir, bu sayede kemiklerin beslenmesi ve oksijenlenmesi sağlanır.

Metafizyal-epifizyal sistem, eklem çevresindeki vasküler pleksuslardan türetilir ve bu sistem, metafiz ve epifiz bölgelerindeki kemik dokusunun beslenmesini sağlar. Periostal sistem, düşük basınçlı bir yapı olarak, diafiziyal korteksin dış kısmındaki üçte birlik bölümünü besleyen kapillerden oluşur. Olgun kemikte arteriyel akım sentrifugaldir, yani içten dışa doğru akar. Bu durumun sonucu, yüksek basınçlı endosteal sistem ile düşük basınçlı periostal sistemin birleşimidir.Yüksek basınçlı besleyici arterler, kemik içindeki besinleri ve oksijeni sağlar, düşük basınçlı periostal sistem ise kemik yüzeyinin beslenmesini destekler.Tamamen yer değiştirmiş bir kırıkta endosteal (besleyici) sistemin bozulmasıyla basınç gradyanı tersine döner ve periostal sistem ön planda olur.Bu durumda kan akımı sentripetal (dıştan içe doğru) olur.Olgunlaşmamış kemiklerde, arteriyel akımın sentripetal bir yön izlemesinin

nedeni, periostun yoğun vaskülarizasyonu ve bu damarların kemik kan akımındaki ağırlıklı rolüdür.Olgun kemiklerde venöz akım sentripetaldir; kortikal kapillerler venöz sinüzoidlere açılarak boşaltıcı venöz sistem oluştururlar.

Kemiklerin sıvı bileşenlerinin dağılımı %65 ekstravasküler alanda, %12 Haversian sisteminde, %3 kırmızı kan hücrelerinde ve %20 diğer alanlarda bulunur.

Hipoksi (oksijen eksikliği), hiperkapni (karbondioksit fazlalığı) ve sempatektomi (sempatik sinirlerin cerrahi olarak kesilmesi) gibi durumlarda kemik kan akımı artar (18). Kırık iyileşmesinde kan akımı kritik bir rol oynar. Kırık bölgesinde damar hasarı meydana geldiğinde, kemik kan akımında bir azalma görülür. Kemik kan akışı zamanla artış gösterir ve iki hafta içinde zirveye ulaşır. Bu yüksek akış, 3-5 ay boyunca devam eder ve ardından normal seviyelere döner (19). Kemik kan akımının kontrolü, metabolik, humoral ve otonom sistemler tarafından sağlanır. Kemik arteriyel sistemi genellikle vazodilatasyon yerine vazokonstriktif bir potansiyele sahiptir ve kemik içindeki damarlar birçok vazoaktif reseptör içerir (17).

2.7. Kemik Oluşum Tipleri

I. Enkondral Kemik Oluşumu:

Enkondral kemikleşme, embriyonik gelişimden büyümeye kadar iskeletin kıkırdaktan oluşmuş bölgelerinin kemik haline dönüşmesini ifade eder. Bu süreçte osteoprogenitör hücreler kıkırdak matriks üretir ve kondrositlere dönüşür. Kıkırdağın mineralizasyonu ve damarlaşması ile birlikte, hücreler kıkırdağın rezorpsiyonuna başlar. Rezorbe edilen kıkırdağın ortasında medüller boşluk meydana gelir ve bu alanda hematopoetik kemik iliği oluşur. Osteoprogenitör hücreler, kıkırdaksı septumun yüzeyinde kemik matriksi oluşturarak osteoblastlara dönüşür. İmmatür kemik ve kalsifiye kıkırdak, osteoklastlar tarafından parçalanarak ortadan kaldırılır ve bu bölgede matür kemik dokusu oluşturan osteoblastlar yer alır (20).

II. Embriyonik Uzun Kemik Oluşumu:

Mezenşimal model, intrauterin 6. haftada oluşur ve uzun embriyonik kemiklerin gelişimi enkondral kemikleşme yoluyla gerçekleşir. Ortalama 8. haftada,

mezenşimal modelde osteoblastlara dönüşen osteoprogenitör hücreleri ortaya çıkar ve vasküler tomurcuklar görünür. Bu hücreler, primer kemikleşme merkezlerini oluşturur. Kıkırdak modeli, apozisyonel (yüzeyel) ve intersitisyel (içsel) büyüme ile genişler. Kıkırdak taslağının merkez kısmında, kapiller tomurcuklarla gelen miyeloid öncü hücreler tarafından rezorpsiyon gerçekleşir ve kemik iliği oluşur. Sekonder kemikleşme merkezleri kemik uçlarında ortaya çıkar ve bu merkezler epifizyal büyüme bölgelerini oluşturur (21).

Bu süreçte, kemik dokusunun beslenmesini sağlayan dört ana arteriyel kaynak bulunur. Bunlarepifizyal, metafizyal, besleyici ve perikondral arterler.

III. İntramembranöz Kemikleşme:

İntramembranöz kemikleşme, kıkırdak modelinin bulunmadığı bölgelerde kemik oluşumunu ifade eder. Bu süreçte mezenşim hücreleri fibroblastlara dönüşerek kolajen sentezler. Kolajenin fibril yapısı nedeniyle, bu süreç membran şeklinde adlandırılır. Membran içindeki mezenşim hücrelerinden osteoblastlar farklılaşır ve organik matriks sentezine başlar. Bir kısmı, kalsiyum yoğunluğu artmış matris içinde kalıp osteositlere dönüşür. Kemikleşmeye dahil olmayan bağ dokusu kısımları ise periost ve endostu oluşturur (22).

IV. Apozisyonel Kemik Yapımı:

Kemiklerin büyümesi ve onarımı için kritik olan apozisyonel kemik oluşumu, kemiğin genişlemesini ve yeniden yapılandırılmasını içerir. Periost ile çevrili kemiklerde, periost içinde bulunan osteoblastlar tarafından üretilen osteoid tabakaları ile yeni kemik dokusu oluşturulur. Remodeling sürecinde, osteoblastik aktivasyon sayesinde osteoid sentezlenir ve bu da mevcut kemik dokusunun yeniden yapılandırılmasını sağlar (22).

2.8. Kırık İyileşmesi

Kemiğin skar dokusu bırakmadan, orijinal şekil ve fonksiyonuna en yakın şekilde kendini onarma süreci olan kırık iyileşmesi, oldukça karmaşık ve düzenli aşamalardan oluşur. Bu aşamalar, gelişim sırasında büyüme plaklarındaki aşamalarla

paralellik gösterir, ancak kırık iyileşmesi bu süreçlerle sınırlı olup devamlılık göstermez (23). Kırık iyileşmesinin temel olarak iki türü vardır (24):

Primer (Direkt) Kırık İyileşmesi: Bu tür iyileşme, anatomik olarak düzgün bir şekilde redükte edilmiş ve rijid (sert) tespit uygulanmış durumlarda gerçekleşir. Bu tür iyileşme, sekonder iyileşmeye göre daha nadirdir ve doğrudan kemik dokusunun birleşmesi ile karakterizedir.

Sekonder (İndirekt) Kırık İyileşmesi: Doğal olarak, anatomik olmayan kırık düzeltmeleri ve yeterince sağlam olmayan tespitler sonrası gelişir. Bu tür iyileşme, kırık iyileşmesinin önemli bir kısmını oluşturur ve daha karmaşık bir süreç içerir. Genellikle, bu süreç çeşitli dokuların ve iyileşme aşamalarının birleşimiyle meydana gelir.

Kırık iyileşmesi genellikle iç içe geçmiş aşamalar halinde ve belirgin sınırlarla ayrılmadan gerçekleşir. Bu süreç hematom oluşumu, enflamasyon, anjiogenez, yumuşak kallus gelişimi, sert kallus oluşumu ve remodeling aşamalarını içerir (25). İyileşmede dört ana bölge önemli rol oynar: medüller kanal, interkortikal alan, periost ve subperiosteal alan. Sert kallus periost ve çevre yumuşak dokular aracılığıyla intramembranöz kemikleşme ile, medüller kanal ve interkortikal alan ise enkondral kemikleşme için yumuşak kallusu geliştirir (16). Kırık iyileşmesi dört dönemden oluşuyor:

1. Enflamasyon Dönemi (1-4 gün): Bu dönemde ilk yanıt, enflamasyon yani "yangı" olarak tanımlanır. Kırık meydana geldikten sonraki ilk iki gün içinde, çevredeki yaralı periost ve yumuşak dokulardan ve kırık uçlarından kanama ile bir hematom oluşur. Bu süreçte trombotik faktörler pıhtılaşmayı başlatır ve hematom, kırık uçlarını bir arada tutarak iyileşme sürecinde kritik bir rol oynar. Açık kırıklarda ve cerrahi fiksasyonlarda hematom dışarı akabilir, bu da iyileşme sürecini uzatabilir. Hematom, fibrin iskelet oluşturarak onarım hücrelerinin işlevini destekler ve büyüme faktörleri ile matriks sentezini artırır. Bu dönemde, kan damarlarının genişlemesi, ödem oluşumu ve lökositlerin hareketi gözlemlenir. Ayrıca, nekrotik dokular ve prostaglandinler, akut yangının başlamasına katkıda bulunur. Hematom, 48 saat içinde fibrin açısından zenginleşir. Bu süreçte lökositler ve makrofajlar fibrin matriksini

oluşturur. Ayrıca, interlökin-1 gibi proteinler, lenfositlerin göçünü ve kemik rezorpsiyonunu teşvik artırır (17).

2. Onarım (Regenerasyon) Dönemi (5-21 gün): Onarım evresinin ilk aşaması, hematomun organize olmasıdır ve bu dönem, iyileşme sürecinin kritik bir evresidir. Kırık oluşumundan birkaç saat sonra, fibroblastlar, yeni damarlar ve diğer destek hücreleri ortaya çıkar. Bu aşama genellikle 7-12 gün içinde belirginleşir ve osteojenik öncü hücreler osteoblastlara dönüşür. Onarım sürecinde rol oynayan hücreler, granülasyon dokusundan, periosteumun osteojenik katmanından ve nadiren endosteumdan köken alır. Üçüncü günün sonunda, yoğun mezenşimal hücreler kırık uçlarında toplanır ve yumuşak bir granülasyon dokusu oluşur. Bu doku fibrin matris içinde çoğalan fibroblastlarla periosteal ve endosteal osteojenik hücrelerden oluşur (16).

Kollajen sentezleyen fibroblastlar ve kondroblastlar hem kollajen hem de glikozaminoglikan üretirken, osteoblastlar osteoid salgılar. Kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içindeki kollajen miktarıyla ilişkilidir. Kallus boyutu, kırığın hareket derecesine bağlı olarak değişir ve ilk kallus gelişimi 4-12 gün içinde tamamlanır. İlk 16 saat içinde, mezenşimal hücrelerin çoğalması görülür; bu hücreler, trabeküler kemik, kıkırdak hücreleri ve fibroblastlarla birleşir ve çoğalma kırık sonrası 32. saatte zirveye ulaşır. Kırık iyileşmesinin başlangıç aşamalarında periost damarları önemli bir rol oynar; ilerleyen dönemlerde ise besleyici damarlar, kılcal damar tomurcuklanmasını teşvik eder. Kan akışının iyi olduğu bölgelerdeki hücreler osteoblastlara dönüşürken, daha uzak bölgelerde kılcal damarların gelişim hızı yeterince yüksek olmadığından, bu hücreler kondrosit ve kondroblastlara dönüşerek kıkırdak doku oluşturur. Kallus oluşumu ise 7-40 gün arasında tamamlanır.

Onarım sürecinin ilk aşamalarında kıkırdak oluşumu (kıkırdak kallus) gözlemlenir. Kıkırdak kallus damarlandığında, kemik gelişimi süreci başlar. Yeterli kan dolaşımı sağlandığında, osteoblastlar kallus içinde kemik oluşumu için uygun matrisi oluşturur. Periostun iç tabakasında bulunan pluripotent mezenkimal hücreler (PPMH), erken iyileşme aşamasında kemik üretimini başlatır. Bu hücreler, doğrudan osteoblastlara dönüşerek periostal intramembranöz kemikleşmeyi tetikler. Intramembranöz yapı, kırık hattının her iki kenarına yakın olarak ortaya çıkar ve kallus

merkezine doğru ilerler. Bu sürecin sonunda oluşan yapı, sert kallus olarak adlandırılır. Intramembranöz kemikleşme, kırık sonrası 8-16 gün içinde periost altında belirginleşir (26). Kırık iyileşmesinin ikinci haftasının ortalarına yaklaşıldığında, kırık bölgesini kıkırdak doku sarmaya başlar ve bu aşamada kalsifikasyon için biyokimyasal hazırlıklar yapılır. Oluşan kallus, kıkırdak kallus (yumuşak kallus) olarak adlandırılır ve kırık kemik uçları, iç ve dış kallus gelişimi sayesinde sağlamlaşır. Kallus oluşumu ve mineralizasyon süreci genellikle 4 ila 16 hafta sürer; çocuklarda kallus gelişimi daha hızlıdır ve trabeküler kemikte daha çabuk tamamlanır. Onarım evresinin ortalarına doğru, gereksiz kallus dokusu geri emilir ve remodelleme süreci başlar (27).

3. Yeniden Şekillenme (Remodeling) Dönemi (20-100 gün): Bu süreç onarım evresinin ortalarına yaklaştıkça başlar ve kırık klinik olarak iyileştikten sonra uzun yıllar devam edebilir. Bu aşamada, hem osteoblastik hem de osteoklastik aktivitelerle yeni kemik oluşumu gerçekleşir ve mevcut kemiğin trabeküler yapısı yeniden düzenlenir (27).

Bu dönemde başlıca dört ana olay gözlemlenir: a. Kalsifiye kıkırdak, osteoid doku ile değişir ve birincil trabeküler dokuya dönüşür. b. Oluşan dokunun yerini lameller kemik alır. c. Kompakt kemikteki kallus, lameller kemikten oluşan ikincil osteonlara dönüşür. d. İlik kanalı yeniden yapılandırılır ve kallus rezorbe edilerek boşluklar düzenlenir. Genel olarak, iyi remodele olmuş bölgeler, fizise yakın ve metafizer alanlarda açılanmalar gösterir. Remodelasyon kapasitesi yaşla ters orantılıdır ve eklemlere yakın veya eklemin hareket yönüne ters kırıklarda iyileşme daha güç olabilir (24).

2.9. Kırık İyileşmesinde Etkili Faktörler

I. Kırık iyileşmesinde biyokimyasal faktörler (28)

- BMP: Mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara dönüşümünü ve kemik oluşumunu destekler.
- TGF-β: Matris oluşumu, damarlaşma ve kalsifikasyonu düzenler; kıkırdak ve kemik oluşumunu kontrol eder.

- PDGF: Kırık bölgesine hücrelerin gelmesini sağlar.
- FGF: Mezenkimal kök hücre çoğalmasını, kıkırdak oluşumunu ve damarlanmayı etkiler.
- VEGF: Damarlanmayı ve osteoblast çoğalmasını uyarır.
- IGF: Kollajen üretimini, damarlanmayı ve hücre çoğalmasını teşvik eder

II. Kırık İyileşmesinde Hormonal Faktörler

Kırık iyileşmesinde etkili olan hormonal faktörler arasında paratiroid hormonu, tiroid hormonu, D vitamini, büyüme hormonu, kalsitonin, kortikosteroidler, östrojen.

III. Kırık İyileşmesini Etkileyen Hasta ile İlgili Faktörler

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler arasında şunlar bulunur: yaş, sigara ve alkol kullanımı, kontrolsüz diyabet, yetersiz beslenme ve protein eksikliği, kas kütlesinin azalması, osteoporoz, D vitamini ve kalsiyum düzeyleri, genetik varyasyonlar, menopoz sonrası kadın olma durumu ve ek sağlık sorunları (29).

IV. Kırık İyileşmesini Etkileyen Kırık ile İlgili Faktörler

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler şunlardır: travmanın şiddeti, yüksek dereceli açık kırıklar, kompleks veya parçalı kırıklar, büyük boşluklar, biyomekanik dengesizlik, enfeksiyon riski, uzun süreli hareketsizlik, geniş kırık hematomu, NSAID kullanımı, kırık uçlarının hizalanması, bölgesel kan akışı ve eklem içi kırıklar (29).

V. Kırık iyileşmesini Olumlu Etkileyen Faktörler (28,30)

- Elektrik akımı, Manyetik alan, Ultrasonografi
- Hiperbarik Oksijen Tedavisi
- Anabolik Steroidler
- D-Vitamini, Kalsitonin, PTH, Büyüme hormonu
- Prostoglandinler, BMP, Büyüme faktörleri

- Kemik greftleri

VI. Kırık iyileşmesini Olumsuz Etkileyen Faktörler (28)

- Besleyici damarların hasar görmesi
- Kırık uçlarının birbirinden ayrılması, araya yumuşak doku girmesi
- Yüksek enerjili travmalar ve geniş yumuşak doku hasarı
- Aşırı disseksiyon
- Enfeksyon
- Yetersiz tespit
- Açık kırık olması (hematomun boşalması, kontaminasyon, aşırı yumuşak doku hasarı nedeniyle)
- İleri yaş
- Kemoterapi, Radyoterapi, Sigara (nikotin) bağımlılığı, kortikosteroid, alkolizm
- Eklem içi kırık olması (sinovyal sıvının kırık iyileşmesini bozucu etkisi)
- Kemikte önceden var olan patolojik durum varlığı
- İlaçlar (NSAİD, Biofosfonatlar, Aminoglikozidler, Florokinolonlar…)
- Beslenme ve sağlıklı metabolizmayı etkileyen her türlü sistemik hastalık (diyabet, malignite, sistemik enfeksiyon, anemi…)

2.10. Kırık İyileşmesinin Biyomekaniği

Stabilite ile kırık iyileşmesi arasında bir denge bulunmaktadır. Stabilite, kırık bölgesindeki gerinimi belirlerken, gerinim iyileşme tipini etkiler. İki tür stabilite vardır:

Göreceli stabilite: Kırık bölgesinin az miktarda hareketine izin verir ve kallus dokusuyla iyileşme sağlanır.

Mutlak stabilite: Kırık bölgesinin neredeyse hiç hareket etmesine izin vermez ve doğrudan kemik iyileşmesini sağlar; kallus oluşumu gözlemlenmez.

Gerinim oranına göre iyileşme tipleri şu şekildedir: %2'den az gerinimde primer kemik iyileşmesi gerçekleşir ve endosteal iyileşme ile kemik kaynar. %2-%10 gerinimde sekonder kemik iyileşmesi görülür ve enkondral ossifikasyon ile kemik kaynar. %10'un üzerinde gerinim: kemik oluşumunu engeller. Gerinim, kırık aralığı mesafesindeki değişimin bu mesafeye bölünmesi olarak tanımlanır. En yüksek kırık gerinimi, tam olarak redükte edilmemiş ve arada boşluk bulunan basit kırıklarda görülür (31–33).

