

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

**RATLARDA DENEYSEL KIRIK DEFEKTİ
MODELİNDE GRANDUS B-ONE
BİYOLOJİK ONARIM İMPLANTI
TEDAVİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

Dr. Bilal KARABAK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Orhan KARSAN

Bu araştırma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından TTU-2022-10243 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

ERZURUM - 2022

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.....	3
2.1. Deneysel Cerrahinin Tarihi Gelişimi	3
2.2. Kemik Doku ve Yapısı	4
2.3. Kemğin Hücresel Biyolojisi	5
2.3.1. Osteoblastlar	5
2.3.2. Osteositler.....	6
2.3.3. Osteoklastlar	7
2.4. Kemik Matriks.....	7
2.5. Kemğin Yeniden Şekillenmesi (Remodelizasyon)	8
2.6. Kemik Kan Dolaşımı.....	8
2.7. Kemği Çevreleyen Dokular.....	10
2.8. Kemik Oluşum Tipleri	11
2.9. Kemik Doku Mineralizasyon Mekanizması.....	12
2.10. Normal Kemik Metabolizması	12
2.11. Kırık Mekanizması.....	15
2.12. Kırık İyileşmesi	15
2.12.1. Direkt Kırık İyileşmesi	16
2.12.2. Dolaylı Kırık İyileşmesi	16
2.13. Kırık İyileşmesinde Etkili Faktörler.....	19
2.14. Kırık İyileşmesinin Biyomekaniği	21
2.15. Kırık İyileşmesini Artırmak İçin Uygulanan Yöntemler (5,70).....	21
2.16. Kemik Greftleri	22

2.17. Tetrakalsiyum Fosfat.....	23
2.18. TNF-a, NFK B, BMP-2 ve IL-1B'nin Kemik Kırıklarındaki Yeri	24
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1. Denekler	26
3.2. Cerrahi Prosedür.....	28
3.3. Ameliyat Sonrası Rat Yönetimi	36
3.4. Radyografik İnceleme	38
3.5. Biyokimyasal Analizler.....	40
3.6. Histopatolojik Analizler	41
3.7. İstatiksel Analizler.....	42
4. BULGULAR	43
4.1. Rat Ağırlık Takiplerine Ait Bulgular	43
4.2. Radyolojik Bulgular	45
4.3. Biyokimyasal Bulgular.....	49
4.4. Histopatolojik Bulgular	52
4.5. İstatiksel Bulgular	56
4.5.1. Radyolojik İstatiksel Bulgular.....	56
4.5.2. Biyokimyasal İstatistiksel Bulgular.....	59
4.5.3. Histopatolojik İstatistiksel Bulgular	61
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	82
7. KAYNAKÇA	84
EKLER.....	95
EK-1. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	95
EK-2- CERRAHİ TIP BİLİMLERİ KURUL KARARI	96
EK-3- ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	97

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Deney Gruplarının Tanıtımı.....	27
Tablo 3.2. Modifiye Lane ve Sandhu Skrlama Sistemi.....	40
Tablo 3.3. Modifiye Lane ve Sandhu Skrlama Sisteminin Puanlaması	40
Tablo 4.1. Deneyisel gruplar içi tekrarlı ölçümlerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.2. Hematoksilen-Eozin ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Bulgular	52
Tablo 4.3. Masson's Trichrome ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Bulgular	54
Tablo 4.4. Deneyisel Gruplar içi Tekrarlı Ölçümlerinin Karşılaştırılması.....	57
Tablo 4.5. Deneyisel gruplar arasında ölçümlerinin karşılaştırılması	58
Tablo 4.6. Hematoksilen-Eozin ile yapılan boyamada gruplara göre histopatolojik bulgular.....	62
Tablo 4.7. Masson's Trichrome ile yapılan boyamada gruplara göre histopatolojik bulgular.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Grupların Kendi İçlerinde İsimlendirilmesi	27
Şekil 3.2. Ayarlanabilir Isıtıcı Ped Kumandası.....	28
Şekil 3.3. Steril Cerrahi Masa ve Steril Cerrahi Aletler	29
Şekil 3.4. Femur Şaft Periost Kaldırılmış	31
Şekil 3.5. Taşınabilir Diş Ünitesi Sistemi.....	31
Şekil 3.6. Osteotomi Sonrası İki Parçalı Kırık.....	32
Şekil 3.7. Retrograd K-teli Gönderimi.....	32
Şekil 3.8. Kırık Redükte Edilerek K-teli İle Tespit Edildi.....	33
Şekil 3.9. Grandus B-One Toz ve Sıvı Karıştırma Sistemi.....	33
Şekil 3.10. Grandus B-One'ın Kırık Hattına Uygulanması	34
Şekil 3.11. Grandus B-One Kırık Hattına Uygulandıktan Sonra.....	34
Şekil 3.12. Grandus B-One Sertleştikten Sonrası	35
Şekil 3.13. İntrakardiyak Kan Alımı.....	35
Şekil 3.14. Sakrifiye Edilmiş Rat Femuru	36
Şekil 3.15. Ratların Röntgen Kasedi Üzerine Dizilişi	38
Şekil 3.16. Radyolojik Görüntüleme Mesafesi	39
Şekil 3.17. Röntgen Cihazının Ratlara Göre Ayarlanması	39
Şekil 3.18. İntrakardiyak Kan Alımı.....	41
Şekil 4.1. Pozitif Kontrol Grubu Kilo İzlemi.....	43
Şekil 4.2. Grandus B-One Grubu Kilo İzlemi.....	43
Şekil 4.3. Negatif Kontrol Grubu Kilo İzlemi	44
Şekil 4.4. TTCP Grubu Kilo izlemi	44
Şekil 4.5. Negatif kontrol grubundan elde edilen radyolojik direkt grafi görüntüleri.	45
Şekil 4.6. Pozitif kontrol grubundan elde edilen radyolojik direkt grafi görüntüleri.	46
Şekil 4.7. Grandus B-One grubundan elde edilen radyolojik direkt grafi görüntüleri.	46
Şekil 4.8. TTCP grubundan elde edilen radyolojik direkt grafi görüntüleri.....	46

Şekil 4.9. Gruplarda ölçek skorlarının zamana değişim çizgi grafiği.....	48
Şekil 4.10. Radyolojik bulguların gruplarda dağılımları	49
Şekil 4.11. TNF-a ELISA testi analizlerinin gruplarda dağılımı	49
Şekil 4.12. Nükleer Kappa Elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı.....	50
Şekil 4.13. IL-1B Elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı	51
Şekil 4.14. BMP-2 Elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı	51
Şekil 4.15. Hematoksilen-Eozin ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Görünümler	53
Şekil 4.16. Hematoksilen-Eozin ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Görünümler	54
Şekil 4.17. Masson's Trichrome ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Görünümler	55
Şekil 4.18. Masson's Trichrome ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Görünümler	56
Şekil 4.19. ELISA tastine göre gruplar arası anlamlılık işaretleri	59
Şekil 4.20. TNF-a ELISA testi analizlerinin gruplarda dağılımı	59
Şekil 4.21. Nükleer Kappa elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı	60
Şekil 4.22. IL-1B ELISA testi analizlerinin gruplarda dağılımı	60
Şekil 4.23. BMP-2 elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen Fosfataz
ATADEM	: Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulam ve Araştırma Merkezi
BMP	: Kemik Morfogenetik Proteini
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CPC	: Kalsiyum Fosfat
DAYTAM	: Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
ELİSA	: Enzim Bağlantılı İmmunoSorbent Testi
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GAG	: Glikozaminoglikan
GH	: Büyüme Hormonu
HA	: Hidroksiapatit
HADYEK	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HE	: Hematoksilen-Eosin
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-17	: İnterlökin 17
IL-1B	: İnterlökin 1 Beta
IL-6	: İnterlökin 6
İM	: İntramedüller
K- TELİ	: Kirschner Teli
LIPUS	: Düşük Yoğunluklu Darbeli Ulsrason Uyarımı
MPC	: Magnezyum Fosfat
MSC	: Mezenkimal Kök Hücre
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NK	: Negatif Kontrol
NSAID	: Non-steriodal Anti İnflamatuar İlaç
OPG	: Osteoprotegrin
PDGF	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PEMFs	: Elektromanyetik Alan Uyarımı
PK	: Pozitif Kontrol
PMMA	: Polimetil Metakrilat

PTH	: Paratiroid Hormon
RANK	: Nükleer Faktör Kappa-B Reseptör Aktivatörü
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa-B Ligandı Reseptör Aktivatörü
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TTCP	: Tetrakalsiyum Fosfat
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu bir süreç olan uzmanlık eğitimim esnasında mesleki bilgi, beceri ve tecrübeleriyle yetişmemde emeği geçen ve tezimin hazırlanması aşamasında bu çalışmayı yapmama vesile olan, yardımlarını, desteklerini, zamanlarını esirgemeyen tez danışmanlarım değerli hocalarım Prof. Dr. Orhan KARSAN ve Doç. Dr. Kutsi TUNCER’e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca tecrübelerinden ve bilgi birikimlerinden çokça faydalandığım yetişmemde büyük emekleri olan A.D. Başkanım Prof. Dr. Naci EZİRMİK’e ve değerli hocalarım Prof. Dr. Ömer Selim YILDIRIM, Prof. Dr. Ali AYDIN, Doç. Dr. Sinan YILAR, Dr. Öğr. Üyesi. Mehmet KÖSE, Dr. Öğr. Üyesi. Ahmet Emre PAKSOY ve Dr. Öğr. Üyesi. M. Çağatay ENGİN’e ve ferdi olmaktan her zaman gurur duyduğum tüm Atatürk Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji ailesine derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı 10243 proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, çalışmanın planlanması ve uygulanması esnasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Farmakoloji A.D.’na çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, ilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen eşim Merve’ye ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Bilal KARABAK

ÖZET

Ratlarda Deneysel Kırık Defekti Modelinde Grandus B-One Biyolojik Onarım İmplantı Tedavisi

Amaç: Bu çalışma ile kemik defektlerini boşluksuz doldurabilen yüksek modelleme kapasitesine, iyi biyouyumluğa, osteokondüktif özelliklere ve en yüksek Ca/P oranına sahip olan kalsiyumfosfat bileşiklerden TTCP'yi ana bileşeni olarak kullanan Grandus B-One'ın kemik kırık tespiti ve kırık kaynaması üzerine etkisi araştırılacaktır.

Materyal ve Metot: Srague-Dawley cinsi 44 adet rat randomize olarak NK, PK, Grandus B-One ve TTCP grubu olarak 4 ayrı gruba ayrıldı. NK grubuna hiçbir müdahale yapılmadı. Diğer gruplarda genel anestezi altında sağ femur orta hattında açık osteotomi modeli oluşturuldu. Kırık modeli oluşturulan tüm gruplara intramedüller K teli uygulandı. PK grubunda sadece osteotomi yapıldı. Grandus B-One grubunda kırık hattına Grandus B-One uygulaması yapıldı. TTCP grubunda kırık hattına tetrakalsiyum fosfat uygulaması yapıldı. Cerrahi sonrası 7,14 ve 28. günlerde sağ femurlara röntgen çekildi. Cerrahi sonrası 28. gün tüm ratlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen femurlar histopatolojik incelemeye gönderildi. Ratlardan alınan intrakardiyak kanlar biyokimya analizine gönderildi.

Bulgular: PK ile karşılaştırıldığında, TTCP ve Grandus B-One gruplarında 4. haftada, kaynamanın radyolojik ($p<0,05$) ve histolojik ($p<0,05$) olarak arttığı saptanmıştır. Ancak kallus dokusunun biyomekaniksel olarak tespit yapılabilecek düzeye ulaşmadığı görülmüştür. 14 ve 28. günlerin kaynama skorlarında, Grandus B-one ve TTCP grubu PK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,008$). 28. gün yapılan TNF-a ELISA testi sonuçlarında NK grubunun PK grubuna göre ($p<0,05$) ve TTCP grubunun pozitif kontrol grubuna göre ($p<0,05$) anlamlı olduğu gösterilmiştir. IL-1B ELISA testi sonuçlarında NK grubunun Pozitif kontrol grubuna göre ($p<0,05$) ve tedavi grubunun PK grubuna göre ($p<0,05$) anlamlı olduğu gösterilmiştir. BMP-2 ELISA testi sonuçlarında NK grubunun diğer gruplara göre ($p<0,05$) anlamlı olduğu gösterilmiştir. H&E ile yapılan boyamada inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, fibrosit/fibroblast aktivitesi açısından PK, Grandus B-One ve TTCP grupları arasındaki farklılıklar istatistik incelemede anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Yeni damar oluşumu ve kondrosit/kondroblast aktivitesi açısından TTCP grubu, PK ve Grandus B-One grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$) göstermiştir. Masson's Trichrome ile yapılan boyamada fibröz doku ile kıkırdak doku oluşumu açısından PK, Grandus B-One ve TTCP grupları arasındaki farklılıklar istatistik incelemede anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda, ratların uzun kemik kırıklarında, kırık hattına lokal uygulanan TTCP ve TTCP'yi ana bileşeni olarak kullanan Grandus B-One'ın kırık iyileşmesinde anlamlı etkilerinin olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın kemik yapıştırıcılar ve sentetik kemik greftleri konusunda ortopedi ve travmatoloji alanında yeni ufuklar geliştirebileceği görüşü önem kazanmıştır.

Anahtar kelimeler: Kemik grefti, Kemik yapıştırıcısı, Kırık iyileşmesi, Tetrakalsiyum fosfat (TTCP), Biyomalzeme, Biyomühendislik

ABSTRACT

Grandus B-One Biological Repair Implant Treatment in the Experimental Fracture Defect Model in Rats

Aim: In this study, the effect of Grandus B-One, which uses TTCP, one of the calciumphosphate compounds that can fill bone defects without gaps, and has good biocompatibility, osteoconductive properties and the highest Ca/P ratio as its main component, on bone fracture fixation and fracture union will be investigated.