2.11. Kırık İyileşmesini Artırmak İçin Uygulanan Yöntemler (29,34)

I. Biyofiziksel stimulasyon elektromanyetik alan uyarımı (PEMFs)

- Düşük yoğunluklu darbeli ultrason uyarımı (LIPUS)

II. Yerel olarak uygulanan biyolojik iyileştirme faktörleri

- Osteojenik materyaller
- Otolog kemik iliği
- Osteokondüktif materyaller: kalsiyum fosfatlar, kalsiyum hidroksiapetitler, kalsiyum sülfatlar, kalsiyum fosfat/kollajen kompozitleri, allojenik kemik

III. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri

IV. Fibroblast büyüme faktörleri

V. Osteoindüktif ve morfogenetik faktörler, kemik morfogenetik proteinleri

VI. Sistemik biyolojik iyileştirme faktörleri, paratiroid hormonu

2.12. Çözünür Guanilat Siklaz Aktivatörü: Vericiguat (Verquvo)

Kronik kalp yetmezliği olan hastalar için standart tedavi seçenekleri arasında anjiyotensin reseptör-neprilisin inhibitörleri (ARNI), anjiyotensin reseptör blokerleri, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI), β-blokerler, mineralokortikoid reseptör antagonistleri (MRA) ve sodyum-glikoz kotransporter 2 (SGLT2) inhibitörleri bulunmaktadır (35). Son zamanlarda, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) uyarıcıları kalp yetmezliği tedavisinde yeni bir seçenek olarak öne çıkmıştır. Vericiguat gibi ağız yoluyla alınan sGC (çözünür guanilat siklaz) uyarıcılarının, kalp yetmezliği olan hastalarda iyi tolere edildiği ve yaşam kalitesini artırdığı gösterilmiştir (36).

2.12.1. Vericiguat'ın Farmakodinamik Mekanizması

Kalp yetmezliği olan hastalarda nitrik oksit (NO) reseptörü olarak işlev gören çözünebilir guanilat siklaz (sGC) enziminin aktivitesi genellikle azalır. Bu durum, NO'in sGC'a bağlanmasının miyokardiyal ve vasküler disfonksiyona katkıda bulunmasına neden olur (37,38). NO-sGC-cGMP yolu miyokardiyak tonus, kasılma ve yeniden şekillenme üzerindeki etkileriyle tanınan bir sinyal yoludur. sGC'ın aktivasyonu, hücre içindeki siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeylerini artırır (37,38). NO-sGC-cGMP yolu endokardiyal ve vasküler endotelde önemli roller oynar; endokardiyal endotelde kardiyak tonus ve kasılmayı, vasküler endotelde ise düz kas tonusunu ve vazodilatasyonu etkiler (7).

Kalp yetmezliği olan hastalarda, NO-sGC-cGMP yolu bozulur. Azalmış NO ve sGC'ın değişmiş etkisi, cGMP sentezinin azalmasına yol açar. Vericiguat, sGC'ı doğrudan (NO'ten bağımsız olarak ve ona sinerjik olarak) uyararak NO-sGC-cGMP yolunu hedef alır. Bu mekanizma kalp yetmezliği olan hastalarda mevcut miyokardiyal

ve vasküler disfonksiyonu düzeltir, örneğin ventriküler hipertrofiyi azaltır. Ayrıca sol ve sağ ventrikülerde art yükü azaltır (7,37). Bu nedenle vericiguat'ın etki mekanizması kronik kalp yetmezliği için mevcut diğer tedavi seçeneklerinden farklıdır, ancak onları tamamlıyor (38).

2.12.2. NO-cGMP Sinyal Yolu ve Kemik Metabolizması

NO-cGMP sinyal yolu, kemik metabolizmasında ve remodelingde önemli bir rol oynar (39–41). İn vitro çalışmalar bu yolun hem osteoblastlar hem de osteoklastlar üzerindeki etkilerini ortaya koymuşlar (42,43). Her iki hücre tipi de endotel, nöronal ve indüklenebilir izoformlar dahil olmak üzere bir veya daha fazla nitrik oksit sentaz (NOS) formunu ifade eder ve NO üretir (40,41). NO'in osteoklastlar ve osteoblastlar üzerindeki etkisi değişken olup bifazik bir şekilde tanımlanmıştır (40). Düşük NO konsantrasyonları, cGMP aracılığıyla osteoblast proliferasyonunu uyarırken, yüksek konsantrasyonlar proliferasyonu inhibe eder ve apoptozu tetikler (44). Düşük NO konsantrasyonları fare kemik iliğinde osteoklastların farklılaşmasını ve aktivitesini inhibe ederken, olgun osteoklastların aktivitesini inhibe etmek için çok daha yüksek konsantrasyonlar gerekmektedir (45). Bununla birlikte, düşük NO konsantrasyonları interlökin 1 (IL-1) ve prostaglandin kaynaklı kemik rezorpsiyonunu artırabilir (46). NO'in çeşitli konsantrasyonları, cGMP'ye bağlı protein kinaz I ve vazodilatörle uyarılan fosfoprotein yoluyla osteoklastların kemik matrisine hareketliliğini, bağlanmasını ve ayrılmasını düzenler (43). Bu hücresel etkiler çoğunlukla sistem-spesifik humoral faktörler ve sitokinlerin eklendiği kültür sistemlerinde veya organotipik analizlerde incelenmiştir. Bu durum, sGC aktivasyonunun kemik üzerinde in vivo farmakolojik etkilerinin olup olmadığı sorusunu gündeme getirmiştir.

NO, sGC'ın birincil aktivatörü olup, cGMP düzeylerinde artışa neden olur (47). Bu nedenle, NO'in veya bir sGC agonistinin etkileri, in vivo sGC uyarımı veya aktivasyonu yoluyla kemik üzerindeki etkilerin gerçekleşmesi mümkündür. NO-cGMP yolunun farmakolojik medyatörleri tarafından osteoklastik kemik rezorpsiyonu ve osteoblastik kemik oluşumu arasındaki homeostatik denge korunabilir (40,48).

Yumurtalıkları alınmış sıçan modelinde, bir NO donörü olan 0,2 mg nitrogliserin günde bir kez uygulanması oluşan spinal kemik mineral yoğunluğu

(BMD) kaybını önlemiştir. Ancak aynı dozda nitrogliserin günde iki veya üç kez uygulandığında kemik kaybı önlenmemiştir (49). NO sentazın seçici inhibitörü aminoguanidin uygulaması, placebo cerrahi müdahale yapılan sıçanlarda spinal BMD'yi azaltmış ve yumurtalıkları alınmış sıçanlarda spinal BMD kaybını artırmıştır (50).

2.12.3. Farklı Çalışmalarda Çözünebilir Guanilat Siklaz (sGC) Agonistlerinin Kemik Fonksiyonel Etkileri

Homer ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) agonistlerinin oral yolla uygulanmasının sıçanlarda kemik metabolizması üzerindeki etkilerini incelenmiştir (51). Araştırma sonucunda, sGC agonistlerinin osteoklastik kemik rezorpsiyonunu artırdığı, kemik yeniden şekillenmesini (remodeling) teşvik ettiği ve hem aksiyal hem de appendiküler iskelet bölgelerinde yeni kemik oluşumu gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu bulgular, sGC yolunun kemik döngüsü üzerinde etkili olduğunu ve hem kemik yıkımı hem de yeni kemik oluşumunu uyarmada rol oynadığını göstermektedir.

Joshua ve ark. tarafından yapılan çalışmada, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) aktivasyonunun osteoporoz tedavisindeki potansiyel rolü incelenmiştir (3). Bu araştırma, sGC'ın aktivasyonunun kemik yoğunluğunu artırabileceğini ve osteoporozun ilerlemesini yavaşlatabileceğini göstermektedir. Çalışmada, sGC agonistlerinin kemik oluşumunu teşvik ettiği, osteoblast aktivitesini artırdığı ve osteoklast aktivitesini düzenlediği bulunmuştur. Sonuç olarak, sGC aktivasyonunun osteoporoz tedavisinde yeni bir hedef olabileceği öne sürülmüştür ve bu mekanizmanın klinik olarak araştırılması gerektiği vurgulanmıştır.

Başka bir çözünebilir guanilat siklaz (sGC) aktivatörü olan Riociguat ile yapılan FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) farmakoloji toksikoloji incelemeleri, riociguatın kemik yıkımını artırdığı ve eş zamanlı olarak yeni kemik oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir (52). Bu incelemeler sGC'a bağlı bileşiklerin kemik üzerinde doğrudan etkili olduğuna dair daha fazla destek sağlamıştır.

Sun ve ark. tarfından yapılan çalışmada, Vericiguat'ın osteoklast farklılaşması ve kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır (5). Çalışma, Vericiguat'ın bu etkilerinin VASP ve NF-κB sinyal yolları arasındaki denge aracılığıyla modüle edildiğini öne sürmektedir. Vericiguat'ın düşük konsantrasyonlarda osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonunu artırdığı, yüksek konsantrasyonlarda ise bu süreci baskıladığı tespit edilmiştir. Düşük dozlarda, VASP/IκB-α/NF-κB sinyal yolunun aktivasyonu osteoklast oluşumunu teşvik ederken, yüksek dozlarda IκB-α/NF-κB sinyal yolunun inhibisyonu bu etkiyi tersine çevirmekte ve osteoklastogenez baskılanmaktadır. Çalışma, Vericiguat'ın osteoklastlar üzerindeki bu doz bağımlı etkilerinin mekanizmasını daha iyi anlamak için ileri araştırmalar yapılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Tao ve Shen tarafından yapılan çalışmalarda, vericiguat'ın osteojenik aktivitesini incelemişlerdir (53). Vericiguat, β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) içine eklenmiş ve hem in vitro hem de in vivo ortamda test edilmiştir. Sonuçlar, vericiguat'ın β-TCP ile kombine edildiğinde osteoblastlar farklılaşmasını ve mineralizasyonunu artırdığını göstermişlerdir**.** In vivo deneylerde, vericiguat içeren β-TCP'ın osseointegrasyonu arttırdığı ve kemik oluşumunu hızlandırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bu etkinin doz bağımlı olduğu tespit edilmiştir; 5 mg/kg osteojenik aktiviteyi arttırmıştır. Çalışma, vericiguat'ın kemik iyileşmesini destekleyici etkilerini vurgulamakta ve klinik uygulamalarda kullanım potansiyelini araştırmayı önermektedir.

Tao ve Shen tarafından yapılan başka bir çalışmalarında, guanilat siklaz aktivasyonunun**,** demir yüklenmesi olan yaşlı sıçanlarda osseointegrasyonu nasıl teşvik ettiğini araştırmışlardır (54). Çalışma, guanilat siklazın aktivasyonunun, oksidatif stres ve enflamasyonu baskılayarak kemik implantlarıyla osseointegrasyonu iyileştirdiğini göstermiştir. Araştırmada yaşlı sıçanlara demir yüklenmesi ile osteoporoz benzeri bir durum oluşturulmuş ve guanilat siklaz aktivatörleri uygulanmıştır. Sonuçlar, guanilat siklazın oksidatif stresi ve enflamatuar yanıtları azaltarak kemik implantlarının kemikle osseointegrasyonu önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuşlardır. Bu bulgular, yaşa bağlı kemik iyileşme bozuklukları ve demir

yüklenmesi durumunda guanilat siklazın potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak Vericiguat, sGC'ı doğrudan uyararak kalp yetmezliği tedavisinde faydalar sağlarken, kemik sağlığı üzerinde de etkili olabilir. NO-sGC-cGMP yolunun kemik metabolizmasındaki rolü ve Vericiguat'ın bu yola olan etkileri, kemik sağlığı üzerindeki potansiyel etkilerini belirlemekte kritik bir rol oynar. Vericiguat'ın kırık kaynama ve sağlıklı kemik üzerindeki etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

"Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na" (HADYEK) başvuruda bulunduktan sonra, 25.05.2023 tarihli ve 2023/6 sayılı oturumda başvuru formu ve ek belgeler, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak değerlendirildi. Sonuç olarak 92 no'lu karar ile söz konusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiştir.

Bu deneysel çalışma "Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı" ile "Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi" (ATADEM) işbirliğiyle gerçekleştirilmiştir.

3.1. Denekler

Deneysel çalışma Erzurum Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05.05.2023 tarihli ve E-42190979-000-2300144669 sayılı izni ile yapıldı. Çalışmada 60 adet Wistar-Albino dişi ratlar kullanılmıştır. Ratların ortalama yaşı 2,8 ay (2,7-2,9 ay) ve ortalama ağırlıkları 200 gram (150-280 gram) olarak belirlenmiştir. Hayvanlar rastgele kontrol (vericiguat verilmeyen) ve deney (vericiguat verilen), grupları olmak üzere 6 gruba ayrılmış ve her grupta 10'şer rat olmak üzere çalışmanın tamamı boyunca izlenmiştir. Ratlar, radyolojik çalışmalarda ayırt edilmesi için farklı renk kına ile boyanmıştır (55), Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Ratlar, 22°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünde tutulmuş ve standart rat yemi ile beslenmiştir; su kısıtlaması yapılmamıştır. Çalışma süresince, ratların yarısında sağ femurlarına özel tasarlanmış pense ile kapalı kırık oluşturulmuştur. Peroperatif antibiyotik profilaksisi uygulanmamış ve operasyon süresince hiçbir rat ölmemiştir. Postoperatif dönemde yara yeri enfeksiyonu gözlemlenmemiştir.

Grupların dağılımı ve uygulamalar şu şekildedir:

- Grup 1: 10 rat (sağlıklı grubu)
- Grup 2: 10 rat, kırık var + K tel (kontrol grubu)
- Grup 3: 10 rat, kırık yok+ Vericiguat 3 mg/kg/gün
- Grup 4: 10 rat, kırık yok+ Vericiguat 6 mg/kg/gün
- Grup 5: 10 rat, kırık var + K tel + Vericiguat 3 mg/kg/gün

- Grup 6: 10 rat, kırık var+ K tel + Vericiguat 6 mg/kg/gün

Uygulamalar:

Ratların ağırlığına uygun beslenme suya karıştırarak oral gavajla verşlmiştir.

- Üç ve beş numaralı gruplara, ameliyat gününden itibaren Vericiguat 3 mg/kg/gün miktarında oral gavajla uygulandı.
- Dört ve altı numaralı gruplara, Vericiguat 6 mg/kg/gün miktarında oral gavajla uygulandı.
- Bir ve iki numaralı gruplara herhangi bir ilaç verilmedi.

Kırık Oluşumu:

- Bir, üç ve dört numaralı gruplarda kırık oluşturulmadı.

- İki, beş ve altı numaralı gruplarda kemik kırığı oluşturulup, K teli kullanıldı.

Çalışma Süreci:

- Radyolojik değerlendirme 1., 2. ve 4.'cü haftalarda yapıldı.
- Biyomekanik ve histolojik değerlendirmeler 4.'cü haftada gerçekleştirildi.
- Dördüncü haftada, tüm ratlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.
- Ratlar öldürüldükten sonra sağ femurlar diz eklemlerinden ayrıldı, yumuşak dokular kallus dokusuna zarar vermeden nazikçe temizlendi.
- Femurlar biyomekanik, radyografik ve histopatolojik olarak incelendi.

3.2. Çalışma Grupları

Tablo 3.1. Deney Gruplarının Tanıtımı

Grup	Grup İsimleri	İşlemler	Sacrifiye zamanı	Grup Rat Sayıları
1	Negatif Kontrol (NK)	Sağlıklı	4 hafta	10
2	Pozitif Kontrol (PK)	Kırık + K teli	4hafta	10
3	Düşük Vericiguat (3mg/kg/gün) Negatif (DVN)	Vericiguat 3mg/kg/gün	4hafta	10
4	Yüksek Vericiguat (6mg/kg/gün) Negatif (YVN)	Vericiguat 6mg/kg/gün	4hafta	10
5	Düşük Vericiguat (3mg/kg/gün) Pozitif (DVP)	Kırık +K teli+ Vericiguat 3mg/kg/gün	4hafta	10
6	Yüksek vericiguat (6mg/kg/gün) Pozitif (YVP)	Kırık + K teli +Vericiguat 6mg/kg/gün	4hafta	10



Şekil 3.1. Grupların Kendi İçinde Adlandırılması

3.3. Cerrahi Prosedür

Ameliyathaneye alınan ratların öncelikle hazırlıkları yapıldıktan sonra elektronik tartı ile ağırlıkları ölçülmüş ve anestezik ilaç dozları hesaplanmıştır. Anestezi, Ketamin (Keta-Control, Doğa İlaç, Türkiye) 52 mg/kg ve Xylazine (Control, Doğa İlaç, Türkiye) 8 mg/kg kombinasyonu ile uygulanmıştır. Sağ diz bölgeleri traş edildikten sonra povidon iyodür (Batticon, ADEKA, Türkiye) ile dezenfekte edilmiştir (56).



Şekil 3.2. Isıtıcı ve Ped Kumandası

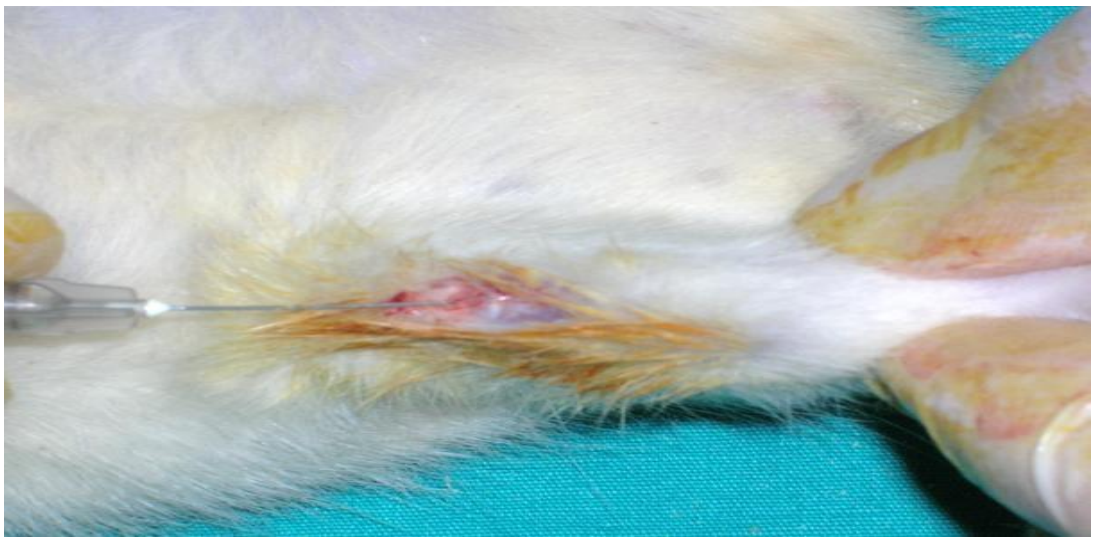


Şekil 3.3. Steril Cerrahi Masası ve Aletleri.