Material and Method: Forty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups as NK, PK, Grandus B-One and TTCP groups. No intervention was made in the NK group. In other groups, an open osteotomy model was created in the midline of the right femur under general anesthesia. Intramedullary K wire was applied to all groups with fracture models. Only osteotomy was performed in the PK group. In the Grandus B-One group, Grandus B-One was applied to the fracture line. In the TTCP group, tetracalcium phosphate was applied to the fracture line. X-rays were taken of the right femur on the 7th, 14th and 28th days after surgery. All rats were sacrificed on the 28th day after surgery. Sacrificed femurs were sent for histopathological examination. Intracardiac blood taken from rats was sent for biochemistry analysis.

Results: When compared with PK, union was found to increase radiologically ($p<0.05$) and histologically ($p<0.05$) in the TTCP and Grandus B-One groups at week 4. However, it was observed that the callus tissue could not reach the level where it could be detected biomechanically. On the fourteenth and twenty-eighth days, the union scores of the Grandus B-one and TTCP groups were found to be statistically significantly higher than the PK group ($p=0.008$). TNF- α ELISA test results performed on the 28th day showed that the NK group was significant compared to the PK group ($p<0.05$) and the TTCP group was significant compared to the positive control group ($p<0.05$). IL-1B ELISA test results showed that the NK group was significant compared to the Positive control group ($p<0.05$) and the treatment group was significant compared to the PK group ($p<0.05$). BMP-2 ELISA test results showed that the NK group was significant compared to the other groups ($p<0.05$). The differences between PK, Grandus B-One and TTCP groups in terms of inflammatory cell infiltration, edema, fibrocyte/fibroblast activity in H&E staining were statistically significant ($p<0.05$). In terms of new vessel formation and chondrocyte/chondroblast activity, TTCP group showed significant difference ($p<0.05$) compared to PK and Grandus B-One groups. The differences between PK, Grandus B-One and TTCP groups in terms of fibrous tissue and cartilage tissue formation in staining with Masson's Trichrome were statistically significant ($p<0.05$).

Conclusion: In our study, it was observed that Grandus B-One, which uses TTCP and TTCP locally applied to the fracture line as its main component, has significant effects on fracture healing in long bone fractures of rats. The opinion that this study can develop new horizons in the field of orthopedics and traumatology on bone adhesives and synthetic bone grafts has gained importance.

Key Words: Bone graft, Bone adhesive, Fracture healing, Tetracalcium phosphate (TTCP), Biomaterials, Bioengineering

1. GİRİŞ

Kemik; iskelet sisteminin en önemli yapı taşı olmakla birlikte, metabolik olarak aktif, yapısal olarak da dinamik canlı bir yapıdır (1). Kemik doku metabolik, endokrin ve hematolojik sistemlerde önemli rol oynayan, hayati önemi olan organları koruyan ve iskelet sistemine hareket kazandıran, minerallerden oluşan bağ dokudur (2,3). Kemik doku iskeleti oluşturur ve yumuşak dokulara destek sağlar. İskelet sistemindeki kasların kasılmasıyla oluşan kuvvetleri, kaldıraç sistemi oluşturarak bedensel hareketlere dönüştürür (4).

İç veya dış etmenlere bağlı kemik bütünlüğünün ve devamlılığının bozulmasına kırık denir. Kırık; kemikteki damarların, yapıların, çevresindeki dokuların hasar gördüğü bir yaralanmadır. Kırık sadece kemiğe özgü bir durum olmayıp kanama, emboli gibi sistemik komplikasyonlara da yol açabilen tüm vücudu ilgilendiren genel travmatolojik bir olaydır (5).

Kırık iyileşmesi; kendine has yara onarımı ile iyileşen, karmaşık ama iyi organize edilen bir dizi hücrel ve moleküler olayları içerir (6). Kemik fibröz skar dokusu oluşturmada iyileşebilen birkaç dokudan biridir. Kırık iyileşmesi direkt veya dolaylı yolla oluşabilmektedir (7).

Kemik kırıkları, travmatik nedenlerle hastane yatışlarının en sık nedenidir (5,8). Bu kırıklar; özellikle yüksekten düşmeler, trafik kazaları gibi yüksek enerjili travmalar nedeniyle oluşur (8). Kırık oranını arttıran önemli faktörler de ileri yaş ve osteoporozdur. Bu faktörler çalışan ileri yaş nüfus da kemik kırıklarının yaygın olmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla bu gruptaki kırık tedavileri hem maliyet hem de verimlilik kaybına sebebiyet vermektedir. Bu hastaların kırık tedavilerinde yükselen maliyeti; kırık kaynama süresi ve rehabilitasyon süresi de önemli miktarda artırmaktadır (9).

Kalsiyum fosfatlar ortopedide potansiyel klinik uygulamaları olan yeni nesil kemik greftleri arasındadır. Kalsiyum fosfatlar biyouyumlulukları, osseointegrasyon ve osteokodüktif özellikleri nedeniyle kemik onarımı için ortopedi alanında yaygın

kullanılan malzemelerdir. Kalsiyum fosfat çimentolar kemik defektlerini boşluksuz doldurabilen yüksek modelleme kapasitesine sahiptir (10–12).

Kalsiyum fosfatlar, osteogenez için gerekli kalsiyum ve fosfor iyonlarını serbest bırakarak kemik iyileşmesinde görev alacak proteinleri salgılayan hücreleri uyarır ve mineralize dokuların yenilenmesine yardımcı olur (10). Hayvan çalışmaları kalsiyum fosfatın % 95'inin 26-86 haftada emildiğini göstermiştir. Emilebilir kemik dolgusu olarak kullanılabilir (13).

Bu çalışma ile kemik defektlerini boşluksuz doldurabilen yüksek modelleme kapasitesine, iyi biyouyumluğa, osteokondüktif özelliklere ve en yüksek Ca/P oranına sahip olan kalsiyumfosfat bileşiklerden Tetrakalsiyum Fosfat'ı ana bileşeni olarak kullanan Grandus B-One'ın kemik kırık tespiti ve kırık kaynaması üzerine etkisi araştırılacaktır.

Bu sayede ortaya çıkacak sonuçlar ile ameliyat sürelerinin kısılması, kemik kaynama sürelerinin kısılması, tekrar operasyonların azalması, hasta iş gücü kaybının azalması ve totalde hasta başı maliyetin azaltılması ile ekonomiye katkı sağlamak amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deneysel Cerrahinin Tarihi Gelişimi

İnsan, var olduğu zamandan başlayarak sürekli olarak doğayı anlamaya, insanı anlamaya, insanın doğadaki yerini anlamaya çalışmıştır. Devam eden bu süreç içerisinde hastalıklar ve hastalıkların tedavileri anlamlandırılmaya ve geliştirilmeye çalışılmıştır. Bunun için de gözlemsel çalışmalar ve deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmuştur. Bu deneysel çalışmalarda deney hayvanlarının çok önemli yerleri vardır (14).

Bilimsel kayıtlarda deneysel hayvan kullanımının tarihi MÖ. 400 yıllarına kadar dayanır ve ilk tıp el kitabı Corpus hippocraticum (Hipokrat'ın Toplu Yapıtları) kitabında hayvanların deneysel amaçlı kullanıldığı belirtilmektedir. Corpus hippocraticum anatomik yapıyı aydınlatmaya yönelik hayvanlar üzerinde yapılan incelemeleri içeren kitaptır. Aristoteles (MÖ 384-322), hayvan davranışlarını gözlemleyen tarihte bilinen ilk kişidir ve yine hayvanlarda bilimsel amaçlı diseksiyon yaptığı bilinmektedir (14,15).

Tarihte ilk olarak 1970 de Jackson ve arkadaşları tarafından ratlar üzerinde kapalı kırık oluşturulmuştur. 1984 yılında Bonnarens ve Einborn, Jackson ve arkadaşları tarafından oluşturulmuş model üzerinden kırık modeli tanımlamışlardır (16,17).

Kırık iyileşmesini ve kırık iyileşme sürecini incelemek için yapılan çalışmaların çoğunda rat ve fare modelleri kullanılmaktadır. Ratların kullanılmasının bir sebebi de ratlarda iyileşmenin daha çabuk olması ve kolay üretilebilir olmasıdır (18,19).

Tarih boyunca farklı türdeki hayvanlar üzerinde birçok çalışma süregelmıştır. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar bir takım kuralları da beraberinde gerektirmiştir. Hayvan deneylerinde etik kavramının da çok önemli yeri vardır.

Deneysel hayvan çalışmaları için dünya çapında ve ülkemizde etik kurullar ve kurallar mevcuttur (14).

2.2. Kemik Doku ve Yapısı

Kemik, iskelet sisteminin en önemli yapı taşı olmakla birlikte, metabolik olarak aktif, yapısal olarak da dinamik canlı bir yapıdır (1). Kemik doku metabolik, endokrin ve hematolojik sistemlerde önemli rol oynayan, hayati önemi olan organları koruyan ve iskelet sistemine hareket kazandıran, minerallerden oluşan bağ dokudur (2,3).

Kemik doku iskeleti oluşturur ve yumuşak dokulara destek sağlar. İskelet sistemindeki kasların kasılmasıyla oluşan kuvvetleri, kaldıraç sistemi oluşturarak bedensel hareketlere dönüştürür (4).

Kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğini barındırır ve kan hücrelerinin oluşumuna aktif katılım sağlar. Vücuttaki hemostazı (iç dengeyi) korur. Kalsiyum, fosfat ve diğer iyonlar gibi minerallerin depolanmasını sağlar. İyonların vücuttaki düzeylerini sabit tutabilmek için kontrollü salınmalarını sağlar ve kan Ph'ını düzenler (4).

Kemik doku mikroskopik olarak lameller (ikincil kemik dokusu) veya örgü (woven, birincil kemik dokusu) kemik olarak 2 tipe ayrılır. Lameller kemik; kortikal ve kansellöz olarak alt tiplere ayrılır. Örgü kemik ise immatür veya patolojik kemik olarak alt tiplere ayrılır (20).

Erişkin iskelet sisteminde kemik tipleri makroskopik olarak kortikal (kompakt) ve trabeküler (spongioz, süngerimsi, kansellöz) olarak ikiye ayrılır (1). Kortikal ve trabeküler kemik yapıları iskelet sisteminin temel mekanik işlevlerini yerine getirmesine olanak sağlar (21). Kortikal kemik iskeletin %80'ini oluşturur (22). Kortikal kemik serttir, güçlüdür ve yapısı stres çizgileri boyunca oluşur. Yüksek elastik young modülüsüne (elastikiyet katsayısı) sahiptir yani zorlanmalara, yüklenmelere yavaş tepki verir. Kansellöz kemiğe göre yavaş hücre döngüsü ile karakterizedir (21). Havers veya volkman kanalları ile bağlı arteriyoller, venler ve

lenfatiklerden oluşan dolaşım sistemleri vardır. Kortikal kemiğe örnek olarak femur shaftı gösterilebilir (20).

Kansellöz kemik, süngerimsi kemik veya trabeküler kemik olarak da bilinir. Kansellöz kemik kortikal kemikten daha elastiktir. Kortikal kemiğe göre yüksek kemik döngüsüne sahiptir. Kortikal kemiğe göre daha esnektir ve stres altındaki bölgede daha fazla yeniden şekillenme (Wolff Kanunu) ile karakterizedir. Wolff Kanunu; kemiklerin maruz kaldıkları yüklenmelere, streslere, kuvvetlere göre değişerek daha kuvvetli dirençli olmasını sağlayan adaptasyon mekanizmasıdır. Kansellöz kemik birim hacim başına daha geniş yüzey alanına sahiptir. Kansellöz kemiğe örnek olarak femur distal metafizer bölge gösterilebilir (23,24).

İmmatür kemik stres odaklı değildir. Örnek olarak embriyo iskeleti, kırık kallusu gösterilebilir (25). Patolojik kemik zayıftır. Patolojik kemiğin organizasyonu yani yapısı gelişigüze ve artmış hücre döngüsüne sahiptir. Örnek olarak osteojenik sarkom, fibröz displazi gösterilebilir (26).

2.3. Kemiğin Hücresel Biyolojisi

2.3.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik döşeyen hücreler olarak tanımlanır. Osteoblastlar farklılaşmamış mezenşimal kök hücrelerden köken alan tek çekirdekli hücrelerdir. Osteoblastlar iskelet mimarisini oluşturmak ve sürdürmekten sorumludur. Kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında kemik sentezi ve mineralizasyonundan da sorumludur. Osteoklastik aktivite düzenlenmesi de osteoblastların başlıca görevleri arasındadır (27). Aktif olarak sentez yapabilen ve matrix salgılayabilen osteoblastlar diğer hücrelere kıyasla büyük golgi kompleksine, bol miktarda granüler endoplazmik retikulum ve yüksek mitokondriyal içeriğe sahiptirler (28).

Kemik morfojenik protein (BMP) mezenşimal hücreleri stimüle ederek osteoprogenitör hücrelere dönüştürür. Osteoblast farklılaşmasında RUNX2, Wnt sinyalleri, B-catenin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve insülin benzeri

büyüme faktörü (İGF) de rol oynar (29,30). Osteoblast farklılaşması, vücuda gerekli desteği ve yeterli kemik oluşumunu sağlamak için fiziksel uyaranlarla da düzenlenir (31).

Osteoblastlar; alkalen fosfataz (ALP), osteokalsin, tip 1 kollajen, kemik sialoproteini, nükleer faktör (NF) kappa bligandının resptör aktivatörü (RANKL) ve osteoprotogerin (OPG) üretirler. Osteoprotegerin, aktivitesini sınırlandırmak için RANKL'ı bağlar (31,32).

Osteoblast aktivitesi, aralıklı paratiroid hormona (PTH) maruziyet ile stimüle olur. Osteoblast aktivitesi tümör nekrozis faktör alfa (TNF-a) tarafından inhibe edilir. Osteoblastlara toksik bazı antiseptikler hidrojen peroksit, povidin-iyodin, basitrasindir (20,31).

2.3.2. Osteositler

Osteositler, olgun kemikteki tüm kemik hücrelerinin %90 ila %95'ini oluştururlar. Mineralize ortamlarda yaşayabilen en uzun ömürlü kemik hücresidir. Osteositler, osteoblast farklılaşması sonucu mezenkimal kök hücrelerden oluşur. Hücre dışı kalsiyum ve fosfat konsantrasyonunun kontrolünde önemli yeri vardır. Kalsitonin tarafından direkt olarak uyarılır, PTH tarafından inhibe edilirler (33,34).

Osteositler, kemiğe yıkım sinyalleri göndererek osteoklastların oluşumunu ve aktivasyonunu uyarır ve yeniden şekillenme bölgelerine osteoklastları toplayabilirler (33).

Osteositlerden salgılanan siklerostin, olgun osteositin bir belirtecidir. Sklerostin, osteoblastların kemik depozisyonu üzerinden kemik oluşumunun negatif düzenlenmesini sağlar. Mekanik yüklenmeye bağlı olarak farklı şekilde düzenlenir (33).

2.3.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar hematopoetik hücrelerden köken alırlar. Çok çekirdekli düzensiz dev hücrelerdir. Makrofaj soyundaki hücrelerden türerler. Osteoklast fonksiyonları arasında kemik rezorpsiyonu, tartarata dirençli asit fosfataz (TRAB) sentezi ve kemik yüzeylerine hücre bağlayıcı proteinler ile bağlanma vardır. Tartarata dirençli asit fosfataz osteoklastların belirteç enzimidir (35). Osteoklastlar, kemik rezorpsiyonu sonrası oluşan 'Howship Lakünası' adı verilen çukurlarda bulunurlar (36).

Osteoblastlar tarafından RANKL salgırlar. RANKL, osteoklastlar üzerindeki reseptörlere bağlanır ve olgun osteoklastlara farklılaşmayı aktive eder. Olgun osteoklastlar kemik rezorpsiyonunu arttırlar. Kemik rezorpsiyonu RANKL'a bağlanan osteoprotegerin tarafından inhibe edilir. Kemik kütlesi kaybı, osteoklast farklılaşmasının indüksiyonu, aktivasyonu ve hayatta kalmasının ana düzenleyici sistemi olan RANK-RANKL-OPG sistemine bağlıdır (37).

2.3.4. Osteoprogenitör (kemik öncüsü) Hücreler

Mezenşimal kök hücrelerden köken alır. Düşük gerilim ve artmış oksijen stresi koşullarında osteoblastlara dönüşürler. Yüksek gerilim koşullarında fibröz dokuya dönüşürler. Haversiyan kanalları, endosteum ve periosteumda sıralanırlar. Farklılaşmak için uyarı beklerler (38).

2.4. Kemik Matriks

Kemik matriksi organik ve inorganik bileşenlerden oluşur.

Organik bileşen kemik kuru ağırlığının %40'ını oluşturur. Kollajen organik bileşenin en bol bulunan bileşenidir. Tip I, III ve V kemik yapısında bulunan kollajen tipleridir. Tip 1 kollajen, kemik dokudaki toplam kollajenin %90'ını oluşturur. Kollajen kemik gücünü belirlemede önemli rol oynar. Çapraz bağlanma kollajen gücünü artırır. Organik bileşen içerisinde kollajen yapıda olmayan proteinler de

bulunur. Proteoglikanlar glikozominoglikan (GAG) kalıntılarıyla karakterize edilir (39).

İnorganik bileşen kemik kuru ağırlığının %60'ini oluşturur. Hidroksiapatit (HA) kemiğin ana inorganik bileşenidir. Kemik yapıdaki inorganik bileşenlerden biri de kalsiyum fosfattır (39).

2.5. Kemiğin Yeniden Şekillenmesi (Remodelizasyon)

Kemik doku, hayat boyunca sürekli eski kemiğin yeni doku ile değiştiği karmaşık süreçlere sahip metabolik aktif bir yapıdır. Böylece kemik doku yük ve zorlanmalara uyum sağlar. Kemik dokunun yeniden şekillenmesi, osteoklastlar tarafından kemiğin çıkartılması ve ardından osteoblastlar aracılığıyla mineralize kemik matriksinin oluşması şeklindedir. Yeniden şekillenme birbirini takip eden 3 aşamadan oluşur. İlk aşama osteoklastlar tarafından kemiğin rezorbsiyonudur. İkinci aşamada kemik yüzeyinde mononükleer hücreler görülmesiyle yıkımın tersine dönmeye başlar. Üçüncü ve son aşamada ise osteoblastlar yıkılan kemiği tamamen yenileyene kadar kemik yapımı olur.

Wolff kanununa göre yeniden şekillenme mekanik strese cevap olarak meydana gelir. Kemiğin yeniden şekillenmesi ve düzenlenmesi hormonlar, mekanik yükler, zorlanmalar, sitokinler ve birçok protein tarafından düzenlenmektedir (40,41).

2.6. Kemik Kan Dolaşımı

Kemik, kanlanma açısından zengin bir bağ dokudur. Kemik doku toplam kalp debisinin yaklaşık olarak %10'unu alır (42). Kemik için vasküler beslenme çok önemlidir. Vasküler teminde azalma olması kemik kaybıyla ilişkilidir (43,44). Uzun kemikler kanı üç sistemden almaktadır. Bu sistemler besleyici arter sistemi, metafizyel-epifizyal sistem, periosteal sistemlerdir (43,45).

I. Besleyici Arter Sistemi

Besleyici arter sistemi doğrudan ana sistemik arterlerden ayrılır. Daha sonra uzun kemik besin kanalından (nutrisyonel foramen) diafizel kortekse girerler. Medüller kanalın uzun eksenine paralel olarak inen ve çıkan dallara ayrılarak merkezi arterleri oluştururlar. Bu oluşan merkezi arterler endosteal kortikal kemiğe ulaşarak arteriyolları ve kılcal damarları oluştururlar. Bu arteriyollar sonrasında merkezi vene boşalmak için medullada bulunan venöz sinüslere bağlanırlar. Ayrıca kılcal damarlar venöz sinüslere boşalmadan önce haversiyan sistem yoluyla olgun diyafizyal kortikal kemiğin en az üçte ikilik iç bölümünü beslerler. Besleyici arter sisteminin kan basıncı yüksektir. Kortikal kemiğin vaskülarizasyonunun %60'ı besleyici arterlerden olur (20,46,47).

II. Metafizyal-Epifizyal Sistem

Epifizyal ve metafizyal arterler sayısızdır ve epifizyal plağın her iki kenarından uzun kemiklere girerler. Esas olarak eklemi besleyen arterlerden yani genikulat vasküler arterlerden köken alırlar. Büyüme plağı, yetişkin çağa kadar sistemler arasında bariyer görevi görür. Örnek olarak genikulat arterler verilebilir (47).

III. Periosteal Sistem

Periosteal sistem periostun derin tabakasında dallanan kılcal damar ağıdır. Periosteal sistemin patolojik durumlar için kompensatuar sistem olduğu düşünülmektedir. Bu sistem korteksin 1/3 dış kısmını beslediği gösterilmiştir (47).

Kemikte kan akımını sağlayan itici kuvvetin çoğu kalp tarafından sağlanır ancak kemik etrafındaki kasların kasılması ve kemik üzerindeki mekanik kuvvetin de kan akımında önemli işlevi vardır (48).

Olgun kemikte kortikal kemiğin beslenmesi besleyici arteriyal sistemin baskın oluşundan dolayı akım merkezden perifer (sentrifugal) doğrudur. Yaşlı, olgunlaşmamış ve kırığa bağlı besleyici arter sistemi hasarı olan kemiklerde periosteal

sistem daha baskın olduğu için akım periferden merkeze (sentipedal) doğrudur (48,49).

Venöz akım olgun kemikte sentripedaldır. Kortikal kılcal damarlar özel venöz sisteme drene olan venöz sinüzoidlere boşalırlar. Kemiği terk eden damarlar genelde kas dokular içinden geçerler. Bu kasların kasılıp gevşemesi venöz akıma destek olur ve kanı kemikten kalbe doğru uzaklaştırarak intrameduller basıncı azaltırlar (20,48).

2.7. Kemiği Çevreleyen Dokular

I. Periosteum

Periosteum, eklem yüzeyini kaplayan kırkırdak, tendon, kasların yapışma yerleri ve sesamoid kemikler hariç kemiklerin yüzeylerine yapışıktır. Kemiğin büyüme gelişmesi sırasında kemiğin uzamasına ve şekillenmesine katkıda bulunur. Kemiğin beslenmesi, büyümesi ve onarımı için periost önemlidir. Periosteum, iki tabakadan oluşmaktadır. Dış tabaka ve iç tabaka olarak adlandırılır (50).

Dış tabaka fibröz olarak adlandırılır. Hücre bakımından fakirdir. Yüksek düzeyde vaskülarizedir. Kemik dolaşımına hatta iskelet kasının kan dolaşımına katkıda bulunur (50).

İç tabaka kambiyum tabaka olarak adlandırılır. Oldukça hücresel bir yapıdır. Mezenkimal progenitör hücreler, farklılaşmamış osteojenik progenitör hücreler, osteoblastlar ve fibroblastlardan oluşur. Bu hücreler büyüme aşamasında kemiğin çapını artırır ve kırık iyileşmesinde periosteal kallus oluştururlar. Kambiyum fetusta en kalındır ve yaş arttıkça giderek incelir (50).

II. Endosteum

Kemik iliği boşluğunun iç duvarını kaplayan zardır. Endosteum kemiğin tüm iç boşluklarını kaplar. Osteoprogenitör hücreler ve az miktarda bağ dokusundan oluşur (51).

III. Kemik İliği

Kemik iliği hematopoetik bir organdır ve lenfoid dokudur. Uzun kemiklerin merkezlerindeki kemik boşluklarında iki tür kemik iliği bulunur. Bunlar kırmızı kemik iliği ve sarı kemik iliğidir. Asıl hematopoetik sistem kırmızı kemik iliğindedir. Kırmızı kemik iliği yavaş bir şekilde sarı kemik iliğine dönüşür. Sarı kemik iliği asıl olarak yağ hücrelerinden oluşur (52).

2.8. Kemik Oluşum Tipleri

Kemik iki yolla oluşur. Bunlar intramembranöz kemikleşme ve enkondral kemikleşmedir.

Her iki yolla da oluşan kemik doku primer ya da olgunlaşmamış kemik dokusudur. Primer kemik dokusu geçicidir ve kısa süre sonra yerini sekonder (lamelli kemik) kemik dokusu alır.

I. Enkondral Kemikleşme

Enkondral kemikleşme kıkırdak model oluşumu ile karakterizedir. Enkondral kemikleşme fetal gelişim ve doğum sonrası büyüme sırasında kıkırdak modelin kademeli olarak kemik ile yer değiştirildiği bir süreçtir. Kıkırdak model kemik oluşumu için stabil bir şablon görevi görür ve uzunlamasına kemik büyümesine katkıda bulunur (53).

Enkondral kemikleşme sırasında öncelikle kıkırdak model oluşur. Sonraki aşamada çoğalan kondrositler hipertrofiye olur ve ölürler. Oluşan hücre dışı matriksi ve genişlemiş lakünalar kan damarları, osteoprogenitör hücreler, osteoklastlar ve osteoblastlar tarafından işgal edilir. Osteoklastlar kıkırdağı rezorbe ederler. Osteoblastlar kemiği oluşturur. Birincil kemikleşme merkezi kıkırdak modelin merkezinde oluşur. İkincil kemikleşme merkezleri de kıkırdak modelin her iki ucunda oluşur. Bu kemikleşme merkezleri yavaş yavaş kalan kıkırdağı işgal eder ve olgun kemik tamamen kıkırdağın yerini alır. Enkondral kemikleşme örnekleri arasında uzun

kemiklerin embriyonik oluşumu, uzunlamasına büyüme (fizis), kırık kallusu sayılabilir (53,54).

II. İntramembranöz Kemikleşme

Mezenkimal doku kıkırdak model olmadan doğrudan kemiğe dönüşür. Mezenşimal hücreler osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar kümeler halinde toplanır ve kemikleşme merkezlerini oluştururlar. Osteoblastlar kalsiyumu bağlayabilen osteoid matriks salgırlar. Kalsiyum osteoidlere bağlandıkça matriks sertleşir ve osteoblastlar sıkışır osteosite dönüşür. Osteoblastlar osteoid tarafından salgılanmaya devam ettikçe damarları çevreleyerek kemik oluşur. Bu damarlar daha sonra kırmızı kemik iliğine dönüşür (54). Bu tür kemikleşme yassı kafa kemiklerinde görülür.

2.9. Kemik Doku Mineralizasyon Mekanizması

Belli seviyede serum kalsiyum, serum inorganik fosfat seviyesi ve mineralizasyon iskelesi kollajen açısından zengin matriks, mineralizasyon için olması gereken bileşenlerdir. Aklalin fosfataz (ALP) inorganik fosfat oranını artırır ve mineralizasyona yardımcı olur. ALP, mineralizasyon inhibitörü olan hücre dışı pirofosfat oranını da düşürerek mineralizasyona yardım eder. Mineralizasyonun ilk adımı kondrositlerin, osteoblastların yüzey zarından tomurcuklanan matriks veziküllerinde hidroksiapatit kristallerini üretimidir. Sonraki aşamada hidroksiapatit hücre dışı matrikse yayılır ve kollajen fibrilleri arasında birikir. Biriken kristaller yeni kristaller için çekirdek görevi görür ve mineralizasyon devam eder (55,56).

2.10. Normal Kemik Metabolizması

I. Kalsiyum

Vücuttaki kalsiyumun çok büyük kısmı kemiklerde depolanır. Kalsiyumun kas kasılması, sinir iletimi, pıhtılaşma, hormon salgı aktivasyonu ve diğer birçok alanda yaşam için kritik önemi vardır. Kemik organik matriksinin mekanik direncinde önemli rolü olan hidroksiapatitin yapısında bulunan iki bileşenden biridir. Kalsiyum ve

fosfatın kemik yapan ve kemik yıkan hücreler üzerinde etkileri vardır. Emilimi 1.25 (OH)₂-vitamin D₃ ile düzenlenir. Kalsiyum dengesi hayatın ilk 30 yılında genellikle pozitifdir ve ortalama 40. yılından sonra negatifdir (57).