Şekil 3.4. İnsizyon Şekli ve Femur Kondillerinin Ortaya Konması

Sağ dizin anterior bölgesinden yaklaşık 1 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldı. Cilt ve ciltaltı dokular geçildikten sonra femur kondilleri açığa çıkarıldı (Şekil 3.4). Femurda intramedüller giriş deliği hazırlandı (Şekil 3.5). Sonra kirshner teli yerleştirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Femurda İntramedüller Giriş Deliğinin Hazırlanması



Şekil 3.6. Kirshner Telin Yerleştirilmesi



Şekil 3.7. Kendi Tasarımımız Olan Pense İle Kapalı Kırık Oluşturulması

Femur cisminde ‘’üç nokta’’ bükme prensibine uygun olarak bir kırık oluşturulduktan sonar (Şekil 3.7), Kirschner telinin ucu kesildi.



Şekil 3.8. K-Tel Ucunun Cildi Rahatsız Etmeyecek Şekilde Kesilmesi

Pens yardımıyla cilde zarar vermeden kemiğe doğru gömüldü (Şekil 3.8).

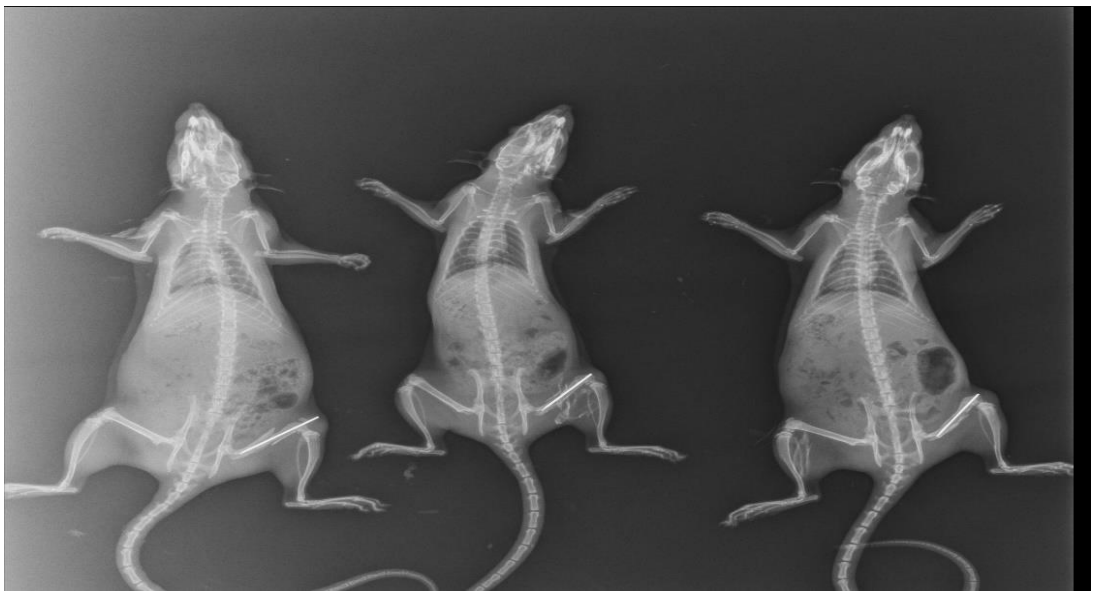


Şekil 3.9. İnsizyon Sahasının Dikilmesi

4.0 ipek ile açılan insizyon yeri kapatıldı (Şekil 3.9). Klinik muayeneden sonra, kırık radyolojik olarak direk radyografilerle doğrulandı (Şekil 3.11).



Şekil 3.10. Röntgen Cihazının Ayarlanması



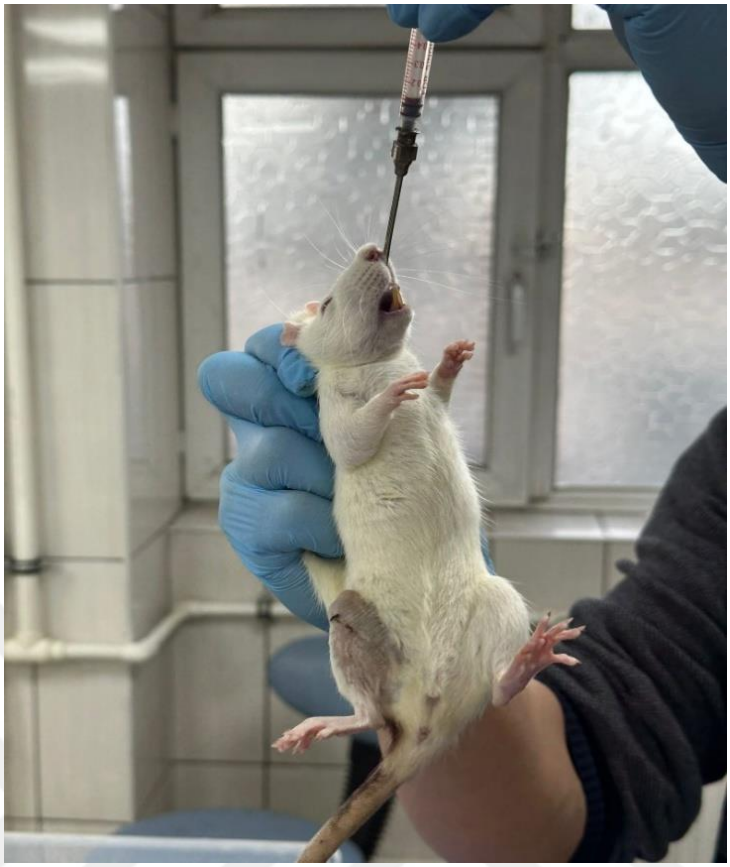
Şekil 3.11. Kırık Oluşumunun Radyolojik Olarak Doğrulanması

Operasyon sonrası, anteroposterior (AP) radyografilerde, K-telin hem proksimal hem de distal kırık fragmanlarında intramedüller pozisyonda olduğu görüldü (Şekil 3.11).

Cerrahi işlem sonrasında, ratlar tamamen uyanana kadar ısıtıcı pedler üzerinde gözlem altında tutuldu. Ameliyattan sonraki ilk 24 saat boyunca, cerrahi işlem görmüş ratların kafeslerine pelet yem dağıtıldı. İlk günde tüm ratlar iki ayakları üzerinde durabiliyor, çevreye karşı normal ilgi gösteriyor ve genel sağlık durumları iyiydi. Kendi bakımlarını ve beslenmelerini sorunsuz bir şekilde sürdürebiliyorlardı. Ameliyat sonrası 28 günlük gözlem süresince, ratlar 20 +/- 1 derece sıcaklıkta, %50 +/- 5 nem oranında, özel standart kafeslerde tutuldu. Sağlık durumları düzenli olarak takip edildi ve laboratuvar ortamında 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü sağlandı. Ratların her zaman standart pelet yem ve taze içme suyuna erişimleri sağlandı. İlk 24 saat içinde yara yerleri kontrol edildi ve herhangi bir akıntı tespit edilmedi.

3.4 İlaç Uygulaması

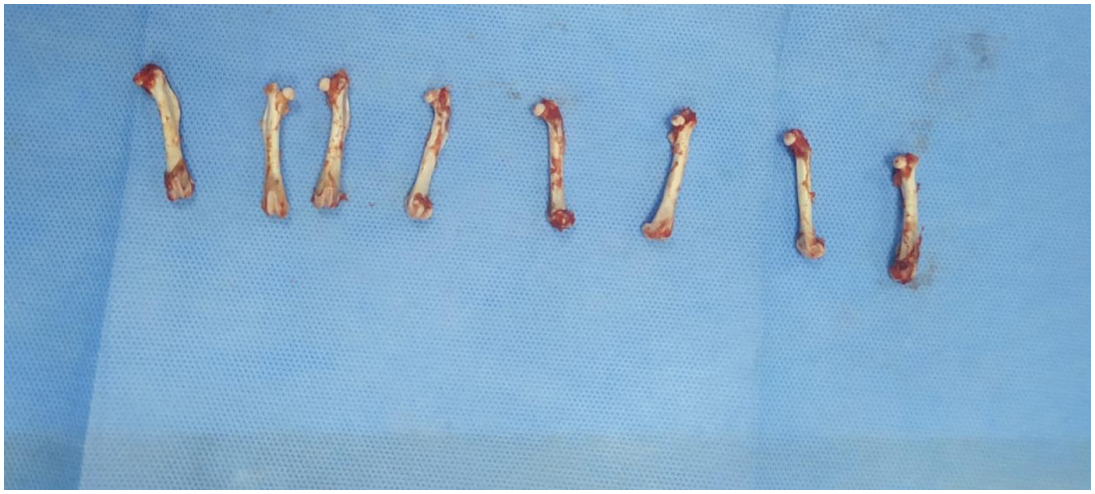
Ameliyat gününden itibaren ratların ağırlığına uygun olarak beslenme suya karıştırarak oral gavajla 3. ve 4. gruplara vericiguat 3 mg/kg/gün, 5. ve 6. gruplara ise 6 mg/kg/gün miktarında uygulandı (Şekil 3.12). Birinci ve ikinci gruplara ilaç verilmedi, 1., 3. ve 4. gruplarda kemik kırığı oluşturulmadı.



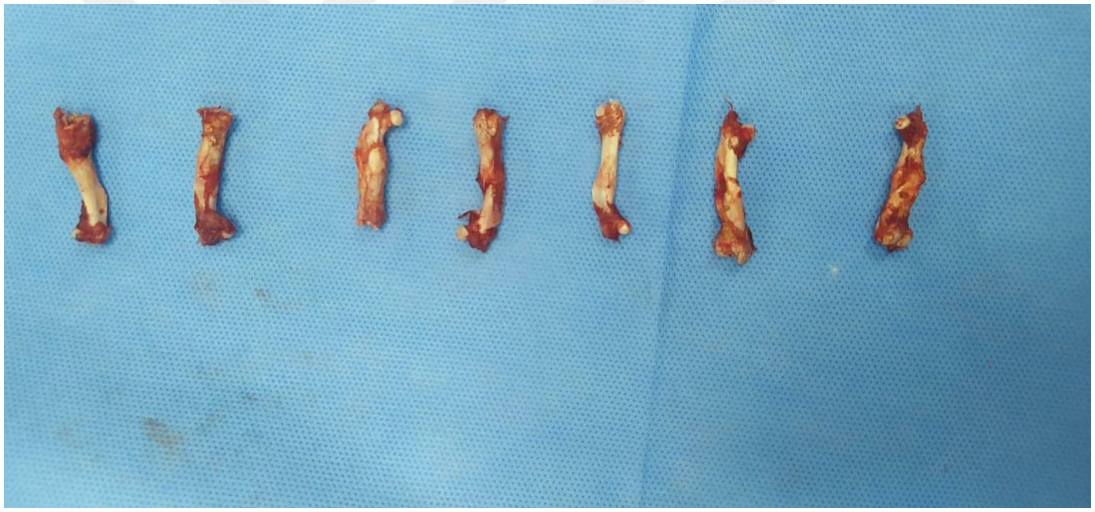
Şekil 3.12. İlacın Oral Gavajla Uygulaması

3.5. Deneylerin Sonlandırılması

Dördüncü hafta sonunda radyolojik inceleme yapıldıktan sonra servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilen deney ve kontrol gruplarındaki ratların çalışmaları sonlandırıldı. Daha sonra, ratların bacakları diz seviyesinden ampute edildi, kas ve yumuşak dokular dikkatlice temizlendi (Şekil 3.13, Şekil 3.14). Her gruptan beş femur biyomekanik test için ayırt edildi. Diğer beş femur da %5'lik formol solüsyonunda koruma altına alındı, sonra histoloji'ye teslim edildi.



Şekil 3.13. Kontrol Grubu (Kemik Kırığı Olmayan) Ratların Femurlarının Örnekleri



Şekil 3.14. Deney Grubu (Kemik Kırığı Olan) Ratların Femurlarının Örnekleri

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

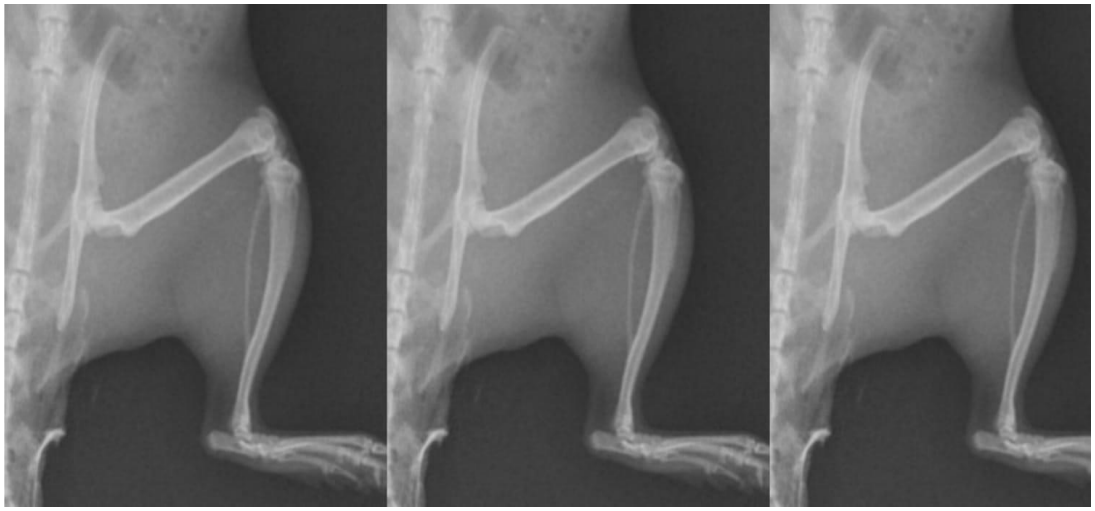
3.6.1. Radyografik İnceleme

Radyolojik değerlendirme sevofluran (inhaler) sedasyon anestezi altında 7., 14. ve 28. günlerde radyografik olarak görüntülendi. Radyolojik işlem "Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi" acil servisinde yapıldı. Röntgen cihazı (meX-100 vet-versiyon), tüm çekimler sırasında 85 cm uzaklıktan ışınlanacak şekilde ayarlandı (Şekil 3.15). Radyolojik görüntüler, gruplar belirtilmeden üç

ortopedi ve travmatoloji doktorlar tarafından (AD, AN ve UK) incelendi (55). Değerlendirmeler Lane-Sandhu önerdiği kriterlerine göre gerçekleştirildi (57,58).



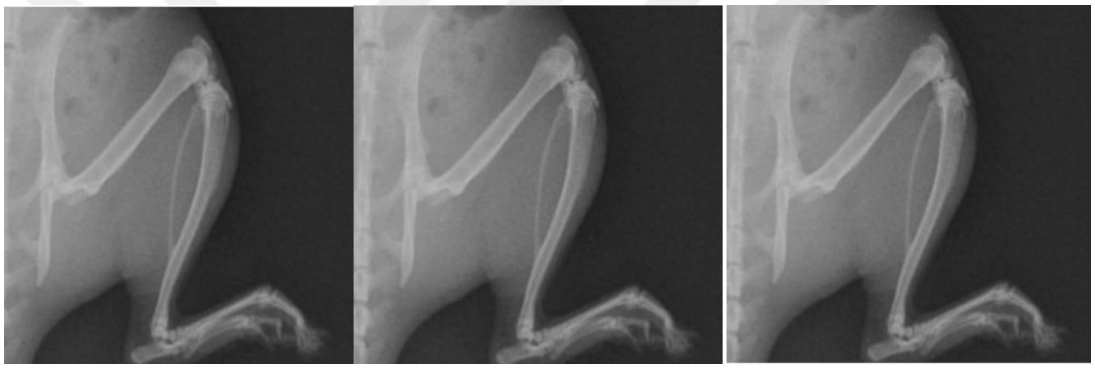
Şekil 3.15. Ratlara Direk Röntgenografi Çekimi



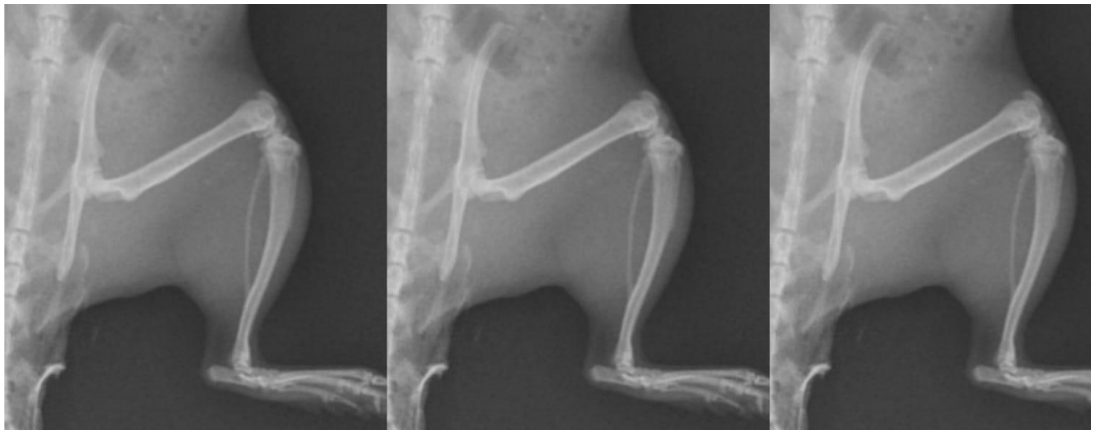
Şekil 3.16. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 1'in Ratların Görüntüsü