II. Fosfat

Vücudun fosfat depolarının yaklaşık %80'i kemikte bulunur. Kemik organik matriksinin mekanik direncinde önemli rolü olan hidroksiapatitin yapısında bulunan iki bileşenden biridir. Kalsiyum ve fosfatın kemik yapan ve kemik yıkan hücreler üzerinde etkileri vardır (58).

III. Paratiroid Hormonu

PTH plazma kalsiyum seviyesinin en önemli düzenleyicisidir. Serum kalsiyum seviyesinin normal değerin altına inmesi durumunda bağırsaklar, böbrekler ve kemiklerde etki yapan PTH salınımı ve aktivitesi artar. PTH normal ve yüksek dozda kemikte yıkıma sebep olurken, düşük dozda kemiklerde yapıma neden olmaktadır. PTH osteoblastları direkt olarak aktive eder (59).

IV. D Vitamini

Doğal olarak oluşan bir steroidtir. Serum kalsiyum ve fosfor seviyesini yükselten bir hormondur. PTH seviyesinin yüksek olması ve serum kalsiyum seviyesinin düşük olması D vitamini üretimini uyarır. PTH seviyesinin azalması ve serum kalsiyumunun yükselmesi D vitamininin üretimini inhibe eder. Kemiklerde osteoklastik kemik yıkımını etkili şekilde uyararak kemikten kalsiyum çözünümünü artırır (60).

V. Kalsitonin

Tiroid bezinden salgılanan bir hormondur. Artmış serum kalsiyum değerleri kalsitonin salgılanmasını uyarır. Osteoklastik kemik yıkımını, osteoklast sayısını ve

aktivitesini azaltarak doğrudan inhibe eder. Böbrekler tarafından kalsiyumun atılımını arttırarak kalsiyum dengesine katkıda bulunur (61).

VI. Östrojen

Östrojen hem kadın hem erkekte kemik metabolizmasının ana düzenleyicisidir. Östrojenin osteosit ve osteoblast üzerindeki etkileri apoptozisi ve oksidatif stresi azaltmaktır. Östrojenin osteoklast üzerine doğrudan veya dolaylı etkisi osteoklastların sayılarını ve aktivitelerini azaltmaktır (61).

VII. Kortikosteroidler

Glukokortikoidler osteoblast apoptozunu arttırırlar. Osteoblastların kemik oluşturma yeteneklerini azaltırlar. Osteoblastogenezis ve osteoklastogenezisi baskırlar. Ancak osteoklastların apoptozisini arttırmazlar ve osteoklast sağkalımını uzatabilirler. Glukokortikoidler kemik yapımında azalmaya, kemik yıkımında artışa neden olurlar (62).

III. Tiroid Hormonları

Normal tiroid fonksiyonu iskelet gelişimi, yetişkin kemik kütlesi, kuvvetin korunması ve kemik sağlığı için gereklidir. Tiroid hormonu osteoklastik kemik yıkımını arttırarak kemik döngüsünü uyarır. Özellikle yetişkinlerde kemik yapımından çok kemik yıkımını uyarır (63).

IX. Büyüme Hormonu

Büyüme hormonu (GH) doğrudan veya IGF üzerinde dolaylı olarak osteoblastları uyararak kemik yapımını arttırır. Osteoklastları da uyararak kemik yıkımını uyarır. Kemiğin yeniden şekillenmesinde ve kemik mineral yoğunluğunda artışa neden olur (64).

X. Büyüme Faktörleri

TGF, PDGF, BMP, FGF, IGF, VEGF, monokinler ve lenfokinler; kemik ve kıkırdak onarımında rol oynar (65).

2.11. Kırık Mekanizması

İç veya dış etmenlere bağlı kemik bütünlüğünün ve devamlılığının bozulmasına kırık denir. Kırık; kemikteki damarların, yapıların, çevresindeki dokuların hasar gördüğü bir yaralanmadır. Kırık sadece kemiğe özgü bir durum olmayıp kanama, emboli gibi sistemik komplikasyonlara da yol açabilen tüm vücudu ilgilendiren genel travmatolojik bir olaydır (5).

Kemik kırıklarında çeşitli yüklenme mekanizmaları mevcuttur. Yüklenme mekanizmaları gerilme, kompresyon (sıkışma), bükülme, makaslama, dönme ve kombine yüklenme dönme-kompresyon olarak kırık oluş mekanizmasına göre isimlendirilir. Kopma gerilme mekanizması ile oluşan kırık, kemiklere yapışan tendon ve bağların gerilmesiyle oluşur. Kompresyon mekanizması ile oluşan kırıklar zıt yönde gelen kuvvetlerle oluşan kırıklardır. Kompresyon kırıkları metafizer bölgelerde daha çok görülür. Bükülme mekanizmasında kırığı oluşturan kuvvetler kemiğin her iki ucuna etki eder ve genelde transvers kırık paterni oluşur. Makaslama mekanizmasında kuvvetler birbirine paralel ve karşı yönde etki ederek kırık oluşur. Dönme mekanizması ile oluşan kırıklar genelde spiral kırık paternine sahiptir. Kombine mekanizmalar ile oluşan kırıklar genellikle çok parçalı kırık paternine sahiptir ve bu paternde yumuşak doku çok etkilenir (66).

2.12. Kırık İyileşmesi

Kırık iyileşmesi; kendine has yara onarımı ile iyileşen, karmaşık ama iyi organize edilen bir dizi hücresel ve moleküler olayları içerir (6). Kemik fibröz skar dokusu oluşturmada iyileşebilen birkaç dokudan biridir. Kırık iyileşmesi direkt veya dolaylı yolla oluşabilmektedir (7).

2.12.1. Direkt Kırık İyileşmesi

Doğrudan kemik iyileşmesi genellikle anatomik redüksiyon ve tam stabil tespit gerektirmektedir. Bunun için de genellikle açık redüksiyon ve internal tespit gerektirmektedir. Bundan dolayı en yaygın yol dolaylı kemik iyileşmesidir. Doğrudan kemik iyileşmesinde kallus dokusu oluşmaz. Doğrudan kemik iyileşmesi; anatomik lameller kemiğin, havers sisteminin ve damarlarının yeniden modellenme aşamaları olmadan yeniden oluşmasını sağlar (7).

2.12.2. Dolaylı Kırık İyileşmesi

İkincil kemik iyileşmesi veya dolaylı kemik iyileşmesi genel olarak daha sık karşılaşılan kemik iyileşmesidir. Hem enkodral hem de intramembranöz kemik iyileşmesinden oluşur. Tam stabil tespit gerektirmez. Operatif olmayan kırık tedavisi, intramedüller çivi tedavisi, external fiksasyon gibi tedavilerde ve mikro harekete izin veren operatif tedavilerde dolaylı kırık iyileşmesi görülür (7).

Dolaylı kırık iyileşmesi birbirinin içerisine geçmiş temel olarak 3 ana fazdan oluşur (67).

- I. Kırık hematomu ve organizasyonu (inflamatuvar) dönemi
- II. Onarım (kallus) dönemi
- III. Yeniden şekillenme (remodeling) dönemi

I. Kırık hematomu ve Organizasyonu (İnflamatuvar) Dönemi:1-4 gün

Kemiğin kırılması ile kemik dokusunun kendisinde ve çevredeki dokularda damar hasarı oluşmaktadır. Bu hasar sonucu bölgede hematoma oluşur. Hematomdan bağışıklık hücreleri sızar ve akut inflamasyonu uyarır. Hematom içindeki koagülasyon sonucunda oluşan fibrin ağı; trombosit kaynaklı faktörler, nekrotik hücrelerden salınan faktörler ve yerel doku makrofajlarından salınan inflamatuvar hücreler için matriks görevi görür. İlk 24 saat içinde bölgeye ilk ulaşan hücreler nötrofillerdir. Nötrofiller; inflamatuvar ve kemotaktik ajanlar salgılayarak hücre infiltrasyonunun ikinci dalgasını

yani monosit ve makrofajları kırık bölgesine yönlendirir. Makrofajlar geçici fibrin matriksini ve nekroze hücreleri fagositoz yoluyla ortamdan uzaklaştırır. Monosit türevli osteoklastlar nekroze kemiklerin yıkımını sağlar. Makrofajlar hücre ve hücre dışı matriksi temizlemenin yanında TNF-a, IL-1B, IL-6 ve CCL-2 gibi fibroblastların toplanmasını başlatan inflamatuvar ve kemotaktik ajanlar salgılar (67,68). Trombosit ve makrofajlardan salgılanan inflamatuvar araçlar ve büyüme faktörleri mezenkimal kök hücrelerin (MSC) ve osteoprogenitör hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve matriks üretmesini destekler. Proinflamatuvar sitokinler ve kemokinlere ek olarak, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) ailesinin üyeleri, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) süreçteki anahtar araçlardır. Sonuç olarak ilk kırık hematomu ve akut inflamatuvar reaksiyon kırıktan itibaren birkaç gün içinde temizlenir. Bunun yerine mezenkimal hücrelerden zengin granülasyon dokusu ve organize olmayan hücre dışı kollajen matriksine gömülü yeni oluşan damar yapısı gelir (67).

II. Onarım (Kallus) Dönemi (4-40 gün)

Kırık bölgesindeki lokal kanlanmada bozulma ve arteriyollerin reaktif kasılmasından dolayı kırık bölgesi akut dönemde hipoksiktir. Düşük oksijen gerilimi makrofajlardan türetilen sinyallerle birlikte kırık hattında kondrojenik yol boyunca MSC'lerin farklılaşmasına rehberlik eder. Kondrositler kırıktan birkaç hafta sonra kırık kemik uçları arasında boşluk boyunca uzanan kırık dokusu üretirler. Eşlik eden fibrotik dokularla birlikte yumuşak kallus dokusu olarak bilinen kırık dokusu, kırık için ilk mekanik stabiliteyi sağlar ve endokondral kemik oluşumu için iskele görevini görür. Yumuşak kallus dokusu oluşurken, daha iyi beslemesi ve daha iyi mekanik stabilitesi olan alanlarda, yeni kemik oluşumu intramembranöz yoldan ilerler. Tipik olarak bu intramembranöz kemik oluşumu, yaralanma bölgesinden belirli bir mesafede periostun iç tabakasında başlar ve aşamalı olarak kırık aralığına doğru ilerler. Nihai olarak örgü (woven) kemik doku, ek mekanik stabilite sağlayan ve fibrokartilaj iskelesinin mineralizasyonundaki ilk aşamalarını temsil eden fibrokartilajlı kallusun dış yüzeyini kaplar. Bir büyüme plakasının işlevine benzeyen bu süreçte, yumuşak kallus dokusu içerisindeki kondrositler hipertrofiye ve apoptoza giderler. Kalsiyum

ökmesini ve vasküler büyümei uyaran araçları salgırlar. Sonuçta kısmen kalsifiye kırıkda hücre dışı matrisini oluşturlar. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması, kırıkda iskele üzerine örgü kemik dokunun birikmesi ve kırık bölgesinde kan akımı artışı görölür. Kırık iyileşmesinin bu aşaması sert kallus oluşumu olarak bilinir. Kırıkda mineralizasyonu ilerledikçe kırık bölgesindeki mekanik stabilite, kemiğin fizyolojik yükleri bağımsız olarak taşınması için yeterli stabilite sağlanana kadar artar. Son olarak, hem olgunlaşmamış örgü kemik hem de alttaki kırıkda matriks osteoklastlar tarafından uzaklaştırılır ve kemiğe uygulanan mekanik streslere dayalı olarak tipik yeniden oluşturulan osteon yapısını ve Havers sistemini en sonunda yeniden şekillenme sürecini başlatır (67).

III. Yeniden Şekillenme (Remodeling) Dönemi

Kırık iyileşmesi sürecini tamamlayarak kemiğin normal formunu ve bütünlüğünü geri kazanması olarak tanımlanabilir. Yeniden şekillenme süreci birkaç ay veya birkaç yıl sürebilen en uzun dönemdir. Örgü kemiğin lamellar kemiğe dönüştüğü evredir. Bu dönüşüm osteoblast ve osteoklast fonksiyonu arasındaki denge ile sağlanır. Osteoklastların etkisiyle sert kallus yıkılırken, osteoblastların etkisiyle yeni lamellar kemik oluşur. Osteoblast, osteoklast arasındaki denge MSC'ler, TNF-a, makrofajlar ve IL-17 gibi sitokinler tarafından kontrol edilir. MSC'lerden osteoblast oluşumu TGF- β ailesi üyeleri, BMP'ler ve IGF gibi çeşitli büyüme faktörlerinden etkilenir. MSC'lerin osteoprotegerin(OPG) üretimi, monositlerin osteoklastlara farklılaşmasını engeller. Buna karşılık osteoblastlardan salgılanan RANKL ve M-CSF, osteoklastların sağkalımını ve işlevini artırır. Makrofajlar, osteoblast aktivitesinin artmasıyla ve osteoklastların progenitörleri olarak kemik oluşturma/rezorpsiyon dengesini korurlar. Genel olarak belirli hücreler ve araçlar kemiğin yeniden şekillenmesini sıkı şekilde kontrol ederler (69).

Anatomik, biyomekanik ve biyokimyasal süreçlerin iyi yönetilmesi kemikte kaliteli iyileşme için gereklidir. Yeterli kan temini ve yeterli mekanik stabilite kemik yeniden şekillenmesinin başarılı olması için önemlidir (7).

2.13. Kırık İyileşmesinde Etkili Faktörler

I. Kırık İyileşmesinde Biyokimyasal Faktörler (65)

BMP, TGF-B, FGF, PDGF, IGF, VEGF gibi biyokimyasal faktörler kırık iyileşmesinde etkilidir.

BMP; mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasında, matriks sentezinde, hücre migrasyonunda ve kemik oluşumu aktivasyonunda etkilidir.