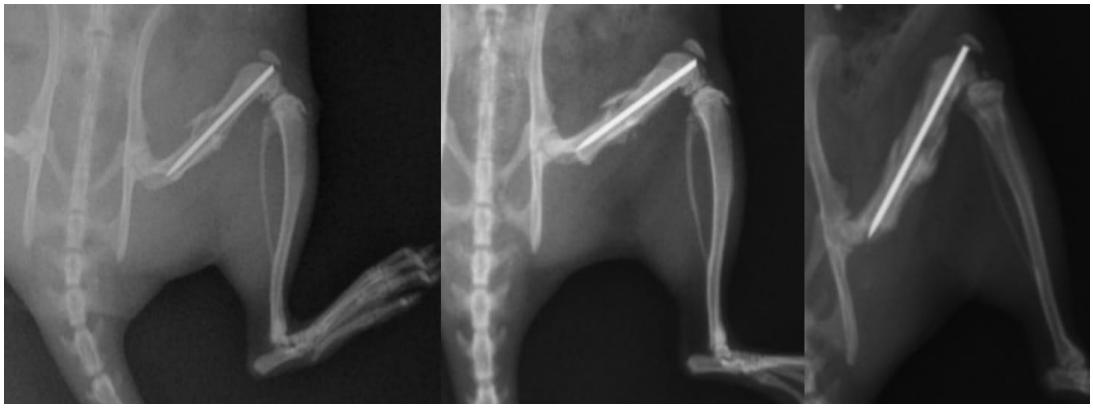
Şekil 3.17. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 2’ in Ratların Görüntüsü



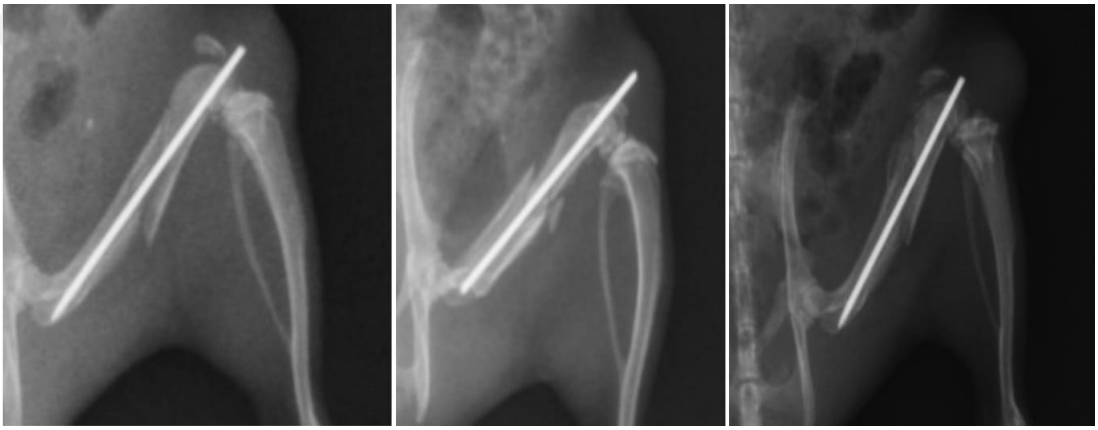
Şekil 3.18. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 3’ün Ratların Görüntüsü



Şekil 3.19. 7., 14 ve 28. Günlük Grup 4’ ün Ratların Görüntüsü



Şekil 3.20. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 5'in Ratların Görüntüsü



Şekil 3.21. 7., 14. ve 28. Günlük Grup 6'ın Ratların Görüntüsü

Tablo 3.2. Lane ve Sandhu'nun Radyografik Skorlaması

0	Kallus yok.
1	Kallus formasyonu var.
2	Kemiksel kaynama başlangıcı
3	Kırık hattının görülmemesi
4	Tam kemiksel kaynamanın görülmesi

Bu sınıflandırmaya göre kallus oluşumu ve kemik kaynamasını aşamalı olarak değerlendirildik.

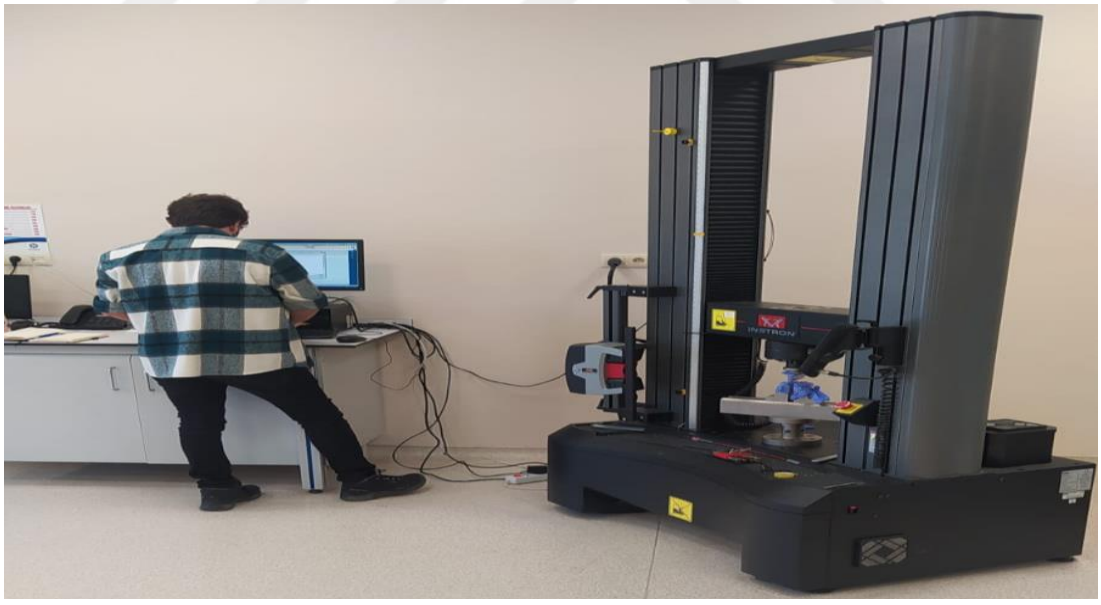
3.6.2. Biyomekanik İnceleme

Biyomekanik değerlendirme YÜTAM'da ("Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi") gerçekleştirildi. Dördüncü hafta sonunda ratlar sakrifiye edildikten sonra her gruptan 5 femur, formol ile sabitlenmeden yumuşak dokulardan temizlendi ve intramedüller teller çıkarıldı. Sonra biyomekanik incelemeye alındı. Testler "İNSTRON 5982" cihazı kullanılarak yapıldı (Şekil 3.22).

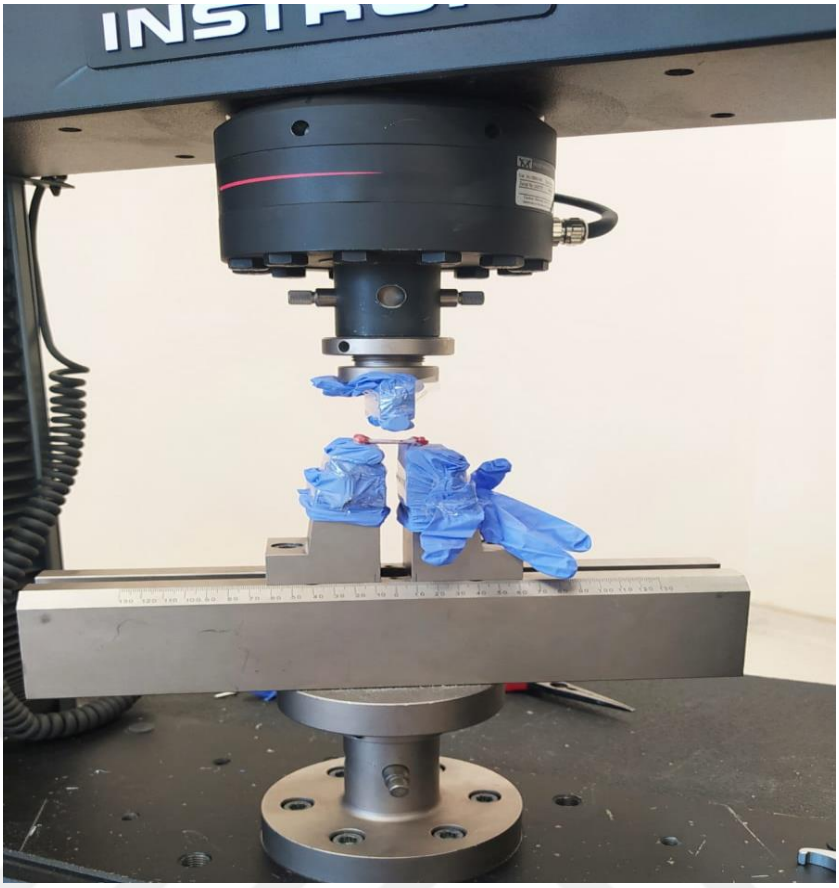
Test yöntemi: femurlar ''üç nokta'' bükme testi için cihaz üzerine yerleştirildi. Kuvvet uygulama hızı saniyede 10 mm olarak ayarlandı. Destek noktaları arası uzaklık 18 mm olarak belirlendi, Şekil 3.23'te gösterilmiştir (59).

Veri toplaması: newton cinsinden ölçülen kuvvetler, maksimum yük dayanımı ve kırılma anındaki maksimum gerilme olarak raporlandı (60,61).

Sertlik hesaplaması: yük-deformasyon grafiğinin doğrusal bölgesinin eğiminden sertlik (N/mm) hesaplandı (62,63).



Şekil 3.22. Biyomekanik Test İçin Cihaz "İNSTRON 5982"



Şekil 3.23. İNSTRON Cihazının Kırma Aparatı

3.6.3. Histopatolojik İnceleme

Histolojik inceleme için beş femur alındı. Yumuşak dokulardan temizlendi ve intramedüller teller çıkarıldı. Bu örnekler, %10 nötral formaldehit içinde iki gün fikse edilip, ardından %10 formik asitte bekletildi. Dokular rutin hazırlık işlemlerinin ardından parafin bloklara alınarak, 5 mm kalınlığında Leica Rotary mikrotom ile kesildi ve HE (Hematoksilen-Eozin) ile boyandı. Doku mikrografları, dijital fotoğraf makinesine bağlı binoküler mikroskop yardımıyla bir patoloji uzmanı tarafından değerlendirildi (Şekil 4.9-4.14).

Fibröz doku, kıkırdak, yeni kemik ve olgun kemik oranlarına göre tüm preparatlar, Huo ve arkadaşlarının önerdiği skalayı (Tablo 3.3) kullanılarak değerlendirilmiştir (60).

Tablo 3.3. Huo ve Arkadaşlarının Histolojik Skalası

Grade	Kırık bölgesi histolojik bulguları
1	Fibröz doku
2	Ağırlıklı fibröz doku, az miktarda kıkırdak
3	Eşit oranda fibröz ve kıkırdak doku
4	Ağırlıklı kıkırdak, az miktarda fibröz doku
5	Kıkırdak doku
6	Ağırlıklı kıkırdak, az miktarda immatür kemik
7	Eşit oranda kıkırdak ve immatür kemik doku
8	Ağırlıklı immatür kemik, az miktarda kıkırdak doku
9	İmmatür kemik ile kırık iyileşmesi
10	Matür kemik ile kırık iyileşmesi

3.6.4. İstatiksel Analiz

Radyolojik, biyomekanik ve histopatolojik verilerin analizleri IBM SPSS 20 istatistik analiz programı ile gerçekleştirildi. Veriler ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum, yüzde ve sayı gibi istatistiksel ölçütler kullanılarak özetlendi. Sürekli değişkenlerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi, Kolmogorov-Smirnov testi, Q-Q plot**,** skewness **ve** kurtosis analizleri ile değerlendirildi. Normal dağılım şartı sağlandığında, ikiden fazla bağımsız grup arasında kıyaslamalar için ANOVA testi kullanıldı. Normal dağılım sağlanmadığında ise Kruskal-Wallis testi tercih edildi. ANOVA testi sonrası grup farkları için post-hoc test olarak, varyanslar homojen olduğunda Tukey testi, varyanslar homojen olmadığında ise Tamhane's T2 testi uygulandı. Kruskal-Wallis sonrası post-hoc analizler, Kruskal-Wallis 1-way ANOVA (k samples**)** testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Deney protokolü süresince yapılan klinik gözlemler sonucunda, anestezi ve oral ilaç uygulamasına bağlı herhangi bir komplikasyon izlenmedi. Postoperatif dönemde, hayvanlarda 4-5 gün boyunca topallama gözlendi, bu sürenin ardından sıçanlar sağ alt ekstremitelerini normal şekilde kullanmaya başladılar. Cerrahi bölgede enfeksiyon belirtisine rastlanmadı. Çalışma süresince hiçbir sıçan ölmedi.

4.2. Radyolojik Bulgular

Değerlendirilmede 7. günlük kontrol ve deney gruplarında kallus oluşumu görülmedi.

14. günlük PK grubunda: 4 denekte kallus formasyon başlangıcı görülürken diğer 6 denekte kemiksel kaynama başlangıcı görüldü. DVP grubunda: 5 denekte kallus formasyon başlangıcı görüldü, 4 denekte kemiksel kaynama başlangıcı görüldü ve 1 denekte kırık hattı görülmedi. YVP grubunda: 4 denekte kallus formasyon başlangıcı görüldü, 3 denekte kemiksel kaynama başlangıcı görüldü ve 3 denekte kırık hattı görülmedi.

28. günlük PK grubunda: 3 denekte kırık hattı görülmedi, 8 denekte tam kemiksel kaynaması görüldü. DVP grubun radyolojik bulguları YVP gruba benzerdi.

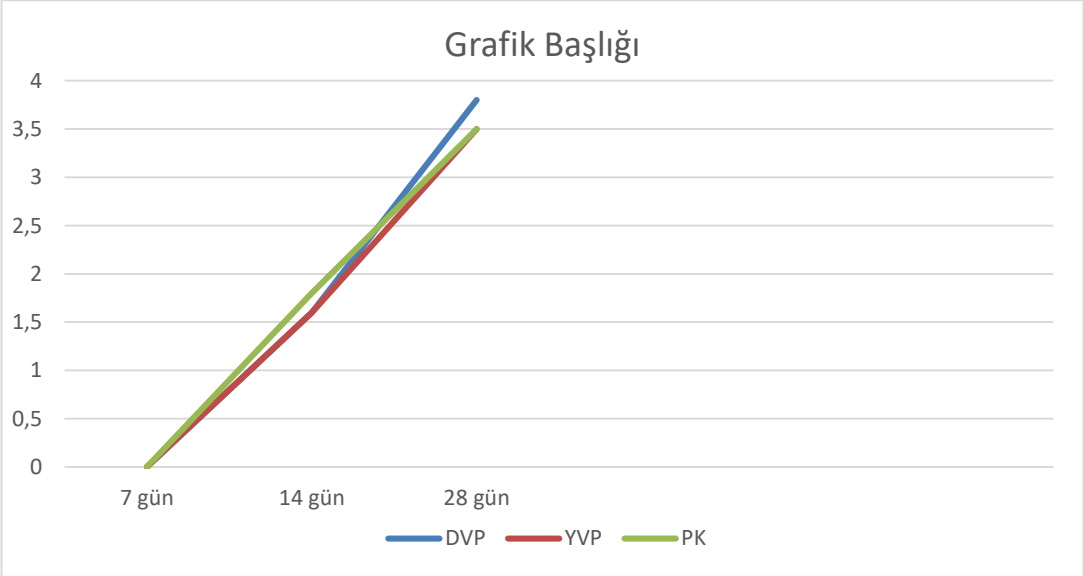
Kemik kırığı oluşturulmayan (NK, DVN, YVN) gruplarında direk grafilerinde 7., 14. ve 28. günlerde bir değişiklik görülmedi. Görüntüler sağlıklı kemik dokusu ile uyumludur.

İstatistiksel analiz sonucunda 14. ve 28. günlük gruplar arasında kallus oluşumu ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,811$). Benzer şekilde 28. günlük de gruplar arasında kallus oluşumu ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,299$).

Tablo 4.1. Kırık Oluşturulan Grupların Kaynama Ölçümlerinin Karşılaştırılması

	GRUP	N	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	x2	p	post-hoc
	PK	10	0	0	0	0	0			
1 hafta	DVP	10	0	0	0	0	0			
	YVP	10	0	0	0	0	0			
	PK	10	1,6	2	0,516	1	2			
2 hafta	DVP	10	1,6	1,5	0,699	1	3	0,42	0,811	
	YVP	10	1,8	2	0,789	1	3			
	PK	10	3,8	4	0,422	3	4			
4 hafta	DVP	10	3,5	3,5	0,527	3	4	2,417	0,299	
	YVP	10	3,5	3,5	0,527	3	4			

Friedman

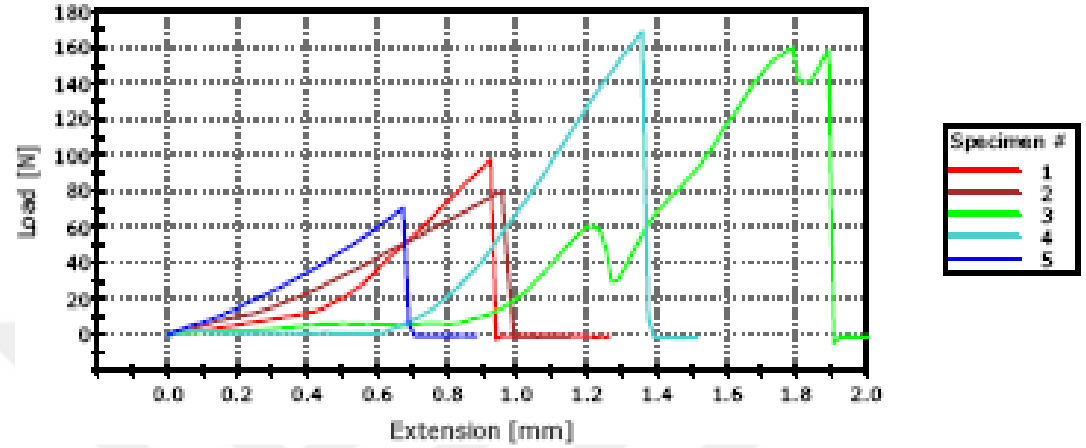


Şekil 4.1. Kırık Oluşturulan Grupların 7., 14. ve 28. Günlük Radyografik Değerlerinin Çizgi Grafisi

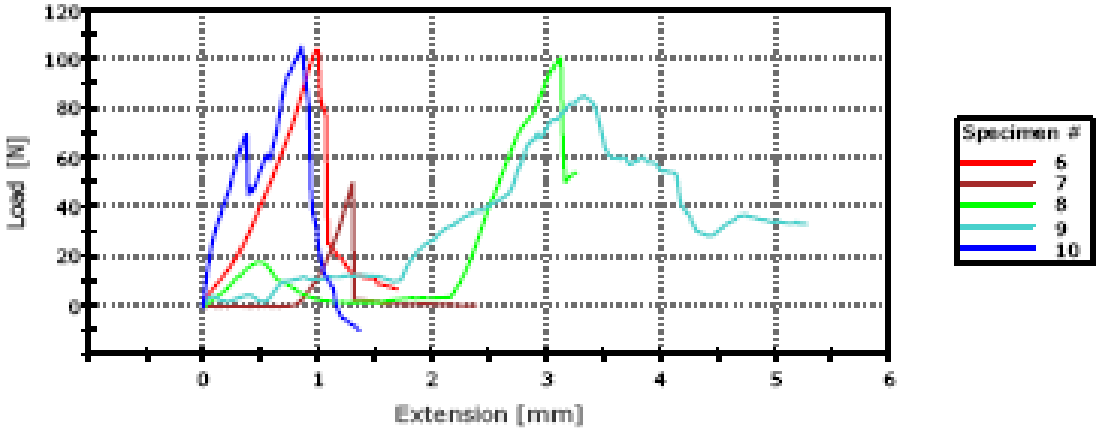
4.3. Biyomekanik Bulgular

Biyomekanik test sonuçları ile karşılaştırmak için ilk olarak sağlıklı (kırık oluşturulmamış, NK) femurlara 3 noktadan eğme testi uygulanmıştır. Test sonucunda elde edilen örnek yük/deformasyon grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Grafikten maksimum yük dayanımı, kırılma anındaki maximum gerilme noktaları ve grafiğin kırılmadan önce doğrusal arttığı bölgenin eğiminden sertlik değerleri hesaplanmıştır.