TGF-B; osteoblast, kondrosit, fibroblastlar üzerinde etkilidir. Matriks oluşumunu, damarlanmayı, enondral kemikleşmede kalsifikasyonu, kırık kallusunda kırık ve kemik oluşumunu kontrol eder.

FGF; mezenkimal kök hücre çoğalmasını, kırık oluşumunu, damarlanmayı, osteoblastik aktiviteyi etkiler.

PDGF; nötrofillerin, makrofajların ve öncül hücrelerin kırık bölgesine gelmesini sağlar.

IGF; kırık matrikste tip 1 kollajen üretimini, damarlanmayı, osteoprogenitör hücre çoğalmasını uyarır.

VEGF; damarlanmayı, osteoblast çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır.

II. Kırık İyileşmesinde Hormonal Faktörler

Kırık iyileşmesinde etkili hormonal faktörler; büyüme hormonu, kalsitonin, östrojen, kortikosteroidler, tiroid, paratiroid hormon ve D vitamindir.

III. Kırık İyileşmesini Etkileyen Hasta ile İlgili Faktörler

Hastanın yaşı, sigara içimi, alkol tüketimi, kontrolsüz diabeti, yetersiz beslenmesi, protein eksikliği, azalmış kas kütlesi, osteoporozu, D vitamini, kalsiyumu,

genetik polimorfizmi, menopo2 sonrası kadın olması, ek hastalık durumu kırık iyileşmesini etkiler(70).

IV. Kırık İyileşmesini Etkileyen Kırık ile İlgili Faktörler

Travmanın derecesi, yumuşak doku yaralanması, yüksek Gustilo-Anderson dereceli açık kırık, büyük parçalar arası boşluklar, kompleks veya parçalı kırıklar, biyomekanik kararsızlık, büyük kırık hematomu, enfeksiyon, uzun süreli immobilizasyon, NSAID kullanımı, kırık bölgesinin dolaşımı, kırık uçlarının birbirine göre durumu, eklem içi kırıklar kırık iyileşmesini etkileyen kırık ile ilgili faktörlerdir (70).

V. Kırık iyileşmesini Olumlu Etkileyen Faktörler (65,71)

- I. Elektrik akımı, Manyetik alan, Ultrasonografi
- II. Hiperbarik Oksijen Tedavisi
- III. Anabolik Steroidler
- IV. D-Vitamini, Kalsitonin, PTH, Büyüme hormonu
- V. Prostaglandinler, BMP, Büyüme faktörleri
- VI. Kemik Greftleri

VI. Kırık iyileşmesini Olumsuz Etkileyen Faktörler (65)

- I. Yüksek enerjili travmalar ve geniş yumuşak doku hasarı
- II. Kırık uçlarının birbirinden ayrılması, araya yumuşak doku girmesi
- III. Besleyici damarların hasar görmesi
- IV. Aşırı disseksiyon
- V. Açık kırık olması (hematomun boşalması, kontaminasyon, aşırı yumuşak doku hasarı nedeniyle)
- VI. Yetersiz tespit
- VII. Enfeksiyon
- IX. İleri yaş
- X. Eklem içi kırık olması (sinovyal sıvının kırık iyileşmesini bozucu etkisi)
- XI. Kemoterapi, Radyoterapi, Sigara (nikotin) bağımlılığı, Kortikosteroid, Alkolizm

XII. Kemikte önceden var olan patolojik durum varlığı

XIII. Beslenme ve sağlıklı metabolizmayı etkileyen her türlü sistemik hastalık
(diabet, malignite, sistemik enfeksiyon, anemi...)

XIV. İlaçlar (NSAİD, Biofosfonatlar, Aminoglikozidler, Florokinolonlar...)

2.14. Kırık İyileşmesinin Biyomekaniği

Stabilite ve kırık iyileşmesi arasında denge vardır. Stabilite gerinimi belirler. Gerinim de iyileşme tipini belirler. İki türlü stabiliteden bahsedilebilir. Göreceli stabilite; kırık bölgesinin küçük miktarda hareketine izin verir ve kallus dokusu ile iyileşme sağlanır. Mutlak stabilite de ise kırık bölgesinin nerdeyse hiç hareketine izin vermez ve kemiğin doğrudan iyileşmesine olanak sağlar, kallus oluşmaz. %2'den az gerinim varlığında primer kemik iyileşmesi olur ve endosteal iyileşme ile kemik kaynar. %2-%10 arasındaki geriniminde sekonder kemik iyileşmesi görünür ve enkondral ossifikasyon ile kemik kaynar. %10'un üzerinde gerinim olması kemik oluşumuna engel olur. Gerinim, kırık aralığı mesafesindeki değişimin kırık aralığı mesafesince bölünmesi olarak ifade edilir. En yüksek kırık gerinimi, arada boşlukla beraber fikse edilmiş basit kırıklarda görülür yani tam redükte edilmemiş tespitlerde görülür (7,20,72).

2.15. Kırık İyileşmesini Artırmak İçin Uygulanan Yöntemler (5,70)

I. Biyofiziksel stimülasyon

Elektromanyetik alan uyarımı (PEMFs)

Düşük yoğunluklu darbeli ultrason uyarımı (LIPUS)

II. Yerel olarak uygulanan biyolojik iyileştirme faktörleri

. Osteojenik materyaller

Otolog kemik

Otolog kemik iliği

. Osteokondüktif materyaller

Kalsiyum fosfatlar

Kalsiyum hidroksiapetitler

Kalsiyum sülfatlar
Kalsiyum fosfat/kollajen kompozitleri
Allojenik kemik
Demineralize kemik matrisi
Doku onarım faktörleri

III. Fibroblast büyüme faktörleri

IV. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri

V. Osteoindüktif ve morfogenetik faktörler

Kemik morfogenetik proteinleri

Wnt proteinleri

VI. Sistemik biyolojik iyileştirme faktörleri

Paratiroid hormonu

Anti-sklerostin antikorları

Anti-Dickkopf ile ilgili protein 1 antikorları

2.16. Kemik Greftleri

Genel olarak kemik greftlerinin özellikleri osteokondüktif, osteoindüktif veya osteojenik olarak sınıflandırılır.

Osteokondüktivite; materyalin, kemik oluşumu için iskele veya çerçeve görevi görebilmesidir.

Osteoindüktivite; kemik olmayan dokuya implante edilen materyalin kemik oluşturabilmesi olarak da tanımlanabilir. Yeni kemik oluşturabilme kapasitesine sahip osteoprogenitör hücrelerin çoğalmasını destekler. Örnek olarak BMP gösterilebilir.

Osteojenik; kemik oluşturabilen hücrelerden yeni kemik üretilmesi olarak tanımlanır (13).

Biyouyumluluk; kullanılan materyallerin vücutta kullanılmaya uygun olmasıdır.

Osteointegrasyon; kemiğe uygulanan implantın kemik ile bütünleşmesi yani kemiğin implantı kabul etmesi olarak tanımlanabilir. Kemik ile implant arası arayüzünde kemik kaybının çok az olmasıdır.

Kemik grefti materyalleri genel olarak otogreft, allogreft, ksenogreft, sentetik materyal veya kombinasyonlar şeklinde ayrılabilir. Otogreftler aynı kişiden alınan, aynı kişiye implante edilen greftlerdir. Allogreftler bir bireyden alınan ve aynı türden başka bir bireye implante edilen greftlerdir. Ksenogreftler bir türden alınıp başka bir türe implante edilen greftlerdir (70,73).

Greft iyileşmesi aşamaları 5 aşama olarak değerlendirilebilir. İlk aşama inflamasyon aşaması kemotaksisin nekroz ile uyarıldığı ve hematoma oluştuğu evredir. İkinci aşamada mezenkimal hücrelerin inflamasyonu, göçü, proliferasyonu ve greft içinde, çevresinde fibrovasküler doku oluşumudur. Üçüncü aşamada greft içine damarlanma oluşur. Dördüncü aşamada greft yüzeyinde lokal osteoklastik yıkım oluşur. Beşinci aşamada ise greft yüzeylerinde intramembranöz ve endokondral kemik oluşumu gelişir. Yeniden şekillenme evresi son aşamadır ve yıllarca sürer. Kemik grefti yeterli mekanik stabiliteye ulaşmıyorsa revaskülarizasyon ve hücre farklılaşması etkilenir, greft birleşmesi engellenir (20,73).

2.17. Tetrakalsiyum Fosfat

Kalsiyum fosfatlar ortopedide potansiyel klinik uygulamaları olan yeni nesil kemik greftleri arasındadır. Kalsiyum fosfatlar biyouyumlulukları, osteointegrasyon ve osteokodüktif özellikleri nedeniyle kemik onarımı için ortopedi ve travmatoloji alanında yaygın kullanılan malzemelerdir (10–12).

Kalsiyum fosfatlar, osteogenez için gerekli kalsiyum ve fosfor iyonlarını serbest bırakarak kemik iyileşmesinde görev alacak proteinleri salgılayan hücreleri uyarır ve mineralize dokuların yenilenmesine yardımcı olur (10).

Kalsiyum fosfat greftler osteokondüktiftir. Hayvan çalışmaları kalsiyum fosfatın % 95'inin 26-86 haftada emildiğini göstermiştir. Emilebilir kemik dolgusu olarak kullanılabilir. Kırık hattında sızarak ekleme, çevre dokulara zarar verebilirler (13).

Tetrakalsiyum fosfat ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$) ilk olarak 1883 yılında Hilgenstock tarafından tanımlanmıştır (74). Tetrakalsiyum fosfat (TTCP), kalsiyum fosfatlar arasında en bazik olandır ve Ca/P oranı hidroksiapatitten (HA) daha büyük olan tek kalsiyum fosfattır (11).

Hidroksiapatit ve tetrakalsiyum fosfat (TTCP) gibi kalsiyum fosfat bileşikleri seramik matriksler olarak adlandırılır. TTCP' nin olduğu grup enjekte edilebilir seramik çimentolardır. TTCP genellikle karışımların içinde kullanılmıştır. Bu karışımlarla likid macun şeklinde karıştırılıp enjekte edilebilir sementler oluşturulur. Ardından belirgin ısı artışı olmadan sertleşirler. Meydana gelen sertleşmiş materyalin kompresif güçlere dayanıklılığı kansellöz kemiklere eşdeğerdir. Oluşan sertleşmiş materyal kolay rezorbe olan kalsiyum fosfat kristalleri içerir ve osteoklastlar tarafından remodelize edilir. Klinik olarak açık ve kapalı olarak kırık sahasına ve kemik kaybı olan bölgelere uygulanabilirler (75).

Kemik grefti ogmentasyonu gerektiren uzun kemik kırıklarının tedavisinde bir kalsiyum fosfat-kollajen kompozit greftinin otojen iliak krest kemik grefti kadar etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Seviye-I kanıt) (13,76).

2.18. TNF-a, NFK B, BMP-2 ve IL-1B'nin Kemik Kırıklarındaki Yeri

IL-1 β ve TNF- α , kırık oluştuktan sonra 21. gün ila 28. gün arasındaki aralıkta başlayan yeniden şekillenme döneminde yükselir. TNF- α 'nın nükleer faktör kappa-B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörünü salgılayan kondrositlerin sayısını ve osteoklastlara farklılaşabilen CD14+ monositlerin trans-endothelial göçünü arttırdığı gösterilmiştir. Bu iki mekanizma, TNF-a'nın hem yerleşik osteoklastların kemik rezorpsiyon kapasitesini artırmasına hem de kemiğin yeniden şekillenme sürecini

teşvik etmek için belirli bir alandaki toplam osteoklast sayısını potansiyel olarak artırmasına izin verir (7,77–79).

Kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), makrofajlar tarafından salgılanan çok işlevli proteinlerdir ve kemik gelişimine ve kırıkların onarımına yardımcı olurlar. BMP'ler, yeni osteositlerin (osteoindüktif) oluşumuna yardımcı olan büyüme faktörleridir. Bu, spesifik membrana bağlı reseptörlerin aktivasyonu ile gerçekleştirilir. BMP-2, osteoindüktif olarak tanımlanır, yani kemik büyümesini ve oluşumunu indüklemeye ve artırma yeteneğine sahiptir ve ayrıca osteojenik yola doğru hücre kemotaksisini, proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekler (80,81).

TGF- β 1 ve BMP-2 plazma seviyeleri kırıklar sonrası dönemde artmaktadır. Normal kaynama görülen gruplarda TGF- β 1 seviyeleri 2. haftada zirve değerine ulaşmaktadır. Normal kaynama görülmeyen ya da kaynamama problemi olan gruplarda TGF- β 1 seviyeleri daha geç dönemde zirve değere ulaşmaktadır. Plazma BMP-2 seviyeleri normal kaynama görülen gruplarda 1. haftada zirve değere ulaşırken, kaynamama görülen gruplarda 2. haftada zirve değere ulaşmaktadır. Genel olarak, plazma TGF- β 1 veya BMP-2 seviyeleri, normal kaynama ve kaynamama grupları arasında önemli ölçüde farklı değildir (82,83).

3. MATERYAL VE METOT

Çalışma konusu belirlendikten sonra Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna (HADYEK) başvuruldu. Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (HADYEK) 31.08.2021 tarihli ve 7 sayılı oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiştir.

Sonuç olarak 201 no'lu karar ile söz konusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiştir.

Bu çalışma deneysel bir çalışma olup Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı tarafından Morfoloji binası Farmakoloji Anabilim Dalı ile birlikte Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Denekler

Deneysel çalışma Erzurum Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.08.2021 tarihli ve E-42190979-000-2100217175 sayılı izni ile yapıldı. Çalışmamızda 44 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Çalışmada kullanılan ratlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)'nden temin edilmiştir. Deneklerin sağlıklı, daha önce ilaç verilmemiş ve herhangi bir deneyde kullanılmamış olmalarına dikkat edildi.

Ortalama yaşları 9 hafta (8-10) ve ortalama ağırlıkları 375 gram (350-400) olan normal aktiviteye sahip 44 adet rat kullanıldı. Tüm ratlar işlem öncesi 14 gün boyunca 20 +/- 1 derece oda ısısı ve %50 +/- 5 rölatif hava nemi olan standart laboratuvar koşullarında 6'şarlı ve 5'erli şekilde ratlar için özel standart kafeslerde tutularak ortama alışmaları sağlandı ve sağlık durumları gözlemlendi. Laboratuvar ortamında 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü korundu. Deney süresi boyunca ratların standart pelet yeme ve taze içme suyuna ulaşması (ad libitum) sağlandı.