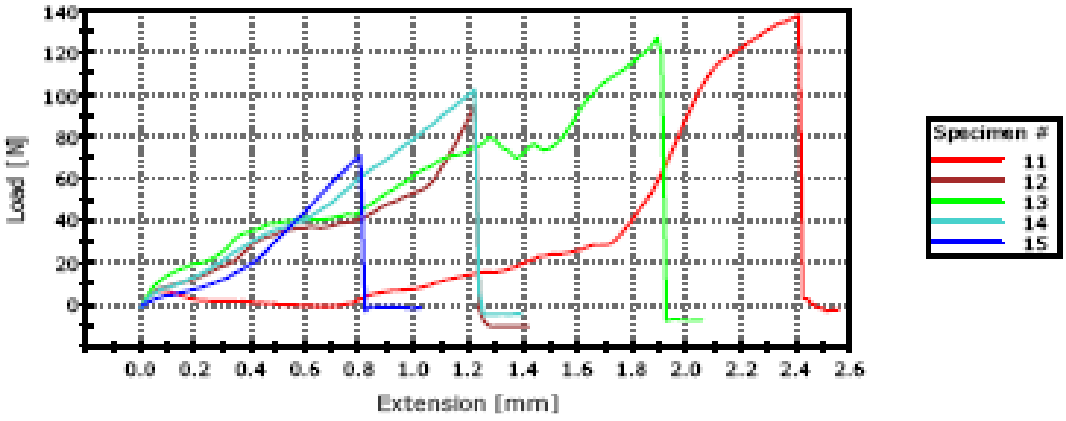
Denekler şu şekilde numaralandırıldı: 1-5 NK (Şekil 4.2), 6-10 PK (Şekil 4.3), 11-15 DVN (Şekil 4.4), 16-20 YVN (Şekil 4.5), 21-25 DVP (Şekil 4.6), 26-30 YVP (Şekil 4.7). Tüm gruplardaki kallus dokularının bükülmeye karşı dirençleri ölçülüp bilgisayara kayıt edildikten sonra istatiksel analiz yapıldı.



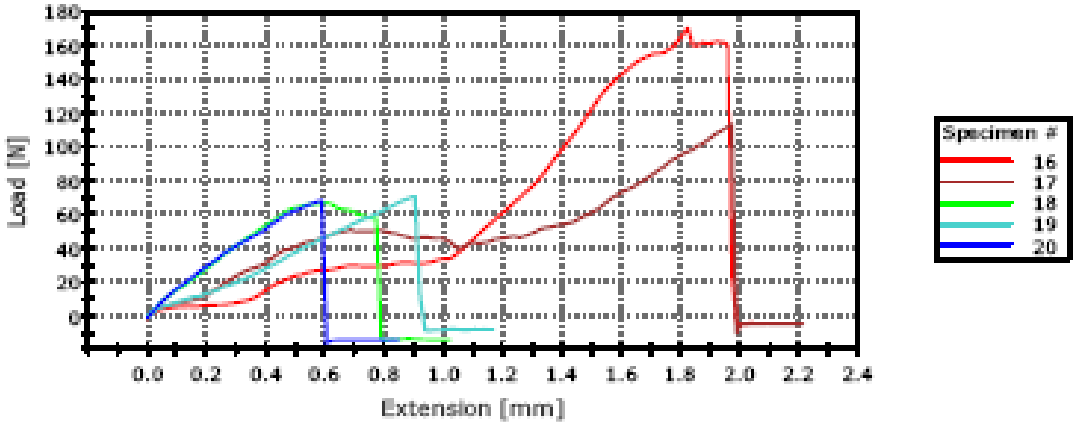
Şekil 4.2. 28. Günlük NK Grubunun Biyomekanik İncelemesi



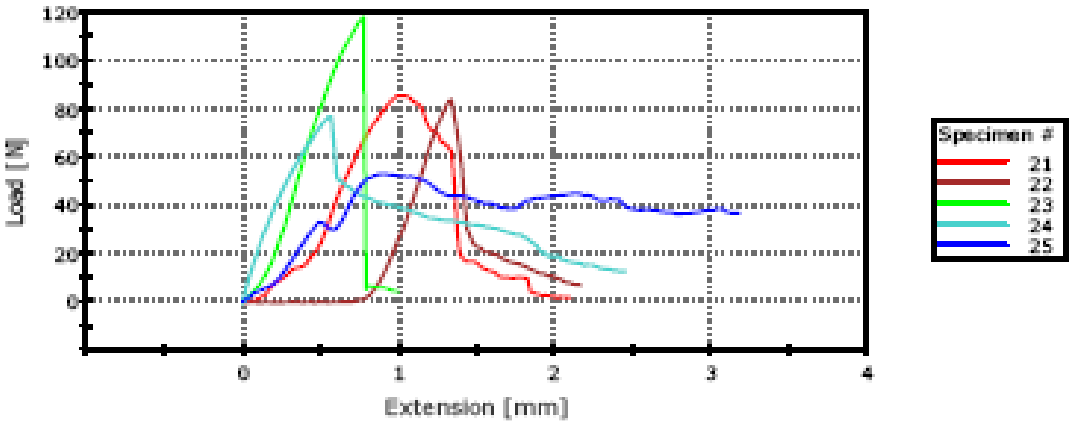
Şekil 4.3. 28.Günlük PK Grubunun Biyomekanik İncelemesi



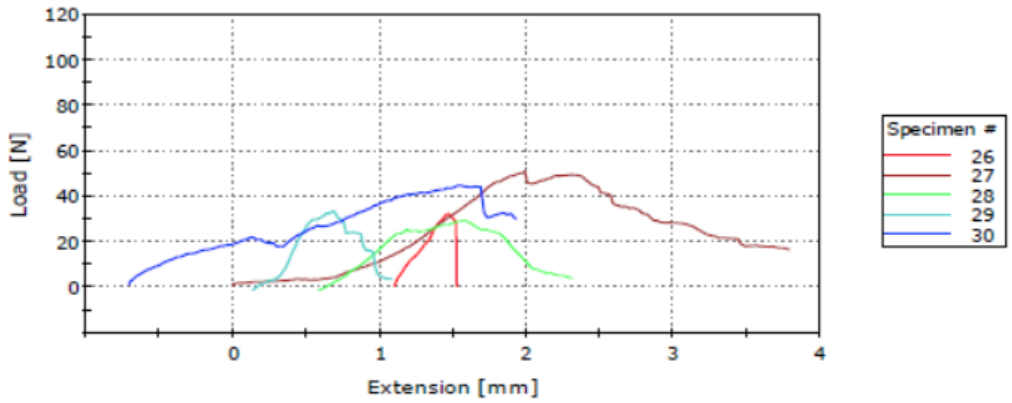
Şekil 4.4. 28.Günlük DVN Grubunun Biyomekanik İncelemesi



Şekil 4.5. 28.Günlük YVN Grubunun Biyomekanik İncelemesi



Şekil 4.6. 28.Günlük DVP Grubunun Biyomekanik İncelemesi



Şekil 4.7. 28. Günlük YVP Grubunun Biyomekanik İncelemesi

Tablo 4.2. 28. Günlük Tüm Grupların Biyomekanik Değerleri

Grup	Rat	Yük (N)	Deformasyon (mm)	Sertlik (N/mm)
	1	97,795	0,921	106,1835
	2	80,229	0,955	84,00942
NK	3	159,489	1,786	89,29955
	4	168,586	1,354	124,5096
	5	70,523	0,672	104,9449
	1	103,814	0,988	105,0749
	2	49,699	1,306	38,05436
PK	3	100,403	3,121	32,17014
	4	84,948	3,322	25,57134
	5	104,879	0,855	122,6655
	1	137,797	2,405	57,29605
	2	95,4	1,222	78,06874
DVN	3	127,24	1,888	67,39407
	4	102,501	1,22	84,01721
	5	71,433	0,804	88,84701

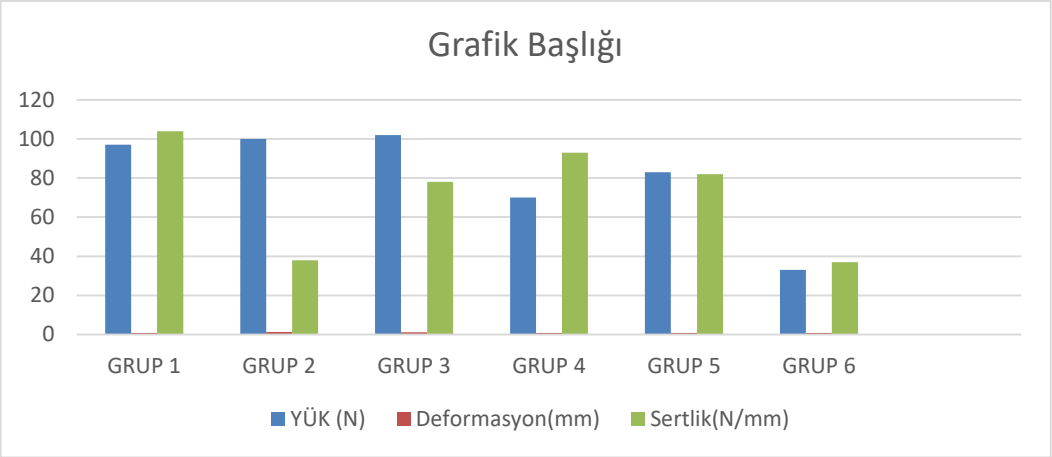
Tablo 4.2. (Devamı)

Grup	Rat	Yük (N)	Deformasyon (mm)	Sertlik (N/mm)
YVN	1	170,186	1,821	93,45744
	2	113,69	1,97	57,71066
	3	66,999	0,604	110,9255
	4	70,801	0,903	78,40642
	5	68,59	0,587	116,8484
DVP	1	85,55	1,037	82,49759
	2	83,857	1,336	62,76722
	3	117,956	0,772	152,7927
	4	76,992	0,554	138,9747
	5	53,352	0,905	58,95249
YVP	1	33,894	0,904	37,49336
	2	53,973	1,988	27,1494
	3	30,73	0,586	52,44027
	4	45,865	0,689	66,56749
	5	30,903	1,653	18,6951

Tablo 4.3. 28. Günlük Tüm Grupların Yük ve Sertlik Değerlerininin Karşılaştırılması

				Yük (N)							
				Mean	**Standard Deviation**	**Median**	**Minimum**	**Maximum**	**F**	**p**	**post-hoc**
Kırık	**yok**	**Grup**	**NK**	115,324	45,644	97,795	70,523	168,586	0,234	0,795	
			DVN	106,874	26,353	102,501	71,433	137,797			
			YVN	98,053	44,785	70,801	66,999	170,186			
	var	**Grup**	**PK**	88,749	23,25	100,403	49,699	104,879	9,442	0,003	gr2-gr6, gr5-gr6
			DVP	83,541	23,145	83,857	53,352	117,956			
			YVP	39,073	10,384	33,894	30,73	53,973			

				Sertlik (N/mm)							
				Mean	**Standard Deviation**	**Median**	**Minimum**	**Maximum**	**F**	**p**	**post-hoc**
Kırık	**yok**	**Grup**	**NK**	101,789403	15,9498974	104,94494	84,0094241	124,509601			
			DVN	75,1246171	12,7834808	78,0687398	57,2960499	88,8470149	2,706	0,107	
			YVN	91,4696804	24,1706362	93,457441	57,7106599	116,848382			
	var	**Grup**	**PK**	64,7072481	45,5229742	38,0543645	25,5713426	122,665497			
			DVP	99,1969533	43,8189233	82,4975892	58,9524862	152,792746	2,994	0,088	
			YVP	40,4691242	19,2666259	37,4933628	18,6950998	66,5674891			



Şekil 4.8. Tüm Grupların 28. Günlük Biyomekanik Verileri.

Kırık oluşturulmayan grupların (NK, DVN ve YVPN) yük (N) ortalamarı arasında karşılaştırmada bir fark bulunmamıştır (p=0,795).

Kırık oluşturulmayan grupların (NK, DVN ve YVN) sertlik (N/mm) ortalamarı arasında karşılaştırmada bir fark bulunmamıştır (p=0,107).

Kırık oluşturulan grupların (PK, DVP ve YVP) sertlik (N/mm) ortalamarı arasında karşılaştırmada bir fark bulunmamıştır (p=0,088).

Kırık oluşturulan grupların (PK, DVP ve YVP) yük (N) ortalamarı arasında karşılaştırmada bir fark bulunmuştur (p=0,003). Ayrıca bu fark PK ve YVP gruplar arasında, aynı şekilde DVP ve YVP gruplar arasında da bulunmuştur.

4.4. Histopatolojik Bulgular

Kemik kırığı oluşturulan grupların (PK, DVP, YVP) kırık iyileşmesi Huo ve arkadaşlarının önerdiği skalasını kullanılarak puanlandırıldı (Tablo 4.3). Sonra bütün grupların denekleri kallus dokusunda inflamasiyon ve nekroz infiltrasyon açısından 0 ila 3 puan arası histopatoloji uzman tarafından değerlendirildi. 0-yok, 1-hafif, 2-orta, 3-şiddetli (Tablo 4.4 ve 4.5).

Tablo 4.4. Kırık Oluşturulan Grupların 28. Günlük Histopatolojik Değerlendirmesi

Rat sayısı	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
PK	3	2	2	3	3
DVP	9	10	8	7	9
YVP	2	2	3	8	7

- PK grupta, çoğunlukla fibröz ve kıkırdak doku seviyesinde (Grade 2-3) iyileşme göstermiştir. Bu, kemik iyileşmesinin erken aşamalarında kaldığını ve kallus dokusunda henüz tam kemikleşmenin oluşmadığını göstermektedir.

- DVP grupta ise, büyük oranda immatür ve matür kemik doku (Grade 7-10) içermektedir. Bu grup, diğer gruplara kıyasla iyileşme sürecinin ileri aşamasına geçmiş, kallus oluşumu kemikleşmeye başlamıştır. Özellikle Grade 9-10 seviyelerinde matür kemik ile iyileşmenin başladığı görülmektedir.

- YVP grupta ise iyileşme geniş bir aralıkta değişkenlik göstermektedir. Bazı ratlarda hala fibröz ve kıkırdak doku (Grade 2-3) varken, diğerlerinde immatür kemik (Grade 7-8) tespit edilmiştir. Bu durum, yüksek doz vericiguatın bazı bireylerde iyileşmeyi olumlu etkilerken, bazı ratlarda iyileşme sürecinin geride kalabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.5. Tüm Grupların 28. Günük Nekrozun Histolojik Değerlendirmesi

Ratsayısı	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
NK	0	0	0	0	0
PK	0	0	0	0	0
DVN	0	0	0	0	0
YVN	0	0	0	0	0
DVP	0	0	0	0	0
YVP	1	1	0	1	3

NK, PK, DVN, YVN ve DVP gruplarında: tüm sıçanlarda nekroz infiltrasyon gözlemlenmemiştir (skor 0). Bu gruplardaki dokularda nekroz infiltrasyonun hiç olmadığı görülmektedir.

YVP grubunda: beş sıçandan dördünde nekroz infiltrasyonu gözlemlenmiştir. Bunlardan birinde hiç yok (skor 0), üçünde hafif (skor 1), birinde şiddetli (skor 3) nekroz infiltrasyonu göstermektedir.

Tablo 4.6. Tüm Grupların 28. Günlük İnflamasyonun Histolojik Değerlendirmesi

Rat sayısı	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
NK	0	0	0	0	0
PK	2	1	0	0	0
DVN	0	0	0	0	0
YVN	0	0	2	2	0
DVP	0	1	0	1	1
YVP	3	3	1	3	3

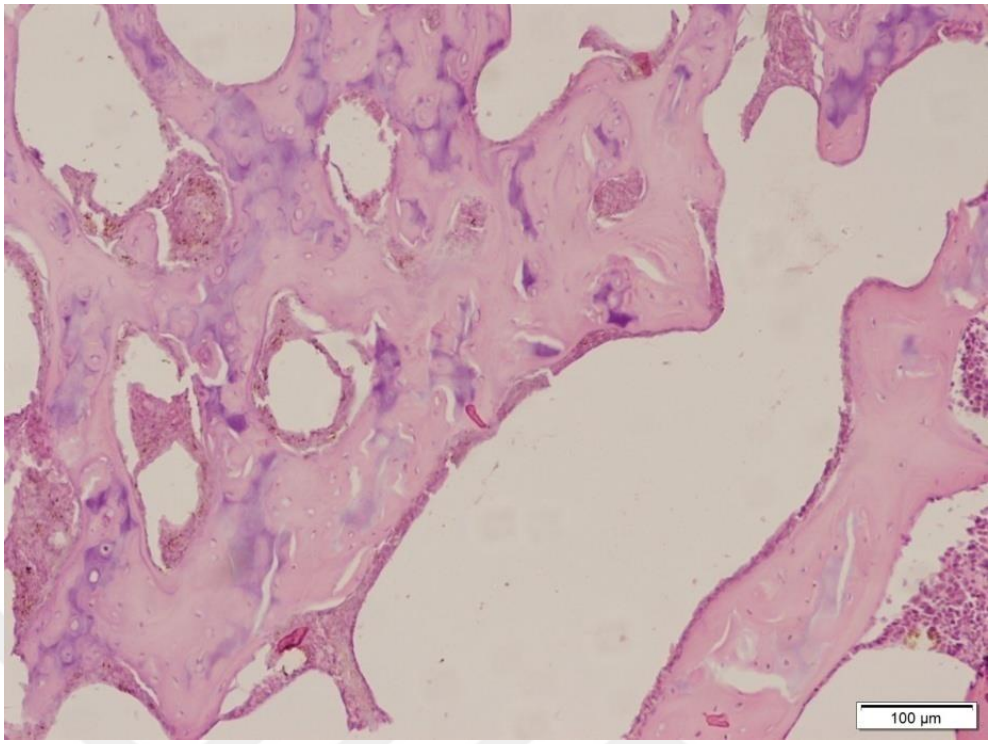
NK ve DVN gruplarında: inflamasyon gözlemlenmemiştir (skor 0).