44 adet rat deney öncesi randomize olarak her grupta 11 adet rat olacak şekilde 4 ayrı gruba ayrıldı (Tablo 3.1).

Her grupta 11 adet rat olacak şekilde ratlar randomize ayrıldıktan sonra ratlar 6'şarlı ve 5'erli şekilde ratlar için özel standart kafeslere alındı. Kafes üstlerine grup adları yazılarak grupların karışması engellendi. İki ayrı renk kına ile her kafesteki ratlar kendi içinde ayırt edilebilmesi için farklı farklı boyandı. Örnek olarak 6'şarlı kafesteki ratlar kırmızı baş, kırmızı kuyruk, siyah baş, siyah kuyruk, çift renk ve beyaz rat olarak boyandı. Kafes içi isimlendirme yapılmış oldu (Şekil 3.1).

Tablo 3.1. Deney Gruplarının Tanıtımı

Gruplar	Grup İsimleri	İşlemler	Grup Rat Sayıları
I.	Negatif Kontrol (NK)	Sağlıklı Ratlar	11
II.	Pozitif Kontrol (PK)	Kemik defekti + K tel	11
III.	Grandus B-One Tedavi Grubu (GB)	Kemik defekti + K tel + Grandus B-One yapıştırıcı	11
IV.	Tetrakalsiyum fosfat Tedavi Grubu ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) (TTCP)	Kemik defekti + K tel + TPC	11



Şekil 3.1. Grupların Kendi İçlerinde İsimlendirilmesi

3.2. Cerrahi Prosedür

Gerekli takipler ve hazırlıklar yapıldıktan sonra ratlar cerrahi işlem amacı ile müdahale odasına alındı. Deneklere öncelikle intraperitoneal Ketamin (60 mg/kg) (Ketalar, Pfizer, Türkiye) ve Xylazine (10 mg/kg) (Rompun, Bayer, Almanya) ile anestezi yapıldı (84).

Deney hayvanlarına anestezi işlemi uygulandıktan 10 dk sonra, ağırlı uyaranla anestezi işlemi kontrol edildi. Daha sonra ratların sağ femur bölgesi genişçe tıraş edildi. Tıraş edilen bölgeler povidon iyotla dezenfekte edildi. Daha sonra ratlar steril örtülerle örtülmüş ameliyat masasına alındı. Ratlar üzeri steril örtü ile örtülmüş ayarlanabilir ısıtıcı pedlerin (Paketherm, İspanya) üzerine alındı (Şekil 3.2). Steril malzemeler ve materyallerle cerrahi işleme başlandı (Şekil 3.3). Cerrahi teknik olarak Naegau ve arkadaşları, Balkanlı ve arkadaşları ve Claes ve arkadaşları tarafından tanımlanan femoral osteotomi modeli uygulandı (84–86).



Şekil 3.2. Ayarlanabilir Isıtıcı Ped Kumandası



Şekil 3.3. Steril Cerrahi Masa ve Steril Cerrahi Aletler

Ratların sağ femur lateralinden 2 cm'lik insizyon ile cilt ve cilt altı geçildi. Femur shaftının üzerindeki fasya dokusu ve kas dokusu künt diseksiyon ile geçildi. Femur shaftının orta bölgesine ulaşıldı. Periost elevatörü yardımı ile periosteum kaldırıldı (Şekil 3.4). Femur shaftının orta bölgesine, taşınabilir diş ünitesi sistemi (Dynamic, Çin) ve 1.2 mm kalınlığında elmas frezler (Diatech, ABD) kullanılarak çift korteks transvers osteotomi yapıldı (Şekil 3.5). Bu şekilde kırık uygulaması yapılan tüm deneklerde tek tip 2 parçalı kırık oluşturuldu (Şekil 3.6). Kırık tespiti için tek ucu sivri 1.5 mm'lik 1 adet K-teli (Kirschner teli) (Aysan, Samsun, Türkiye), motor yardımı ile önce retrograd yönde ilerletilerek 'Trokhanter Majör' hizasından korteksi geçerek çıkartıldı (Şekil 3.7). Daha sonra K-teli, motor yardımı ile tutularak geri çekildi ve kırık hattında redüksiyonun sağlanmasının ardından anterograd ilerletildi (87). K teli diz ekleminde çıkarılmadan bırakıldı (Şekil 3.8).

- I. Grup olan negatif kontrol grubundaki ratlar hiçbir cerrahi uygulama yapılmayan sağlıklı ratlardan oluşmaktadır.

- II. Grup pozitif kontrol grubundaki ratlara yukarıda anlatıldığı gibi kemik kırığı yapıldıktan sonra retrograd K teli ile redüksiyon sağlandı ve fasya dokusu 3,0 Vicryl (pegelak 3/0, Doğsan, Türkiye) ile cilt 3,0 prolene (propilen 3/0, Doğsan, Türkiye) ile suture edildi.
- III. Grup Grandus B-One tedavi grubundaki ratlara yukarıda anlatıldığı gibi kemik kırığı yapıldıktan sonra retrograd K teli ile redüksiyon sağlandı ve kırık hatları distrakte edilerek ana bileşeni tetrakalsiyum fosfat (TTCP) olan kompozit Grandus B-One (Permed Sağlık Ürünleri, Çanakkale, Türkiye) uygulandıktan sonra kırık hattı tekrar komprese edildi. Grandus B-One kırık olan 2 parçayı yapıştırdıktan ve dakikalar içinde donduktan sonra fasya dokusu 3,0 Vicryl ile cilt 2,0 prolene ile suture edildi (Şekil 3.9.-Şekil 3.10.-Şekil 3.11.-Şekil 3.12).
- IV. Grup Tetrakalsiyum fosfat (TTCP) grubundaki ratlara yukarıda anlatıldığı gibi kemik kırığı yapıldıktan sonra retrograd K teli ile redüksiyon sağlandı ve kırık hatları distrakte edilerek izole TTCP (Permed Sağlık Ürünleri, Çanakkale, Türkiye) 2 cc TTCP toz 1 cc distile suyla sulandırılarak intrameduller bölgeye uygulandıktan sonra kırık hattı tekrar komprese edildi. Fasya dokusu 3,0 Vicryl ile cilt 2,0 prolene ile suture edildi. TTCP toz materyal distile su (2:1) ile karıştırıldı homojen çözdürüldü ve kırık hattına uygulandı.

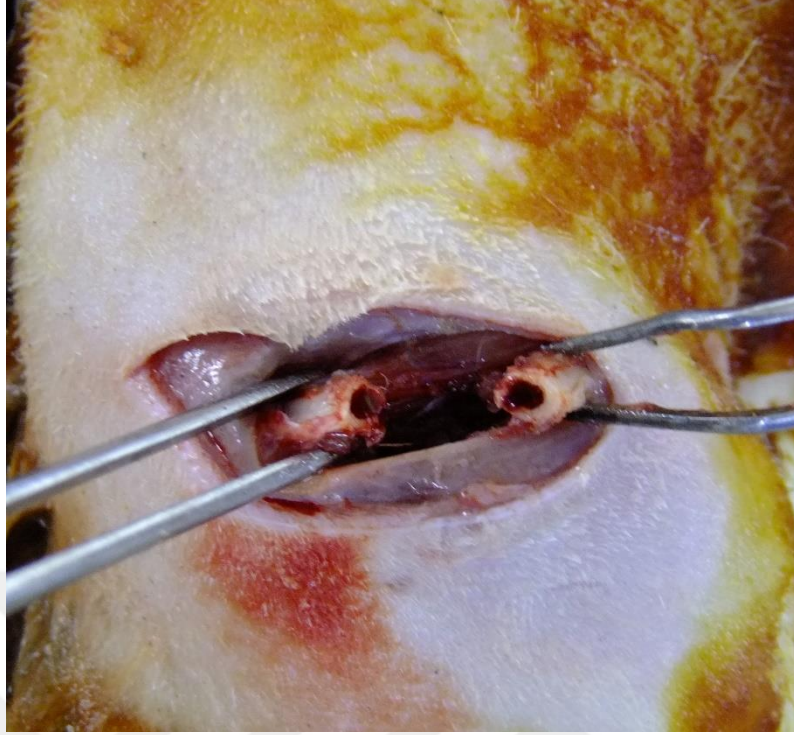
28. günün sonunda tüm ratlar sakrifiye edildi. Tüm ratlardan kardiyak kan alındı (Şekil 3.13). Kanlar biyokimya tüplerine (sarı kapaklı jelli serum ayırma tüpü) yavaşça tüpün kenarından süzülerek enjekte edildi. Daha sonra 6000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serum kısmının ayrılması sağlandı ve ELISA testi yapmak için -80 derece dolaplarda saklandı. Sakrifizasyonun ardından tüm ratların sağ femurları kalça ve diz dezartikülasyonu ile çıkartıldı ve histolojik incelemeye gönderildi (Şekil 3.14).



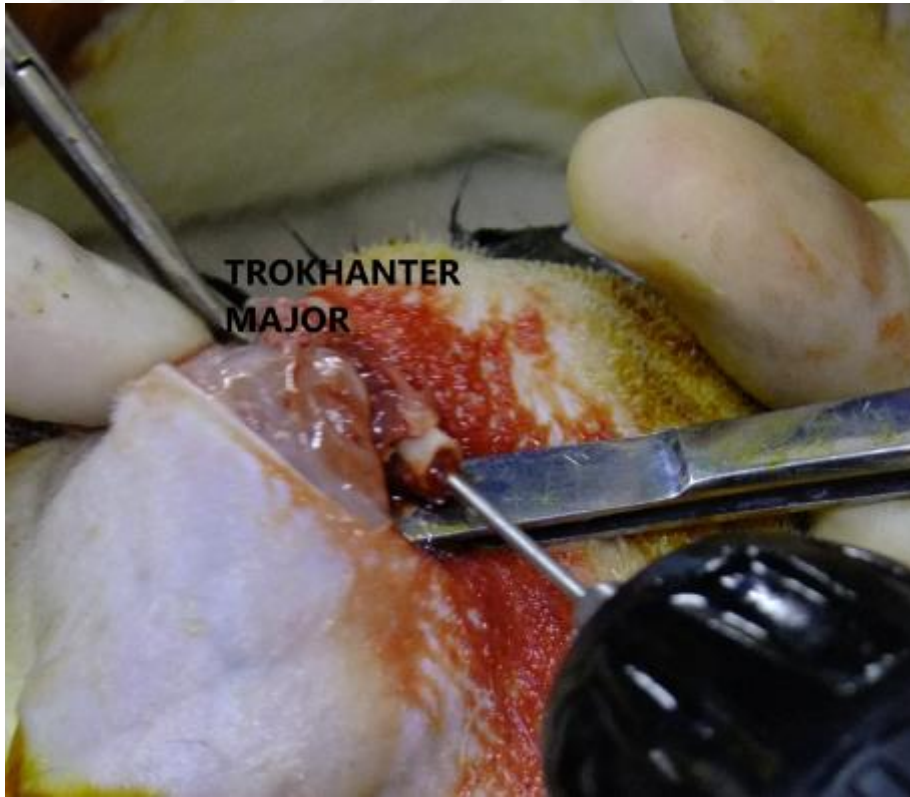
Şekil 3.4. Femur Şaft Periost Kaldırılmış



Şekil 3.5. Taşınabilir Diş Ünitesi Sistemi



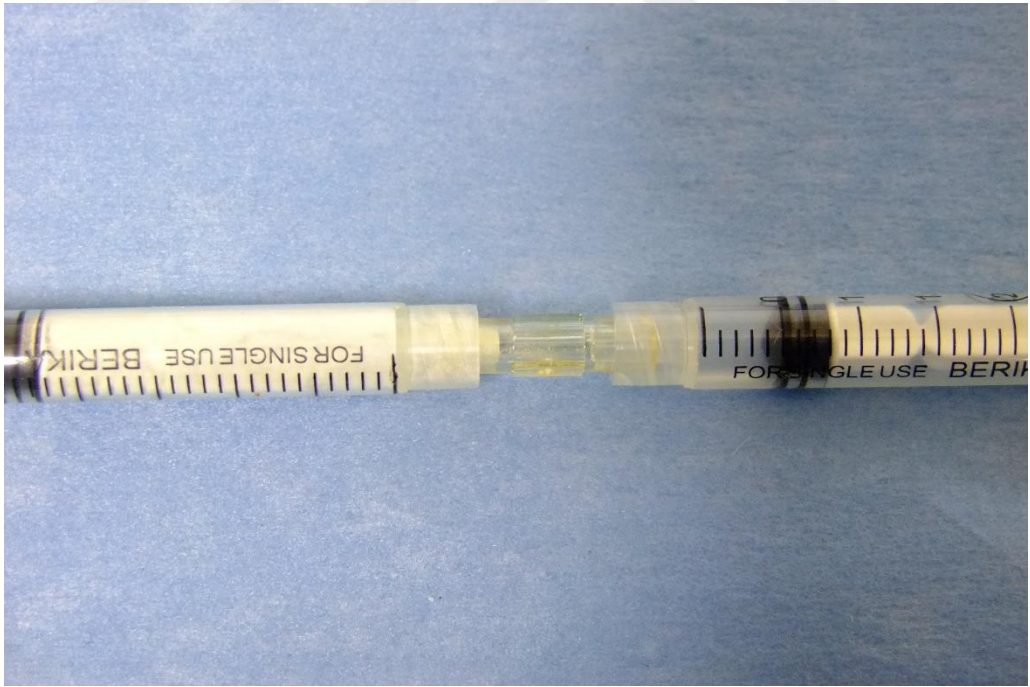
Şekil 3.6. Osteotomi Sonrası İki Parçalı Kırık