PK grubunda: bir sıçanda orta (skor 2) ve bir sıçanda hafif (skor 1) inflamasyon gözlemlenmiştir. Diğerlerinde hiç yok (skor 0).

YVN drubunda: iki sıçanda orta (skor 2) inflamasyon gözlemlenmiştir.

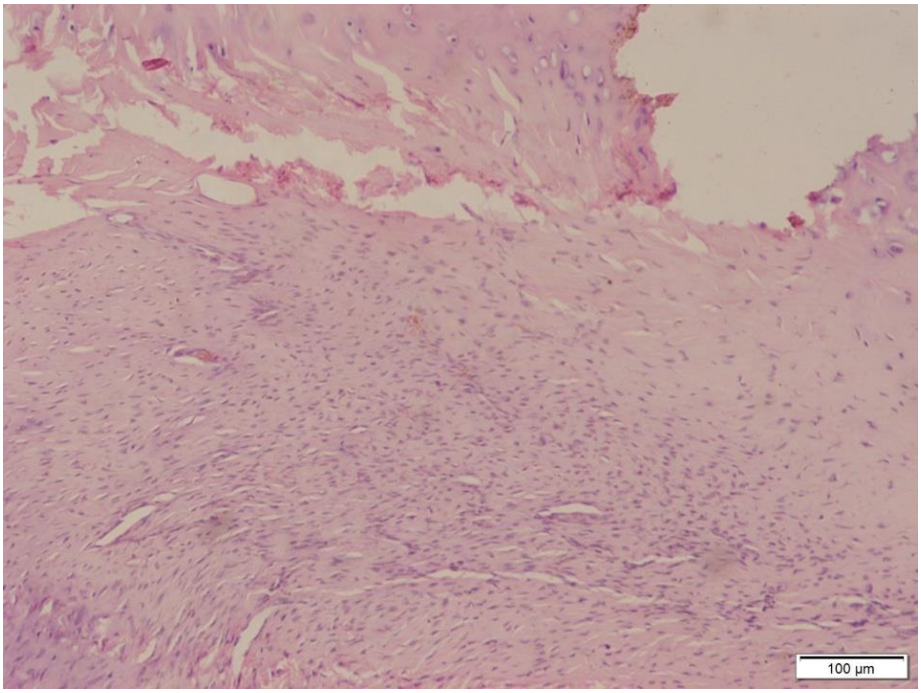
DVP grubunda: üç sıçanda hafif (skor 1) inflamasyon gözlemlenmiştir.

YVP grubunda: inflamasyonun çoğunlukla şiddetli (skor 3) olduğu gözlemlenmiştir. Bir sıçanda hafif (skor 1), dördünde şiddetli (skor 3) inflamasyon gözlemlenmiştir.



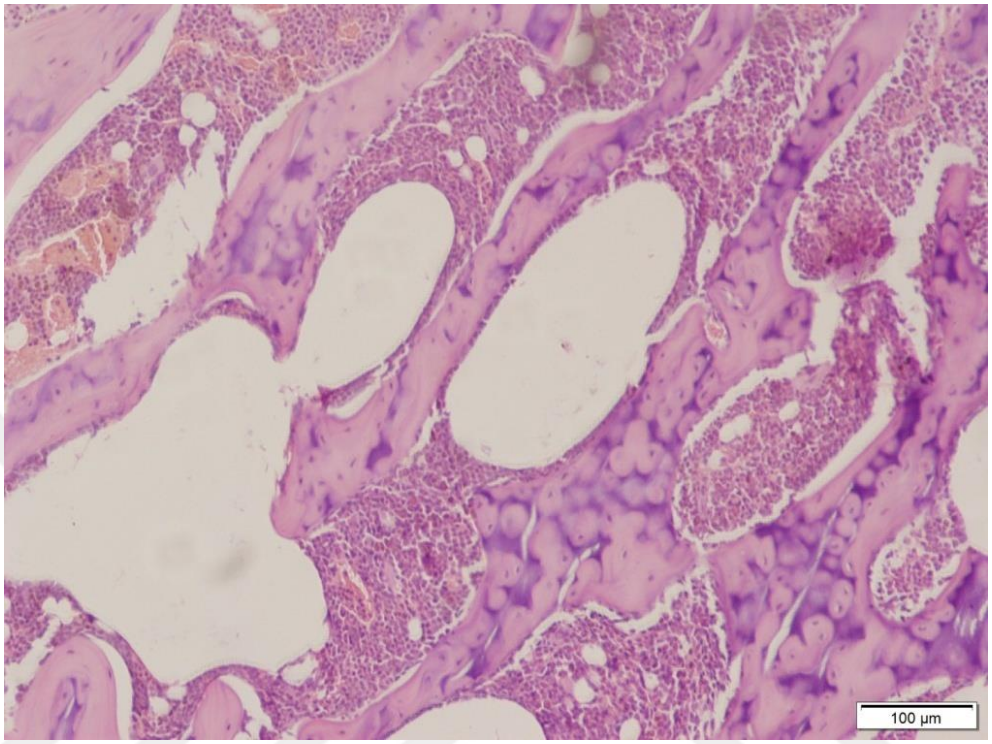
Şekil 4.9. 28. Günlük NK Grubunun Doku Örneği

NK grubunda: alınan örneklerde kemik dokuları normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.9).



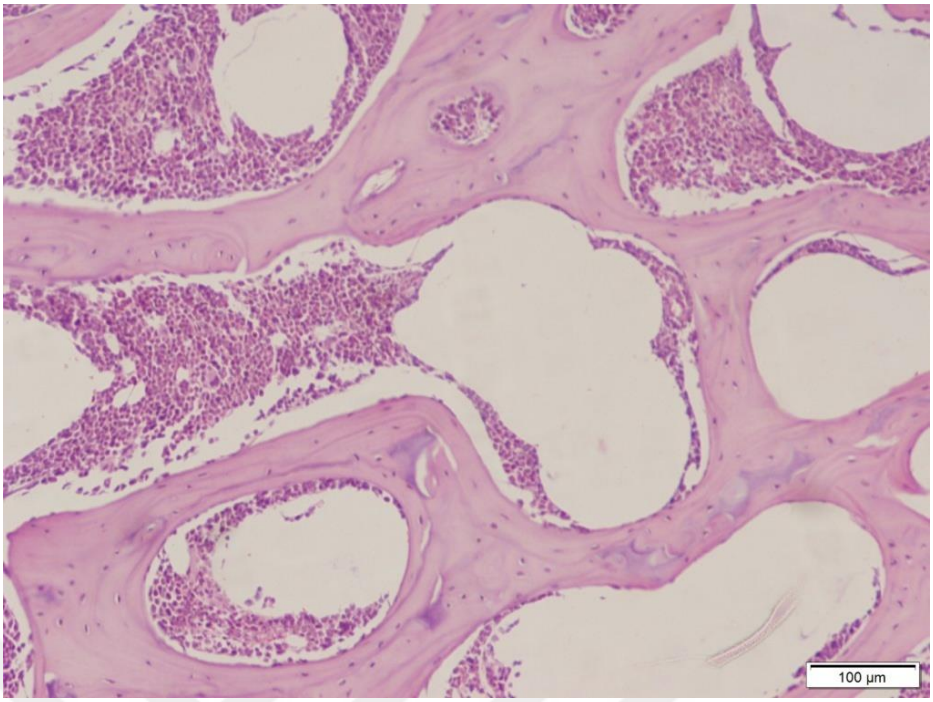
Şekil 4.10. 28. Günlük PK Grubunun Doku Örneği

PK grubunda: alınan örneklerde, iki denekte ağırlıklı olarak fibröz doku ve az miktarda kıkırdak dokusu gözlemlenmiştir. Üç denekte ise fibröz ve kıkırdak dokusu eşit oranda bulunmuştur (Şekil 4.10).



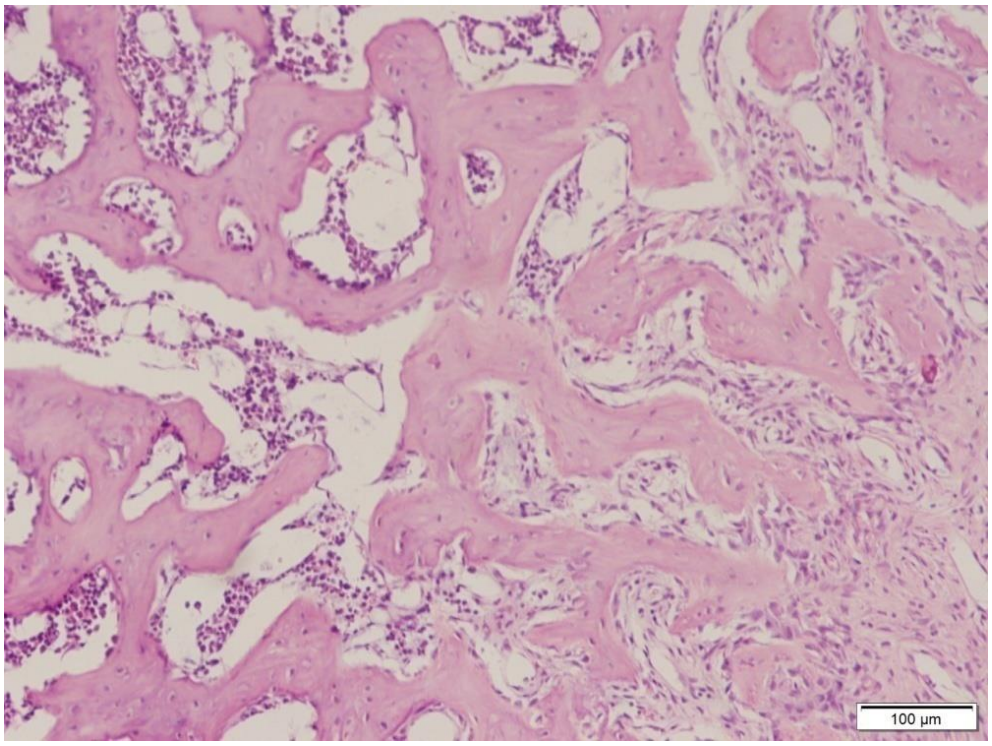
Şekil 4.11. 28. Günlük DVN Grubunun Doku Örneği

DVN grubunda: alınan örneklerde kemik dokuları normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.11).



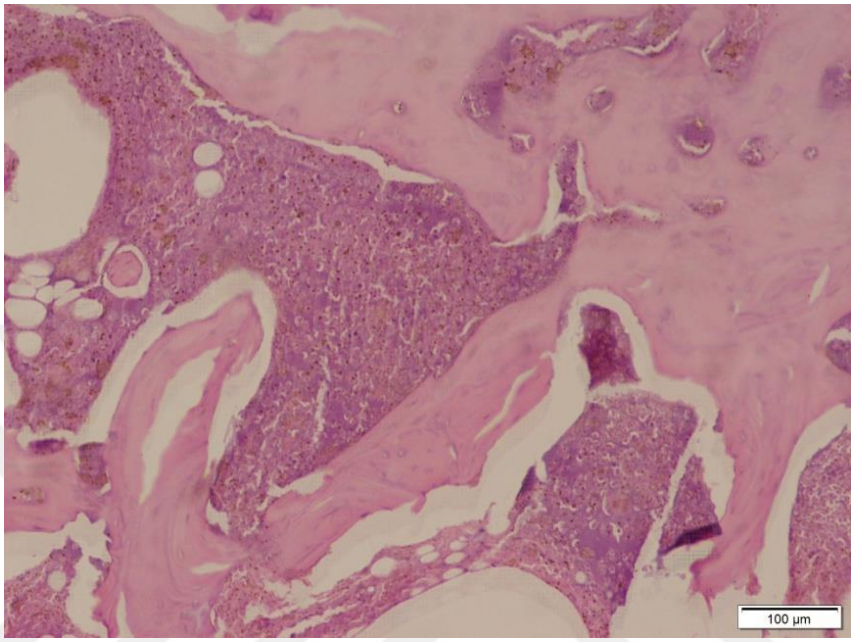
Şekil 4.12. 28. Günlük YVN Grubunun Doku Örneği

YVN grubunda: alınan örneklerde kemik dokuları normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.12).



Şekil 4.13. 28. Günlük DVP Grubunun Doku Örneği

DVP grubunda: alınan örneklerde iki kırık hattı arasında şu gözlemler yapıldı (Şekil 4.13): 1 denekte eşit oranda fibröz ve kıkırdak doku, 1 denekte ağırlıklı immatüre kemik ve az miktarda kıkırdak doku, 2 denekte immatür kemik ile kırık iyileşmesi, 1 denekte matür kemik ile kırık iyileşmesi.



Şekil 4.14. 28. Günlük YVP Grubunun Doku Örneği

Tablo 4.7. Kırık Oluşturulan Grupların Kallus Oluşumu Değerlerinin Karşılaştırılması

	GRUP	**N**	**Mean**	**Median**	**SD**	**Minimum**	**Maximum**	χ^2	**p**	**post-hoc**
Kallus oluşumu	PK	5	2,6	3	0,548	2	3	8,61	0,014	grup2-grup5
	DVP	5	8,6	9	1,14	7	10			
	YVP	5	4,4	3	2,881	2	8			

YVP grubunda: alınan örneklerde iki kırık hattı arasında şu gözlemler yapıldı (Şekil 4.14): 2 denekte ağırlıklı fibröz doku ve az miktarda kıkırdak doku, 1 denekte eşit oranda fibröz ve kıkırdak doku, 1 denekte eşit oranda kıkırdak ve immatür kemik doku, 1 denekte ağırlıklı immatür kemik ve az miktarda kıkırdak doku.

İstatistiksel analiz sonucunda (Tablo 4.6), PK ve DVP gruplar arasında kallus oluşumu ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0,014).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın en önemli sonuçları, vericiguat'ın doza bağlı kırık iyileşmesi ve sağlıklı kemik üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır. Biyomekanik ve histolojik değerlendirmeler ilacın doza bağlı farklı etkiler yarattığını gösterdi. Özellikle düşük dozda (3 mg) uygulandığında, histolojik ve biyomekanik açılardan kemik kırık iyileşmesi üzerinde olumlu etkiler gözlemlenmiştir. Bu etki, düşük dozun osteojenik süreçleri destekleyebileceğini ve iyileşme sürecine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Buna karşılık, yüksek dozda (6 mg) uygulanan vericiguat, biyomekanik açıdan kırık iyileşmesini olumsuz etkilemiştir. Yüksek doz grubunda histopatolojik olarak nekroz ve inflamasyonun daha belirgin olduğu görülmüş, bu da yüksek doz vericiguat'ın doku hasarı ve inflamatuar reaksiyonlar gibi istenmeyen yan etkilere yol açabileceğini göstermiştir. Ayrıca kemik defekti olmayan gruplarda ise farklı dozlarda vericiguat kullanımı, kemik dokusunda radyolojik, biyomekanik ve histolojik incelemelerde herhangi bir patolojik duruma yol açmamıştır.

Deneysel çalışmalar, özellikle deney hayvanları kullanılarak gerçekleştirilmekte ve bu hayvanlar hastalık modellerinin oluşturulmasında kritik bir rol oynamaktadır (64). İlk olarak 1970 yılında Jackson ve ekibi, ratlar üzerinde kapalı kırık modeli geliştirmiştir. Bu model, kemik iyileşme süreçlerini daha iyi anlamaya yönelik önemli bir adımdır. 1984 yılında ise Bonnarens ve Einborn, Jackson'ın modeline dayanarak daha gelişmiş kırık modelleri tanımlamışlardır (65).

Kırık modeli oluşturulurken hem açık (66–68) hem de kapalı (69–71) teknikler kullanılabilir ancak literatürde kapalı kırık modeli daha sık tercih edilmektedir. Açık osteotomi ile yapılan kırıklarda, kaynama gecikmesi, enfeksiyon riskinin artması ve kaynamama gibi komplikasyonların daha sık görüldüğü bildirilmektedir. Bu risklerin azaltılması amacıyla çalışmamızda kapalı kırık oluşturma modelini tercih ettik.

Literatürde kırık oluşturma sırasında intramedüller K-teli uygulamasının cerrahi stabiliteyi artırmak için kullanıldığı belirtilmiştir (72). Çalışmamızda da bu literatüre dayanarak, güvenilirliği ve stabilite sağlaması nedeniyle K-teli ile femur kırık oluşturma yöntemini tercih ettik.

Başka bir çalışmada, tibia kapalı kırıklar için özel olarak tasarlanmış pense kullanılmıştır (65). Biz de çalışmamızda, femur üzerine üç nokta bükme prensibine uygun, kendi tasarladığımız pense ile kapalı kırık oluşturma tekniğini standart hale getirdik. Bu yöntemin literatürdeki uygulamalara uygun bir yaklaşım olacağına inanmaktayız.

Kırık iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda farklı hayvan modelleri kullanılmıştır. Literatürde benzer çalışmaların çoğunlukla ratlar üzerinde gerçekleştirildiği gözlemlenmiştir (55,59,73–75). Çalışmamızda da literature benzer şekilde ratlar tercih edilmiştir. Bunun nedenleri arasında, yüksek sayıda temin edilebilmeleri, hızlı adaptasyon süreçleri, enfeksiyonlara karşı daha dirençli olmaları ve düşük maliyetleri vardır. Ayrıca büyük hayvanlara kıyasla daha kolay manipüle edilebilmeleri, daha fazla örnek alma imkanı sunmaları ve fizyolojik açıdan yeterli bilgiye sahip olmaları gibi avantajlar da yer almaktadır.

Diğer kırık iyileşmesi çalışmalarında olduğu gibi (74,75) çalışmamızda da dişi ratlar kullanılmıştır. Hormonal etkilerin sonuçları etkilememesi amacıyla, daha önce çiftleşmemiş ratlar tercih edilmiş ve deney süresince yalnızca dişi hayvanlar incelenmiştir. Bu seçim, hormonal değişkenliklerin deney sonuçları üzerindeki potansiyel etkilerini minimize etmek amacıyla yapılmıştır.

Deneysel çalışmalarda enfeksiyonlar, kırık iyileşmesinde gecikmelere yol açan önemli komplikasyonlar arasında yer almakta ve bazı hayvanların bu nedenle çalışmadan çıkarıldığı bildirilmiştir (76). Ancak çalışmamızda bu gözlemlenmemiştir. Bunun da nedeni yüksek sterilizasyon standartları, iyi post-operatif bakım, sağlıklı hayvan kullanımı ve deneyimli ekip tarafından yapılan operasyonlar olduğuna inanmaktayız.

Çözünebilir guanilil siklaz aktivatörü klinik uygulamalarda oral olarak verilmekte olup (51). Preklinik hayvan deneylerinde, sıçanlarda sistemik olarak oral uygulanan vericiguat, 1 mg/kg ile 3 mg/kg dozları arasında orta düzeyde oral biyoyararlanım (%40–%50) gösterilmiştir (77). Çalışmamızda da klinik kullanımına uygun olarak oral yolla uyguladık.

Vericiguat'ın kemik metabolizması üzerindeki dozlara bağlı etkileri çeşitli çalışmalarda ele alınmıştır (5,53). Bu farklı sonuçlar, vericiguat'ın kemik metabolizmasını hem düşük dozda hem de yüksek dozda nasıl etkilediğinin önemini ortaya koymaktadır. Bu nedenle çalışmamızda vericiguat'ın farklı dozlarını (3 mg/kg ve 6 mg/kg) kullanarak bu etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirdik.

Radyolojik değerlendirmelerde çeşitli yöntemler kullanılmıştır, örneğin direk röntgenografi, mikro bilgisayarlı tomografi (58,59). X-Ray (röntgen), kırık uçları arasındaki köprüleşmeyi, kırık hattının görünürlüğünü ve kallus genişliğini incelemek için yaygın olarak tercih edilmiştir (55). Çalışmalarda kırığın iyileşme sürecindeki görsel farklılıkları belirlemek için Lane ve Sandhu tarafından geliştirilen bir sınıflama sistemi uygulanmıştır (57). Ayrıca 4 puan üzerinden değerlendirilmiştir: 0 –kallus yok, 1-kemiksel kaynama başlangıcı, 3-kırık hattının görülmemesi, 4-tam kemiksel kaynamanın görülmesi (58) . Bu sisteme göre çalışmamızda, kırık iyileşme oranlarını ve süreçlerini haftalara göre röntgenografi kullanarak değerlendirdik.

Biyomekanik testler, kemik kırıklarını incelemek için genellikle ‘'üç nokta eğilme'' ve ‘'dört nokta eğilme'' testlerini içerir. Üç nokta eğilme testi, kemiğin ortasında yüksek makaslama kuvvetleri oluşturur ve genellikle transvers kırıklara yol açar. Dört nokta eğilme testinde makaslama kuvveti oluşmaz. Simetrik olmayan (tibia, femur gibi) materyallerde üç nokta eğilme testi daha sık tercih edilir (78). Bu nedenle çalışmamızda da üç nokta eğilme testi uygulanması planlanmıştık.

Literatürde histolojik analizlerde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin, Huo ve arkadaşları, kırık bölgesindeki hücresel farklılaşmayı 1 ile 10 arasında bir puanlama sistemiyle değerlendirmiştir (60). Diğer bir örnek olarak, Allen ve arkadaşları, kallus dokusunun iyileşme aşamalarını 0'dan 4'e kadar olan Lane-Sandhu sınıflamasına göre puanlamıştır (79). Ayrıca, literatürde Modifiye Lane-Sandhu histolojik değerlendirme skalası da kullanılmaktadır; bu skala korteks, spongioz kemik ve kemik iliğini ayrı ayrı değerlendirerek toplamda 20 puan üzerinden derecelendirir. Bizim çalışmada kırık iyileşme incelenmesinde en sık kullanılan Huo ve arkadaşlarının önerdiği skalayı kullanmayı planlanmıştık.

Sun ve arkadaşları tarafından yapılan in vitro çalışmada, vericiguat'ın osteoklast farklılaşmasını ve kemik rezorpsiyonunu modüle edebileceğini bidirmişlerdir. (5). Çalışmalarında vericiguat'ın düşük konsantrasyonlarda (100 nM - 1 μM) osteoklast farklılaşmasını artırdığı, ancak yüksek konsantrasyonlarda (4 μM - 8 μM) bu farklılaşmayı baskıladığı gösterilmiştir. Vericiguat'ın düşük dozları, RANKL ile indüklenen osteoklastogenezi artırabilir ve bu etkinin VASP/IκB-α/NF-κB sinyal yolunun aktivasyonu ile ilişkili olduğu ifade edilmişlerdir. Öte yandan, yüksek konsantrasyonlarda vericiguat, osteoklastogenezi baskılayarak IκB-α/NF-κB sinyal yolunu doğrudan inhibe eder ve bu inhibisyon, VASP'ın osteoklastogenez üzerindeki teşvik edici etkisini baskılayarak kemik yıkımını azaltır. Bu bulgular, bizim çalışmamızda vericiguat'ın doza bağlı uygulamasıyla gözlemlenen etkilerle tutarlıdır. Çalışmamızda yüksek doz (6mg/kg) grubunda izlenen nekroz, inflamasyon ve olumsuz biyomekanik bulguları örtüşmektedir. Osteoklastların aşırı baskılanması ve kemik rezorpsiyonunun engellenmesi nedeniyle kemik yeniden şekillenmesini yavaşlatabilir. Bu durum, kırık bölgesinde yeterli kemik yıkımı ve yeniden yapım sürecinin gerçekleşmemesine yol açarak, kemik iyileşmesini olumsuz etkileyebilir. Ayrıca düşük doz (3mg/kg) vericiguat kullanımının osteoklast aktivitesini artırarak kallus oluşumunu hızlandırdığı, olumlu histopatoloik özellikler sağladığı ve kemik iyileşmesini desteklediği de çalışmamızla örtüşmektedir. Bunun sebebi, düşük dozlarda osteoklast farklılaşmasını teşvik ederken aynı zamanda VASP gibi sinyal yolları üzerinden kemik yeniden şekillenmesine ve kemik rezorpsiyonuna katkıda bulunarak, dengeli bir kemik iyileşmesi sağlaması olabilir. Bu denge, kemik yapımı ve yıkımının kontrollü bir şekilde gerçekleşmesine olanak tanır. Ancak bu mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla in vivo kırık iyileşmesi modeli deneyine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tao ve Shen tarafından yapılan çalışmada, ovariektomi ve femurlarında defekt uygulamış olan ratlarda 2 mg ve 5 mg vericiguat'ın β-trikalsiyum fosfat ile kombine edilerek osteojenik aktivitesinin artırılabileceğini gösterilmiştir (53). Düşük doz vericiguat (3 mg+kırık var) grubunda kallus oluşumunun ve biyomekanik özelliklerinin daha iyi olmasını ortaya koymuştuk ve bu sonucumuz örtüşmektedir. Ancak Tao ve Shenin çalışmasıda 5 mg Vericiguat daha etkili olduğunu bulmuşlar. Bizim çalışmamızda yüksek doz (6 mg+kırık var) vericiguat grubunda biyomekanik

olarak yük değerlerinde düşüş gözlendi. Ayrıca histolojik incelemelerde bu grupda belirgin nekroz ve inflamasyon infiltrasyonları saptandı. Bu bulgular, Tao ve Shen'in çalışmasında gözlenen yüksek dozun osteojenik etkinliğiyle çelişmektedir. Farklı sonuçların nedeni, Tao ve Shen'in çalışmasındaki β-trikalsiyum fosfat katkısının osteojenik etkisi olabilir. Bu etkinin vericiguat yüksek dozda daha belirgin hale geldiği şeklinde yorumlanabilir. Çalışmamızda ise vericiguat'ın monoterapisi ile yüksek dozda olumsuz etkiler gözlemlenmiştir. Diğer bir farklılık nedeni de takip süresi olabilir. Tao ve Shen'in çalışması 12 hafta boyunca sürdürülürken, bizim çalışmamız 4 hafta ile sınırlı kalmıştır. Daha uzun bir takip süresi, kemik iyileşmesinin farklı aşamalarını değerlendirmek açısından önemlidir ve bu durum, sonuçlardaki farklılıkları açıklayabilir. Başka nedeni de osteoporotik kemik defekt ve sağlıklı kemik iyileşmesi farklı biyolojik durumlardır. Ayrıca osteoporoz ve kırık iyileşmesi gibi farklı biyolojik durumlar da bu sonuçlardaki farklılıklara yol açabilir. Bununla birlikte vericiguat ile in vitro ve in vivo indüklenen kemik iyileşmesinde yer alan kesin mekanizmaları açıklamak için ek araştırmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamışlar.

Tao ve Shen'in tarafından yapılan başka çalışmada, vericiguat ovariektomi uygulanmış yaşlı (24 aylık) sıçanlarda demir aşırı yüklenmesine bağlı oksidatif stresi ve inflamasyonu inhibe ederek osteointegrasyonu artırdığını göstermektedir (54). Bu araştırmada vericiguatın osteointegrasyon üzerindeki etkileri 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarıyla incelenmiştir. İki doz da etkili osteointegrasyon oluşturulmuştu. Ama 10 mg/kg dozunun osteointegrasyonu daha belirgin şekilde artırdığı bulunmuştur. Bu durum vericiguatın kemik iyileşmesindeki potansiyel rolünü destekleyen bir bulgudur. Çalışmamızda vericiguat düşük doz (3 mg+kırık var) vericiguatın olumlu etkiler sağladığını gözlemlerken, yüksek doz (6 mg+kırık var) uygulaması olumsuz sonuçlara yol açtı. Bu noktada Tao ve Shen'in çalışmasındaki yüksek dozu (10 mg/kg) ile sağladığı olumlu etkiler, çalışmamızdaki yüksek doz (6 mg/kg) ile gözlemlenen olumsuz etkiler arasında bir çelişki oluşturmaktadır. Öncelikle Tao ve Shen'in çalışmasında vericiguat, ferrik amonyum sitrat ile birlikte kullanılmıştır. Çalışmamızda ise vericiguat monoterapi olarak uygulanmış; bu durum vericiguatın kemik kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini daha doğrudan incelememizi sağlamıştı. İki çalışmadaki hayvan modellerinin farklı yaşları ve takip süreleri mevcuttu. Tao ve Shen yaşlı (24 aylık) sıçanları kullanmışlardır ve 12 haftalık bir takip süresi

belirlemişlerdir. Yaşlı sıçanlarda oksidatif stres ve inflamasyon daha belirgin olduğu için bu modelde vericiguatın etkileri farklı olabilir. Çalışmamızda ise genç (8 haftalık) sıçanlar kullanıldı ve 4 haftalık bir takip süresi izlendi. Yaş ve takip süre farkları kemik iyileşmesi hızını ve metabolik süreçleri etkileyen önemli bir faktörlerdir, bu da sonuçların farklı olmasına katkıda bulunabilir. Ayrıca osteointegrasyon ve kırık iyileşmesi arasındaki temel farklar da önemli bir çelişki kaynağıdır. Bu iki süreç farklı biyolojik mekanizmalar ve yanıtlarla ilişkilidir; dolayısıyla sonuçların farklılık göstermesi kaçınılmazdır. Gelecek araştırmaların, bu iki çalışma arasındaki farklılıkları daha iyi açıklayacak ve vericiguatın klinik uygulamaları için potansiyel faydalarını ortaya koyacak şekilde tasarlanması önerilmektedir.

Homer ve arkadaşları tarafından yapılan birkaç dizi in vivo çalışmada, toksik dozlarda (25mg/kg-500mg/kg) sGC agonistlerinin sıçanlarda oral uygulanmasının osteoklastik kemik rezorpsiyonunu artırdığı, aynı zamanda aksiyal ve apendiküler iskelette yeniden yapılanma ile yeni kemik oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir (51). Bu, çalışmamızdaki yüksek doz vericiguatın (6 mg/kg) kemik iyileşmesine olumsuz etkiler gösterdiği bulgusuyla örtüşmektedir. Yüksek dozda, özellikle kallus dokusunda nekroz ve inflamasyon gözlemlenmiştir. Homer ve ark.'nın sGC aktivatörlerinin kemik rezorpsiyonunu artırdığı bulgusu, bu olumsuz etkinin biyomekanik zayıflamaya katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Homer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yeni kemik oluşumuna dair bulguları, çalışmamızdaki kallus oluşumu gözlemleriyle bir miktar örtüşmektedir. Homer ve arkadaşlarının çalışmasında da, kemik üzerindeki olumsuz etkiler yüksek dozlara bağlı olarak artış göstermiştir. Ancak Homer ve arkadaşlarının çalışmasında sGC aktivatörlerinin neden olduğu kemik şekillenmesinde yeni kemik oluşumu da gözlemlenmiştir. Çalışmamızdaki grup 6'da (6mg vericiguat+kırık) kallus dokusunda nekroz ve inflamasyon infiltratları gözlemlenmesine rağmen kallus oluşumu gecikmemiştir. Bu sGC agonistlerinin, kemik rezorpsiyonu ve yeniden yapılanma süreçlerindeki karmaşık mekanizmaları destekler niteliktedir. Kemik rezorpsiyonu sürecinde osteoklastların aktivasyonu yeni kemik oluşumu için gerekli bir aşama olabilir, ancak bu süreçte meydana gelen inflamasyon ve nekrozun uzun vadede kemik kalitesini olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir. Homer ve arkadaşlarının sGC aktivatörlerinin neden olduğu kemik değişikliklerinin tedavi sonrasında geri

dönebildiğini ve kemik yeniden şekillenmesinin uzun vadede düzeldiğini belirtmiştir. Çalışmamız ise, tedavi süresiyle sınırlı olduğu için uzun vadeli etkiler üzerine veri sunmamaktadır. Ancak bu, gelecekteki çalışmalar için önemli bir araştırma alanı olabilir; yüksek doz vericiguat ile görülen olumsuz etkilerin uzun süreli tedavi sonrasında geri dönüşlü olup olmadığı incelenmelidir.

Joshua ve arkadaşlarının çalışmasında, başka bir çözünür guanilat siklaz (sGC) uyarıcısı olan cinaciguatın, ovariektomi yapılan sıçanlarda sGC aktivasyonunu sağlayarak kemik mineral yoğunluğunu artırdığı, osteoblast proliferasyonu, farklılaşması ve sağkalımını desteklediği gösterilmiştir. Bu bulgu, cinaciguatın kemik kaybını önleyebileceğini ortaya koymakta ve sGC'ın osteoporoz tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğine işaret etmektedir (3). Benzer şekilde çalışmamızda da düşük doz vericiguat (3 mg/kg) kullanımının, biyomekanik ve histolojik açıdan olumlu etkiler sağladığı saptanmıştır. Özellikle kallus oluşumunun hızlandığı ve kemik iyileşmesinin desteklendiği gözlemlenmiştir. Joshua ve arkadaşlarının bulguları ile çalışmamızdaki düşük doz vericiguat sonuçları, sGC aktivasyonunun kemik metabolizması üzerindeki olumlu etkilerini göstermesi bakımından örtüşmektedir. Bu bulgular, düşük doz sGC agonistlerinin kemik sağlığı ve iyileşme süreçlerinde rol oynayabileceğine dair daha fazla araştırmanın gerekliliğini vurgulamaktadır.

Vericiguat**,** çözünür guanilat siklaz (sGC) aktivasyonu yoluyla NO'in doğal etkilerini taklit edebilir (47). sGC, NO ile uyarıldığında hücre içinde cGMP (siklik guanozin monofosfat) üretilir ve bu sinyal yolakları kemik metabolizmasını etkileyebilir. NO'in kemik oluşumuna ve osteoklastların inhibisyonuna etkileri göz önüne alındığında, vericiguat'ın da benzer mekanizmalarla kemik iyileşmesini destekleyebileceği öngörülebilir (80,81).

Yumurtalıkları alınmış sıçanlarda yapılan bir çalışmada, nitrik oksit (NO) donörü olan nitrogliserinin kemik mineral yoğunluğu (BMD) üzerindeki etkileri incelenmiştir (49). Wimalawansa ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada, sıçanlara günde bir kez 0,2 mg nitrogliserin uygulandığında, yumurtalıkların alınması nedeniyle oluşan spinal BMD kaybının önlendiği görülmüştür. Ancak aynı dozda nitrogliserin günde iki veya üç kez uygulandığında, kemik kaybı önlenememiştir. Bu bulgu, NO yolunun kemik metabolizması üzerindeki frekans bağımlı etkilerini ortaya

koymaktadır. Düşük frekansta NO donörlerinin kemik üzerinde olumlu etkileri olurken, yüksek frekanslı uygulamaların etkisiz veya zararlı olabileceğini göstermektedir. Bu durum, NO-sGC-cGMP yolunun hassas dengelerle çalıştığını ve dozun yanı sıra uygulama sıklığının da kemik metabolizması üzerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Çalışmamızda da benzer bir şekilde, vericiguat'ın düşük dozlarda kemik iyileşmesini desteklediği, ancak yüksek dozlarda olumsuz etkiler gösterdiği bulunmuştur. Vericiguat ve nitrogliserin, her ikisi de NO yolunu etkileyen ajanlar olarak, bu sinyal yolunun kemik metabolizması üzerindeki potansiyel rolünü vurgulamaktadır. Nitrogliserin çalışmasında gözlemlenen frekans bağımlı etkiler, bizim vericiguat çalışmamızdaki doza bağlı etkilerle paralellik göstermekte olup, hem NO donörleri hem de sGC aktivatörlerinin doğru doz ve frekans ayarının kemik sağlığı için kritik olduğunu düşündürmektedir.