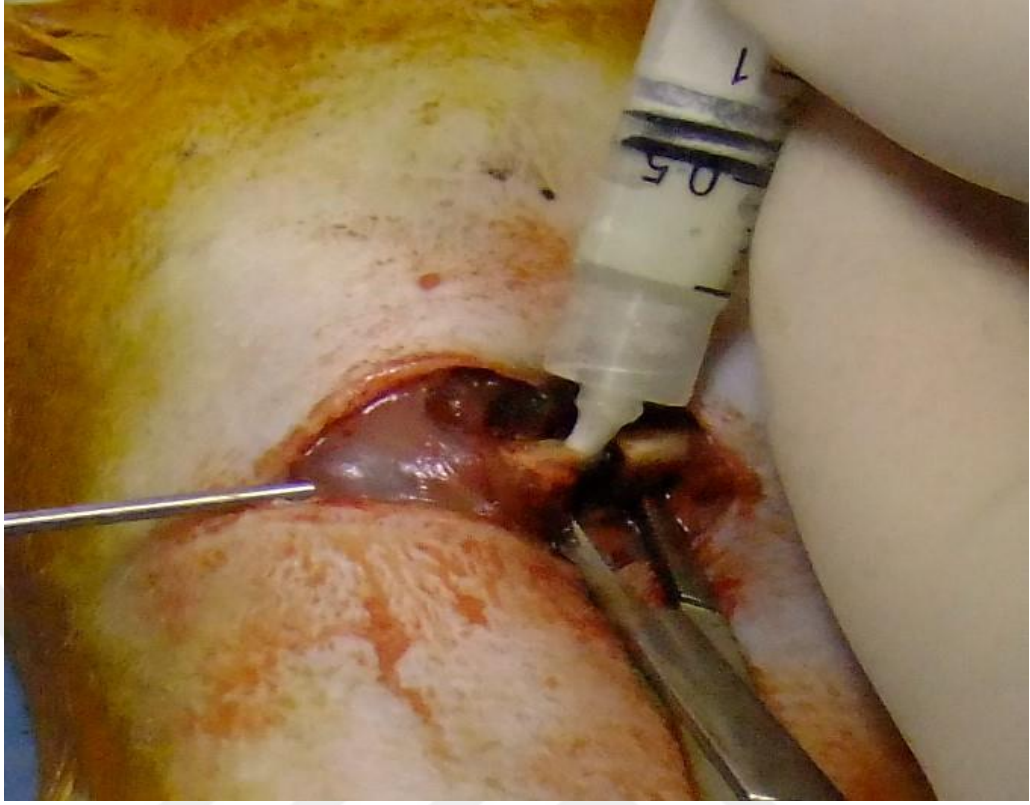
Şekil 3.7. Retrograd K-teli Gönderimi



Şekil 3.8. Kırık Redükte Edilerek K-teli İle Tespit Edildi



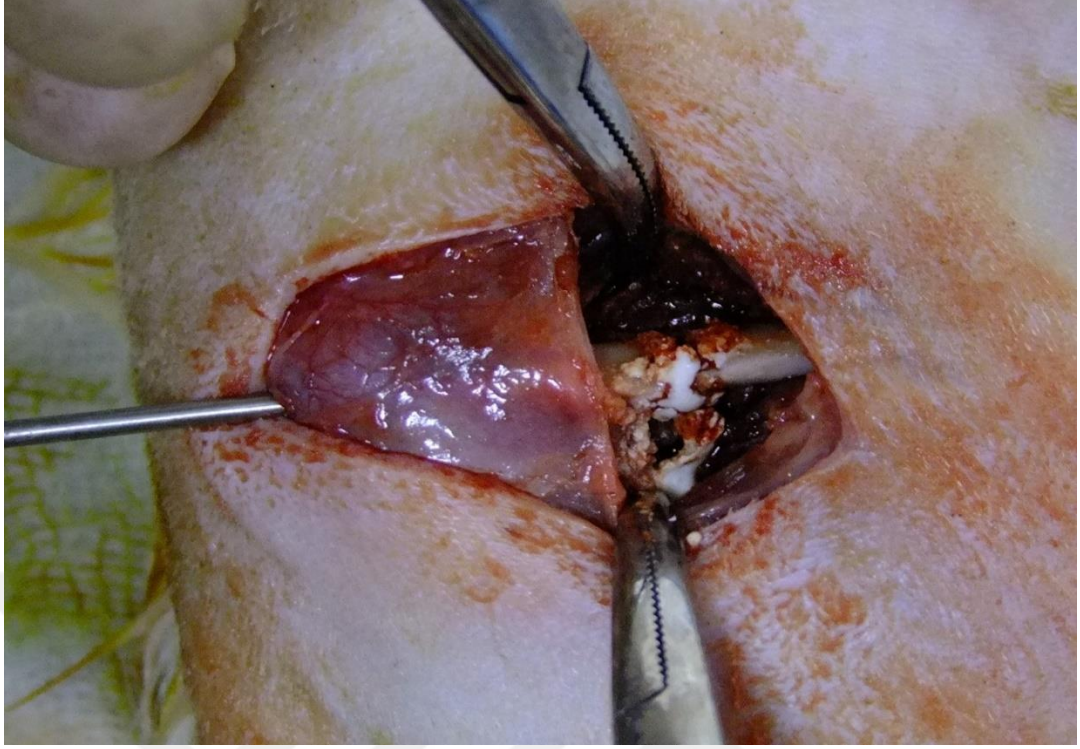
Şekil 3.9. Grandus B-One Toz ve Sıvı Karıştırma Sistemi



Şekil 3.10. Grandus B-One'ın Kırık Hattına Uygulanması



Şekil 3.11. Grandus B-One Kırık Hattına Uygulandıktan Sonra



Şekil 3.12. Grandus B-One Sertleştikten Sonrası



Şekil 3.13. İntrakardiyak Kan Alımı



Şekil 3.14. Sakrifiye Edilmiş Rat Femuru

3.3. Ameliyat Sonrası Rat Yönetimi

Deneysel çalışma ekibi ortopedistler, farmakologlar ve bir adet veterinerden oluşmaktadır.

Cerrahi işlem sonrasında ratlar uyanana kadar ısıtıcı pedler üzerinde takip edildi. Cerrahi işlem öncesi preoperatif dönemde cerrahi uygulanan tüm ratlara enfeksiyon profilaksisi amacıyla bir doz 50 mg/kg/gün 1. Kuşak sefalosporin (sefazolin sodyum, Eqizolin 1 gr, Tüm Ekip İlaç/ İstanbul) intraperitoneal olarak uygulandı (88). Cerrahi işlem sonrası cerrahi uygulanan tüm ratlara vücut sıvısı hemostazı için 8 mg/kg/gün intraperitoneal ringer laktat oda sıcaklığına ısıtılarak uygulandı (89). Postop 24 saat cerrahi uygulama yapılan ratların kafeslerine pelet yem serpildi. Postop 1. günde tüm ratlar 2 ayak üzerine kalkabiliyordu, çevreye ilgileri normaldi ve genel durumları iyiydi. Kendi bakımlarını ve beslenmelerini rahatlıkla yapabiliyorlardı. Postop ilk dakikalardan itibaren tüm ratların kafeslerinde atelsiz serbest dolaşmalarına izin verildi.

Tüm ratlar işlem sonrası 28 gün boyunca 20 +/- 1 derece oda ısısı ve %50 +/- 5 rölatif hava nemi olan standart laboratuvar koşullarında 6'şarlı ve 5'erli şekilde ratlar için özel standart kafeslerde tutularak sağlık durumları gözlemlendi. Laboratuvar ortamında 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü korundu. Deney süresi boyunca ratların standart pelet yeme ve taze içme suyuna ulaşması (ad libitum) sağlandı.

Ratlar cerrahi sonrası temiz kafeslere alındı ve cerrahi sonrası 3 gün boyunca ratların kafesleri temizlendi daha sonra haftalık temizlik yapıldı. Postop ilk 24 saatte ratların yara yerlerine bakıldı. Yara yerlerinde akıntı yoktu. 3 adet ratın (PK'dan 1 rat, TCP'den 2 rat) yara yerinde sadece ciltte 1 mm lik açılma görüldü ve ratlar takip edildi postop 3. gün tüm ratların yara yerleri kapandı ve yara yerinde akıntı görülen rat olmadı. Cerrahi sonrası ilk 24 saat içinde ex gözlemlenmedi. Cerrahi sonrası 2. Haftada grandus grubundan 1 ex, cerrahi sonrası 3. haftada PK grubundan 2 ex, TTCP grubundan 1 ex gözlemlendi.

Ratlarda postop dönemde şiddetli ağrının kanıtı olabilecek durumlar (ses çıkarma, huzursuzluk, hareket eksikliği, tımar yapamama, anormal duruş, çevreye normal ilgi gösterememe) gözlemlenmedi (90). Ratlarda kırık sonrası dönemde spontan koruma, spontan irkilme, sol arka bacakta ağırlık taşıma gibi durumlar postop 1. günden sonra görülmeydi (15,19). Tüm ratların ağırlıkları deney öncesinde, deney sonrası 7. günde, deney sonrası 14. günde ve deney sonrası 28. günde tartılarak ağırlık takip çizelgesine işlendi.

Deney sonlandırma kriterleri deney önesi dönemde belirlendi ve deney süresince değerlendirme bu kriterlere göre yapıldı.

Hayvanların Deney Protokolünden Çıkarılma Kriterleri

- 1- Veteriner hekimin uygun görmesi (insani nedenler)
- 2- Vücut ağırlığının %15'inden fazla kilo kaybı
- 3- Düzgün gıda ve su almama
- 4- Uyarılara belirgin derecede azalmış yanıt verme
- 5- Yara yeri enfeksiyonunun olması

3.4. Radyografik İnceleme

Tüm gruplardaki ratlara, cerrahiden sonra 7, 14 ve 28. günde ketamin (30 mg/kg) (Ketalar, Pfizer, Türkiye) (intraperitoneal), Xylazine (5 mg/kg) (Rompun, Bayer, Almanya) ve röntgen esnasında hareketlenen ratlara sevofluran (inhaler) sedasyon anestezi ile radyografik görüntüleme yapıldı. Radyografik inceleme Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi acil servisinde yapılmıştır. Radyolojik değerlendirme yapılırken ratlar her defasında aynı sıraya göre dizilmiştir (Şekil 3.15). Röntgen için kullanılan X-ray cihazı (meX-100 (vet-versiyon)) tüm görüntülemeler esnasında 85 cm uzaklıktan ışın gönderecek şekilde konumlandırıldı (Şekil 3.16). X-ray cihazı ayarları doku kalınlığına göre yapılmıştır (Şekil 3.17). Radyolojik değerlendirmede kırık iyileşmesini değerlendirmek için Modifiye Lane ve Sandhu sınıflaması kullanıldı (Tablo 2). Radyografik görüntüler çalışmada yer almayan (çalışma gruplarına kör ortopedistler tarafından) ortopedi uzmanları (YSD, AEÖ, MK) tarafından değerlendirildi (91).



Şekil 3.15. Ratların Röntgen Kasedi Üzerine Dizilişi



Şekil 3.16. Radyolojik Görüntüleme Mesafesi



Şekil 3.17. Röntgen Cihazının Ratlara Göre Ayarlanması

Tablo 3.2. Modifiye Lane ve Sandhu Skorlama Sistemi

Kırık hattında oluşan kemik dokusu (kallus)		Kaynama (proksimal ve distal ayrı ayrı)		Yeniden yapılanma	
Kallus oluşumu yok	0	Kaynama yok	0	Yeniden yapılanma kanıtı yok	0
Defektin %25'ini dolduran kemik dokusu oluşumu	1	Olası kaynama durumu	1	Meduller kanalın yeniden şekillenmesi	1
Defektin %50'sini dolduran kemik dokusu oluşumu	2	Radyolojik kaynama	2	Tam kortikal yeniden şekillenme	2
Defektin %75'ini dolduran kemik dokusu oluşumu	3				
Defektin tamamını dolduran kemik dokusu oluşumu	4				

Tablo 3.3. Modifiye Lane ve Sandhu Skorlama Sisteminin Puanlaması

Parametre	Kategori başına en yüksek puanlama
Kırık hattında oluşan kemik dokusu (kallus)	4
Proksimal kaynama	2
Distal kaynama	2
Yeniden yapılanma	2
Tablodan alınabilecek en yüksek puan	10

3.5. Biyokimyasal Analizler

28. günün sonunda yüksek doz ürethan anestezisi ile sakrifiye edilip ratlardan intakardiyak yöntemle 5 cc kan alındı (Şekil 3.18.), 6000 devirde 5 dakika santrifüj edildi ve ELISA testleri yapılana kadar eksi 80°C' de saklandı. Ticari olarak temin edilebilen bir enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) kit (SinoGeneclon, HangZhou, Çin) kullanılarak BMP-2, TNF- α , IL-1 β ve Nuclear Factor Kappa B (NFkB) parametreleri ticari kit protokolüne uygun şekilde incelendi.



Şekil 3.18. İntrakardiyak Kan Alımı

ELISA kiti, protokolüne göre önce kutucuklara standartlar eklendi, seyreltilme işlemi protokole uygun olarak yapıldı ve yapışkan bant yapıştırdıktan sonra 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında yapışkan bant çıkarılıp süpernatant boşaltıldı, wash buffer ile 5 kez yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 50 μ m HRP eklendikten sonra tekrar yapışkan bant ile 30 dakika inkübe edildi. Yapışkan bant açılarak süpernatant boşaltıldıktan sonra tekrar wash buffer ile 5 kez yıkama yapıldı. Sonrasında kuyucuklara (standartın son kuyucugu hariç) 50'şer μ m Chromogene A ve Cromogene B eklendikten sonra ışıktan koruyacak şekilde paketlere koyularak 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuga 50 μ m Stop solüsyonu eklendi rengin maviden sarıya döndüğü görüldü. 15 dakika bekledikten sonra 450 nm'de kitler okutuldu.