Mancini ve ark. tarafından yapılan in vitro çalışmada, nitrik oksidin (NO) rat osteoblastları üzerindeki etkilerinin cGMP aracılığıyla iki fazlı olduğu belirtilmişlerdir (44). Bu çalışmada NO'in düşük (yaklaşık 10 μM) konsantrasyonlarda osteoblast proliferasyonunu ve kemik oluşumunu desteklemiştir. Ancak yüksek (yaklaşık 100 μM) konsantrasyonlarda ise bu etkilerin tersine döndüğü görülmüştür. Bu bulgu, NO'in kemik hücrelerinin fonksiyonları üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkileri olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda vericiguat'ın düşük doz grubunda (3mg/g) hem histolojik hem biyomekanik özellikleri yüksek, vericiguat'ın yüksek doz grubunda (6 mg/kg) biyomekanik özelliklerin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu grupta nekroz ve inflamasyon belirgin olmasına rağmen, kırık iyileşmesinde gecikme gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, NO'in cGMP yoluyla etkilerini yönlendiren sGC aktivasyonunun, vericiguat dozuna bağlı olarak kemik hücre fonksiyonlarını olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir. Mancini ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu olarak, vericiguat'ın kemik iyileşmesindeki etkilerinin doza bağımlı olduğunu ve yüksek dozlarda istenmeyen sonuçlar doğurabileceğini söyleyebiliriz. Bu durum, NO'in kemik biyolojisi üzerindeki karmaşık etkilerini ve vericiguat gibi sGC agonistlerinin kemik iyileşmesindeki rolünü anlamak için dozajın optimize edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Çalışmamızın güçlü yönleri bulunmaktadır. Çalışmamızda kullanılan deneysel hayvan model kontrollü bir ortamda yürütüldü. Denek hayvanları belirli gruplara ayrılarak, hem vericiguat'ın farklı dozlarının etkilerin kemik iyileşmesi ve sağlıklı kemik üzerindeki sonuçları karşılaştırmalı bir şekilde değerlendirildi. Ayrıca çalışmamızda biyomekanik, histolojik ve radyolojik değerlendirmeler bir arada kullanıldı. Bu multidisipliner yaklaşım, vericiguat'ın etkilerini farklı açılardan ele alarak daha kapsamlı bir sonuç elde edilmesine katkıda bulundu.

Çalışmamızın sınırlamaları da mevcuttur. İlk olarak ratların kan örneklerinde biyokimyasal analizlerin yapılmamış olması, vericiguat'ın sistemik etkilerini tam olarak değerlendirme imkanını sınırlamıştır. Vericiguat'ın kandaki net konsantrasyonları belirlenmediği için ilacın farmakokinetik profili hakkında yeterli bilgi edinilememiştir. Ayrıca kallus oluşumunun detayları mikro bilgisayarlı tomografi (micro-CT) ile incelenmemiştir, bu da iyileşme süreçlerinin daha hassas bir şekilde değerlendirilmesine engel olmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın bulguları, vericiguat'ın düşük dozda (3 mg) uygulandığında kemik kırık iyileşmesi üzerinde histopatolojik açıdan olumlu etkileri gösterdiğini, ancak yüksek dozda (6 mg) biyomekanik açıdan bu etkinin olumsuz olduğunu ortaya koymaktadır. Düşük dozda vericiguat, kallus dokusunun daha iyi organize olduğu ve iyileşmenin daha düzgün gerçekleştiği histopatolojik bulgularla desteklenirken, yüksek dozda ise kallus dokularda nekroz ve inflamasyonun belirgin hale gelmesi, yüksek doz kullanımının kemik iyileşmesi üzerinde olumsuz etkiler yarattığını göstermektedir. Bununla birlikte, düşük doz vericiguat grubundaki biyomekanik parametreler, yüksek doz grubuna göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Radiyolojik değerlendirmelerde ise farklı dozlarda vericiguat kullanımının, kırık iyileşmesi üzerinde anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür.

Kemik kırığı olmayan gruplarda ise radyolojik, biyomekanik ve histopatolojik incelemelerde farklı dozlarda vericiguat kullanımı, kemik dokusunda herhangi bir patolojik durumlara yol açmamaktadır.

Hayvan modelleri üzerinde elde edilen verilerin klinik olarak insanlara genellenebilirliği için klinik çalışmalar gereklidir. Özellikle yüksek dozlarda görülebilecek olası yan etkilerin derinlemesine incelenmesi ve mekanizmalarının aydınlatılması önem arz etmektedir. Kallus oluşumunun radyolojik olarak daha hassas incelenmesi için mikro bilgisayarlı tomografi kullanılabilirken, histolojik değerlendirmeler için farklı zaman dilimlerinde yapılan sakrifikasyonlarla iyileşmenin farklı aşamaları gözlemlenmelidir. Son olarak biyokimyasal kemik iyileşme parametrelerinin ölçümü de kemik metabolizması hakkında daha derinlemesine bilgi sağlayarak, iyileşme süreçlerinin anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

Literatürde, sGC aktivatörlerinin sağlıklı kemik dokusu ve kırık iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalar bulunmamaktadır; bu nedenle çalışmamız bu alandaki ilk araştırma olma özelliğine sahiptir.

7. KAYNAKLAR

1. Emeli A, İNANMAZ M, IŞIK C, Bentli R, Karakurt L, Belhan O. Serum ghrelin levels during fracture healing and immunohistochemical investigation of ghrelin in bone tissue. Acta Medica Mediterranea [İnternet]. 2014 [a.yer 27 Eylül 2024];30(1).

2. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. Injury. 2007;38:S11-8.

3. Joshua J, Schwaerzer GK, Kalyanaraman H, Cory E, Sah RL, Li M, vd. Soluble guanylate cyclase as a novel treatment target for osteoporosis. Endocrinology. 2014;155(12):4720-30.

4. Korkmaz Y, Puladi B, Galler K, Kämmerer PW, Schröder A, Gölz L, vd. Inflammation in the Human Periodontium Induces Downregulation of the α1-and β1-Subunits of the sGC in Cementoclasts. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(2):539.

5. Sun K, Kong F, Lin F, Li F, Sun J, Ren C, vd. Vericiguat Modulates Osteoclast Differentiation and Bone Resorption via a Balance between VASP and NF-κB Pathways. Ding W, editör. Mediators of Inflammation. 16 Haziran 2022;2022:1-22.

6. Rangaswami H, Schwappacher R, Marathe N, Zhuang S, Casteel DE, Haas B, vd. Cyclic GMP and Protein Kinase G Control a Src-Containing Mechanosome in Osteoblasts. Sci Signal [Internet]. 21 Aralık 2010 [a.yer 05 Eylül 2024];3(153). Erişim adresi: https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2001423

7. Armstrong PW, Roessig L, Patel MJ, ve diğerleri. Oral çözünür guanilat siklaz uyarıcısının etkililiği ve güvenliğine ilişkin çok merkezli, randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir çalışma: VICTORIA çalışması. JACC Heart Fail. 2018;6(2):96–104.

8. Jungueria Carlos L, Carnerio J, Kelley O. Bone. In: Basic Histology. Appleton and Lange, New Jersey, 132-151, 1995. İçinde.

9. Netter FH. Kemiğin oluşumu ve yapısı. A Tansu, Kayalar Ak G (Editörler). The netter collection of medical illustrations. Ankara: Güneş Tıp Yayınevi; 2009. s.169-74. İçinde.

10. Bağcı V. Alt ekstremite kırıklarının plak ile biyolojik tespiti. Şişli Etfal Eğitim ve Arş. Hastanesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2005, İstanbul, (Danışman: Dr. Ünal Kuzgun).

11. Junqueira LC, Carneiro J: Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter8, page: 144-46, 2003. İçinde.

12. BayramN. Histoloji. Anadolu Üniv. Yayınları 1995;125-132.

13. Sunay Özgür. Adipoz kökenli kök hücre yardımlı distraksiyon osteogenez. Dokuz Eylül Üniversitesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. 2010, İzmir,(Danışman: Dr. Mustafa Yılmaz).

14. Kotan LD. Silika metodu ile kemikten DNA ekstraksiyonu. Adana Çukurova Üniversitesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2010, Adana. (Danışman: PROF. DR. BEHNAN ALPER).

15. Aydın Bahattin Kerem. Pentoksifillin kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. BALTALİMANI METİN SABANCI KEMİK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2007, İstanbul, (Danışman: Vedat Şahin).

16. Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi: 1-4, 2006. İçinde.

17. Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi: 5-11, 2006. İçinde.

18. Brinker Mark R, O'Connor D. Kemik. In: Miller M (Ed) Miller'ın Ortopedi Kitabı. Çeviri editörleri Yetkin H, Yazıcı M, Ankara, Adya, 1-44, 2006. İçinde.

19. Miller MD. Bone. Miller M (Ed), Review of Orthopaedics. Philadelphia: Saunders, 2004: 266-305. İçinde.

20. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology-I.In Pritchard DJ(ed) Instructional Course Lectures Volume 41, AAOS; 99–387, 1996. İçinde.

21. Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi: 12, 2006. İçinde.

22. Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi: 16, 2006. İçinde.

23. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clinical Orthopaedics and Related Research®. 1998;355:S7-21.

24. Canale TS. Campbell's Operative Orthopaedics 11. Basım Türkçe, 2688, 2010. İçinde.

25. Muller AM: Overview of the fracture healing cascade. Injury 5–7; 2005. İçinde.

26. Ege R. Travmatoloji-Kırıklar, eklem ve diğer yaralanmalar. Cilt 1, 5. baskı. Ankara (35-55); 2001. İçinde.

27. Lieberman Jay R. MD, Bone Regeneration and Repair Rewiew of Orthopaedics: 254-263, 2007. İçinde.

28. Kuzuca BC, Doral MN. Kırık iyileşmesinde güncel moleküler tedavi yöntemleri. [a.yer 19 Eylül 2024]; Erişim adresi: https://scholar.archive.org/work/tbzgqf6arneark4p6oc5zu4biq/access/wayback/https://dergi.totbid.org.tr/uploads/pdf_1222.pdf

29. Marongiu G, Dolci A, Verona M, Capone A. The biology and treatment of acute long-bones diaphyseal fractures: Overview of the current options for bone healing enhancement. Bone reports. 2020;12:100249.

30. Buza III JA, Einhorn T. Bone healing in 2016. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism. 2016;13(2):101.

31. Thompson SR, Miller MD. Miller's Review of Orthopaedics. Elsevier, Incorporated; 2016.

32. Elliott DS, Newman KJH, Forward DP, Hahn DM, Ollivere B, Kojima K, vd. A unified theory of bone healing and nonunion: BHN theory. The Bone & Joint Journal. Temmuz 2016;98-B(7):884-91.

33. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury. 2011;42(6):551-5.

34. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. Nature Reviews Rheumatology. 2015;11(1):45-54.

35. McDonald M, Virani S, Chan M, Ducharme A, Ezekowitz JA, Giannetti N, vd. CCS/CHFS heart failure guidelines update: defining a new pharmacologic standard of care for heart failure with reduced ejection fraction. Canadian Journal of Cardiology. 2021;37(4):531-46.

36. Sharp M. Dohme Corp. VERQUVO®(vericiguat) tablets, for oral use: US prescribing information. 2021. 2022.

37. Hulot JS, Trochu JN, Donal E, Galinier M, Logeart D, De Groote P, vd. Vericiguat for the treatment of heart failure: mechanism of action and pharmacological properties compared with other emerging therapeutic options. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 22 Eylül 2021;22(14):1847-55.

38. Avrupa İlaç Ajansı. VERQUVO ® (vericiguat): AB ürün özellikleri özeti. 2021. https://www.ema.europa.eu . Erişim tarihi 20 Nis 2022.

39. Broderick KE, Zhang T, Rangaswami H, Zeng Y, Zhao X, Boss GR, vd. Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP)/cGMP-dependent protein kinase induce interleukin-6 transcription in osteoblasts. Molecular Endocrinology. 2007;21(5):1148-62.

40. Van'T Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. Immunology. Temmuz 2001;103(3):255-61.

41. Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. Biochemical Journal. 2002;364(2):329-41.

42. Hikiji H, Shin WS, Oida S, Takato T, Koizumi T, Toyo-oka T. Direct action of nitric oxide on osteoblastic differentiation. FEBS letters. 1997;410(2-3):238-42.

43. Yaroslavskiy BB, Zhang Y, Kalla SE, Palacios VG, Sharrow AC, Li Y, vd. NO-dependent osteoclast motility: reliance on cGMP-dependent protein kinase I and VASP. Journal of cell science. 2005;118(23):5479-87.

44. Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Becherini L, Martineti V, MacIntyre I. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. Biochemical and biophysical research communications. 2000;274(2):477-81.

45. Holliday LS, Dean AD, Lin RH, Greenwald JE, Gluck SL. Low NO concentrations inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures by cGMP-dependent mechanism. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 01 Mart 1997;272(3):F283-91.

46. Ralston SH, Grabowski PS. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. Bone. 1996;19(1):29-33.

47. Derbyshire ER, Marletta MA. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. Annu Rev Biochem. 07 Temmuz 2012;81(1):533-59.

48. Pan W, Quarles LD, Song LH, Yu YH, Jiao C, Tang HB, vd. Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. J Cell Biochem. 01 Şubat 2005;94(2):307-16.

49. Wimalawansa S, Chapa T, Fang L, Yallampalli C, Simmons D, Wimalawansa S. Frequency-dependent effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone. Journal of Bone and Mineral Research. 2000;15(6):1119-25.

50. Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Krukowski M, Misko TP, vd. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA. 26 Nisan 1994;91(9):3569-73.

51. Homer BL, Morton D, Bagi CM, Warneke JA, Andresen CJ, Whiteley LO, vd. Oral Administration of Soluble Guanylate Cyclase Agonists to Rats Results in Osteoclastic Bone Resorption and Remodeling with New Bone Formation in the Appendicular and Axial Skeleton. Toxicol Pathol. 01 Nisan 2015;43(3):411-23.

52. FDA (US Food and Drug Administration). (2013). Adempas® (riociguat) pharmacology review, summary basis of approval. Accessed May 7, 2014. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/204819Orig1s000PharmR.pdf.

53. Tao ZS, Shen CL. Favorable osteogenic activity of vericiguat doped in β-tricalcium phosphate: In vitro and in vivo studies. J Biomater Appl. Mayıs 2024;38(10):1073-86.

54. Tao ZS, Shen CL. Guanylate cyclase promotes osseointegration by inhibiting oxidative stress and inflammation in aged rats with iron overload. Bone Joint Res. 01 Eylül 2024;13(9):427-40.

55. Karabak B. Ratlarda Deneysel Kırık Defekti Modelinde Grandus B-One Biyolojik Onarım İmplantı Tedavisi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2022, Erzurum (Prof.Dr. Orhan Karsan).

56. Balkanlı B, Çopuroğlu C, Çopuroğlu E. The effects of intravenous and local tranexamic acid on bone healing: an experimental study in the rat tibia fracture model. Injury. 2020;51(12):2840-5.

57. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. Orthopedic Clinics of North America. 1987;18(2):213-25.

58. Sevimli R. Deksketoprofen trometamol kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, 2011, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi. Kahramanmaraş, (Danışman: Doç.Dr.Murat Üzel)

59. Erener T. Ghrelinin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi, Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıpta Uzmanlık Tezi. 2019, Ankara, (Danışman: Prof. Dr. Cem Nuri Aktekin).

60. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: Biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. Journal Orthopaedic Research. Mayıs 1991;9(3):383-90.

61. Matsushita T, Cornell CN. Biomechanics of bone healing: editorial comment. Clinical Orthopaedics and Related Research®. 2009;467(8):1937-8.

62. Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O, Yildiz A, Sahin NO, vd. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. Clin Rheumatol. 02 Şubat 2007;26(3):380-4.

63. Jackson, R.A., et al., The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a ratfracturemodel. Journal oforthopaedicresearch, 2006.24(4): p. 636-644. İçinde.

64. Uludağ Ö, ADIYAMAN ÜNİVERSİTESİ TF. History and Importance of Ethical Rules in Animal Experiment Studies. 2019;

65. Handool KO, Ibrahim SM, Kaka U, Omar MA, Abu J, Yusoff MSM, vd. Optimization of a closed rat tibial fracture model. J EXP ORTOP. Aralık 2018;5(1):13.

66. Krischak GD, Augat P, Sorg T, Blakytny R, Kinzl L, Claes L, vd. Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. Arch Orthop Trauma Surg. 15 Aralık 2006;127(1):3-9.

67. Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, vd. Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. 01 Eylül 2003;123(7):327-32.

68. Shefelbine SJ, Augat P, Claes L, Beck A. Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. Journal of orthopaedic research. 2005;23(2):489-93.

69. Nakajima F, Nakajima A, Ogasawara A, Moriya H, Yamazaki M. Effects of a Single Percutaneous Injection of Basic Fibroblast Growth Factor on the Healing of a Closed Femoral Shaft Fracture in the Rat. Calcif Tissue Int. 02 Ağustos 2007;81(2):132-8.

70. Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, vd. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1–34). Journal of Bone and Mineral Research. 2002;17(11):2038-47.

71. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. Journal Orthopaedic Research. Ocak 1984;2(1):97-101.

72. Diwan AD, Wang MX, Jang D, Zhu WEI, Murrell GA. Nitric oxide modulates fracture healing. Journal of Bone and Mineral Research. 2000;15(2):342-51.

73. Prodinger PM, Bürklein D, Foehr P, Kreutzer K, Pilge H, Schmitt A, vd. Improving results in rat fracture models: enhancing the efficacy of biomechanical testing by a modification of the experimental setup. BMC Musculoskelet Disord [Internet]. Aralık 2018 [a.yer 17 Eylül 2024];19(1). Erişim adresi: https://bmcmusculoskeletdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12891-018-2155-y

74. Onay A., Dabigatran etexilatın ratlarda kırık iyileşmesi üzerine etkisi , Karadeniz Teknik Üniversitesi , Tıpta Uzmanlık Tezi, 2011, Trabzon, (Danışman: DOÇ. DR. SERVET KERİMOĞLU).

75. Safali S. Curcuminin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. Selcuk Üniversitesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2016, Konya, (Danışman: YRD. DOÇ. DR. BAHATTİN KEREM AYDIN).

76. Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, Kandziora F, Stange R, Haas NP, vd. Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF-β1) treatment on fracture healing: A safety study for using growth factors. Journal of Orthopaedic Research. 2004;22(3):514-9.

77. Janssen W, Schwarz T, Bütehorn U, Steinke W, Sandmann S, Lang D, vd. Pharmacokinetics and mass balance of vericiguat in rats and dogs and distribution in rats. Xenobiotica. 04 Mayıs 2022;52(5):453-62.

78. Gürgül ve ark., Kemik Biyomekaniği Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2016; 8 (1): 18-34 Derleme , Erişim adresi:https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/403627.

79. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and Aspirin: Effect of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents on the Rate of Fracture Repair in the Rat. Acta Orthopaedica Scandinavica. Ocak 1980;51(1-6):595-600.

80. Kalyanaraman H, Ramdani G, Joshua J, Schall N, Boss GR, Cory E, vd. A novel, direct NO donor regulates osteoblast and osteoclast functions and increases bone mass in ovariectomized mice. Journal of Bone and Mineral Research. 2017;32(1):46-59.

81. Kalyanaraman H, Schall N, Pilz RB. Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone. Nitric oxide. 2018;76:62-70.