3.6. Histopatolojik Analizler

28. günün sonunda yüksek doz ürethan anestezisi ile sakrifiye edilen ratlardan alınan sağ femur kemiklerinin K-telleri çıkartıldıktan sonra histopatolojik incelemeye gönderildi. Ratlardan alınan kemik doku örnekleri, %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Daha sonra örnekler %10'luk Nitrik asit solüsyonunda 2 gün süreyle dekalsifiye edilerek rutin alkol ksilol serilerinden geçirildi. Parafin bloklardaki örneklerden 5 μ m'lik kesitler alınarak Hematoksilen-Eosin ve Masson's

Trichrome Stain (MST) ile boyandı. Değerlendirmede inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, yeni damar oluşumu, fibrosit/fibroblast aktivitesi, kondrosit/kondroblast aktivitesi, fibröz doku ve kıkırdak doku oluşumu gibi histopatolojik bulgular semikantitatif yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olacak şekilde değerlendirildi (92,93).

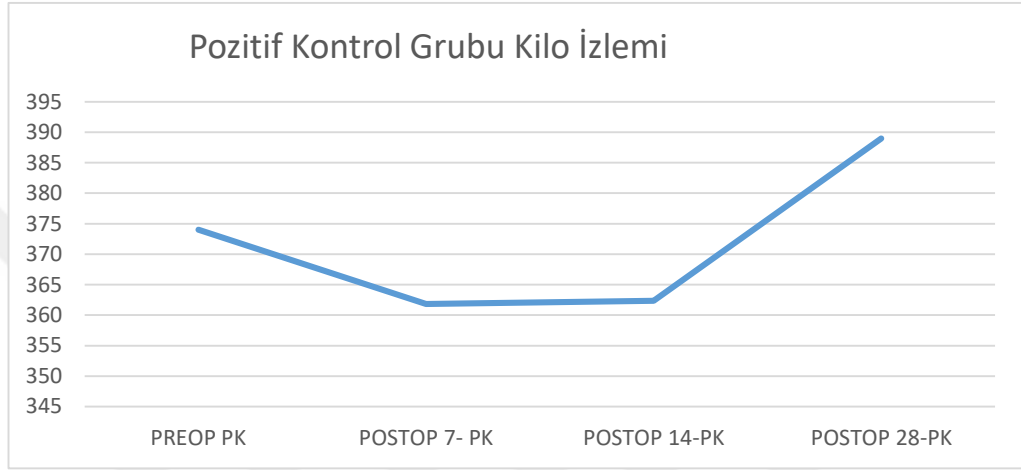
3.7. İstatiksel Analizler

İstatistiksel analiz, SPSS Statistics 20.0 kullanılarak yapılacaktır. Gruplar arasındaki farklılıklar, Gabriel'in ikili testi kullanılarak post-hoc test ile tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edilecektir. $p < 0.05$, ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olarak kabul edilecektir (94).

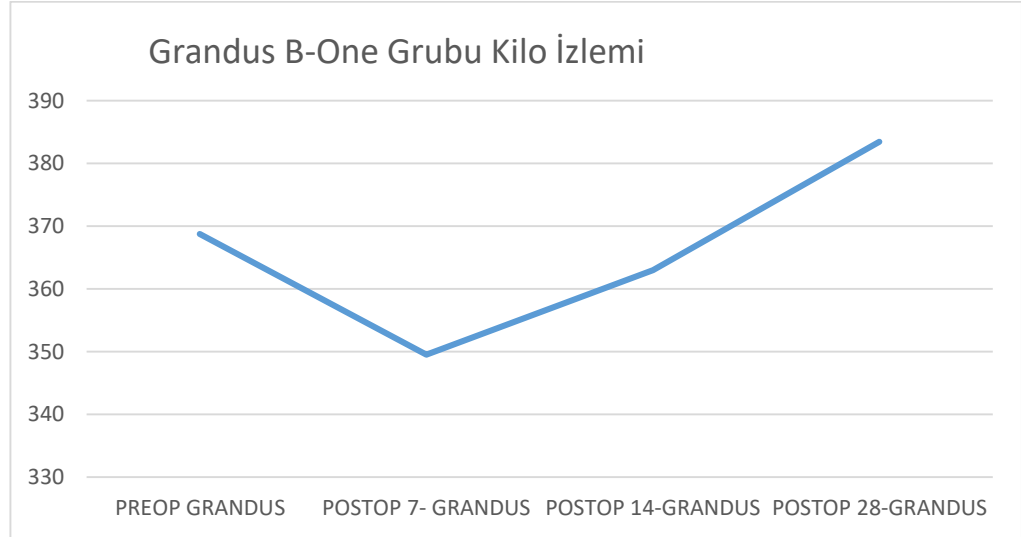
4. BULGULAR

4.1. Rat Ağırlık Takiplerine Ait Bulgular

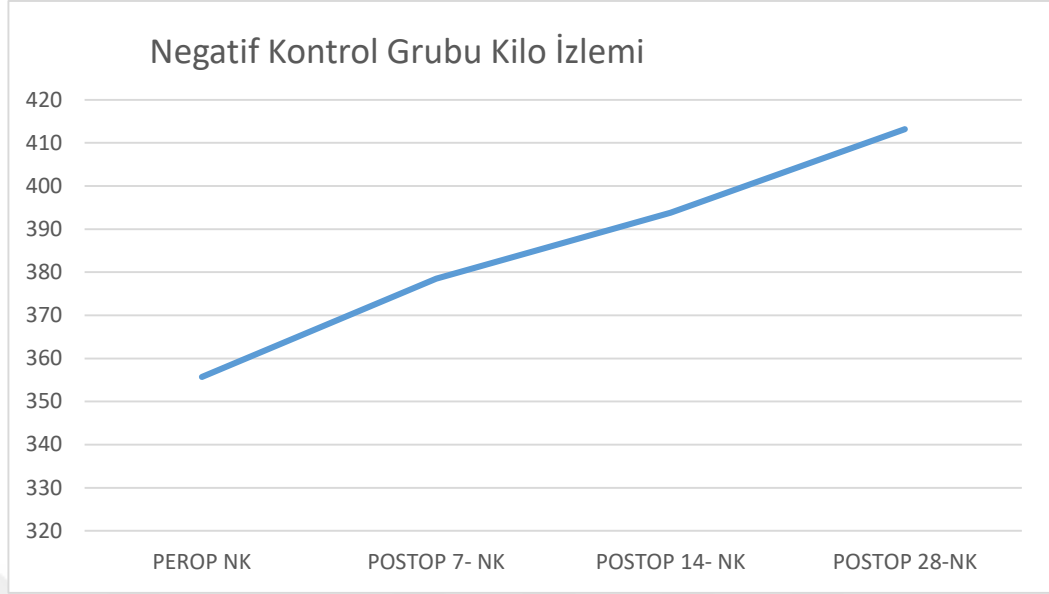
Çalışmamızda bulunan 44 adet rat'ın cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası 7, 14, 28. günlere ait kilo izlemleri yapılmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2.-Şekil 4.3.-Şekil 4.4).



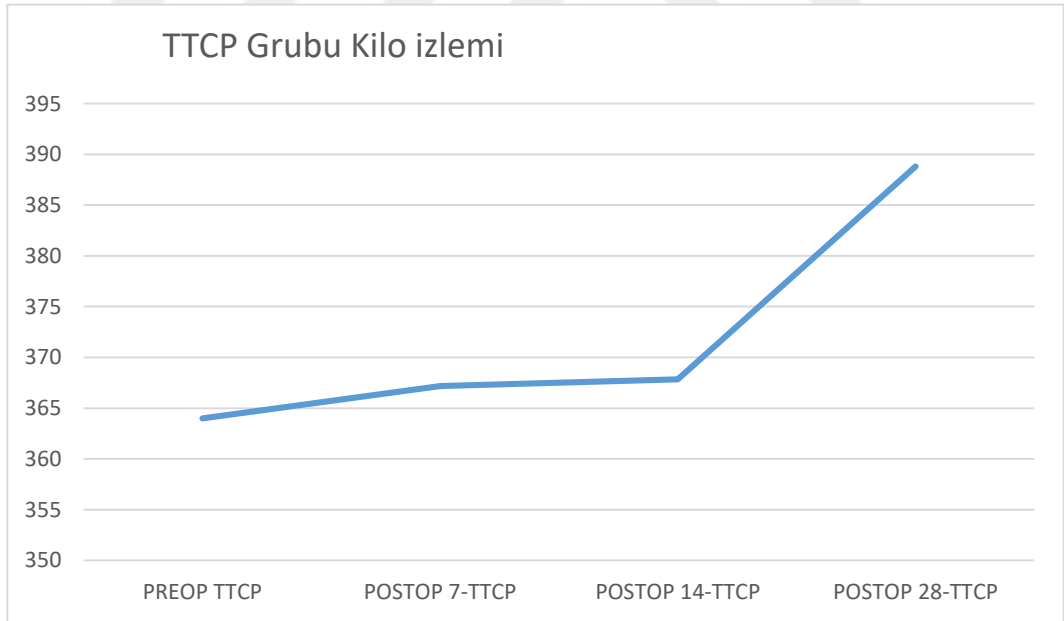
Şekil 4.1. Pozitif Kontrol Grubu Kilo İzlemi



Şekil 4.2. Grandus B-One Grubu Kilo İzlemi



Şekil 4.3. Negatif Kontrol Grubu Kilo İzlemi



Şekil 4.4. TTCP Grubu Kilo izlemi

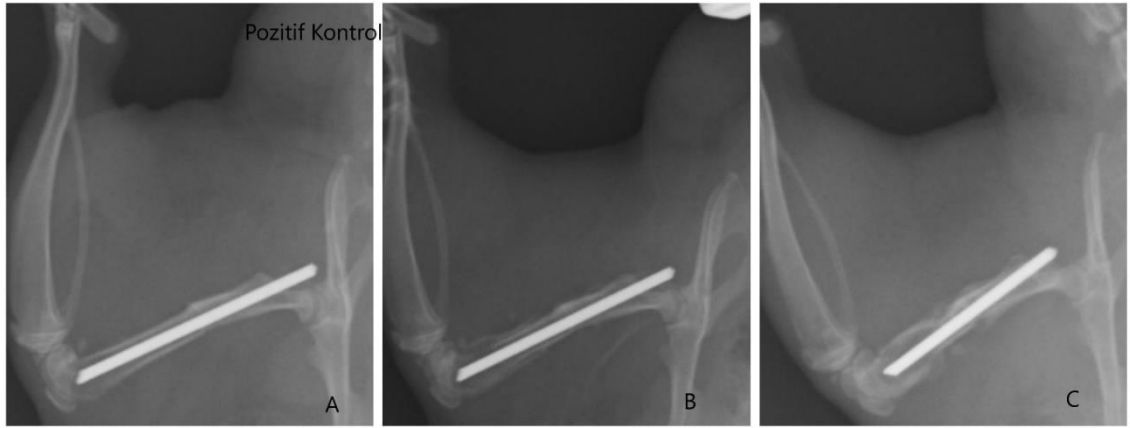
Cerrahi işlem uygulanmayan gruptaki ratlar 28 gün boyunca kilo alımı devam etmiş. Sadece açık kırık modeli uygulanıp intramedüller tel atılan gruptaki ratlarda cerrahi sonrası 7. güne kadar ağırlık kaybı devam etmiş, cerrahi sonrası 7 ila 14. gün arasında ağırlıkları artmamış ve cerrahi sonrası 14. günden sonra ağırlıkları artmaya başlamıştır. Açık kırık modeli uygulanıp kırık hatına lokal olarak Grandus B-One uygulanan gruptaki ratlarda cerrahi sonrası 7. güne kadar ağırlık kaybı görülmüş ancak 7. günden sonra ağırlık kazanmaya devam etmişler. Açık kırık modeli uygulanıp kırık hattına lokal olarak TTCP uygulanan gruptaki ratlarda kilo kaybı görülmemiş, cerrahi sonrası 7. güne kadar minimal düzeyde kilo artışları olmuş, 14. günden itibaren ağırlık kazanmaya devam etmişler.

4.2. Radyolojik Bulgular

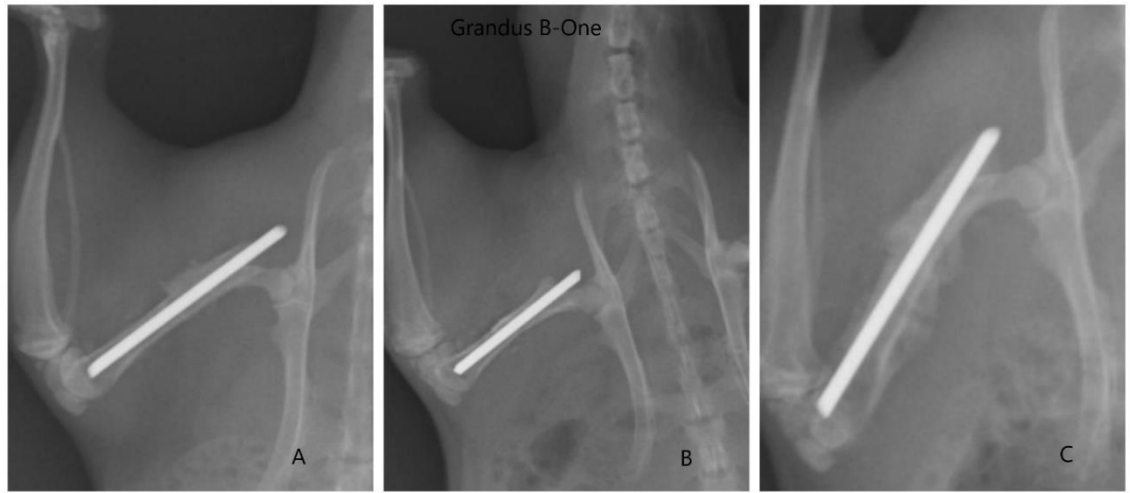
Çalışmamızda bulunan tüm ratlara cerrahi sonrası 7,14 ve 28. günlerde anestezi altında röntgen kasetlerine yerleştirilerek lateral pozisyonda tek yönlü radyolojik görüntülemeler yapıldı (Şekil 4.5.-Şekil 4.6.- Şekil 4.7.-Şekil 4.8).



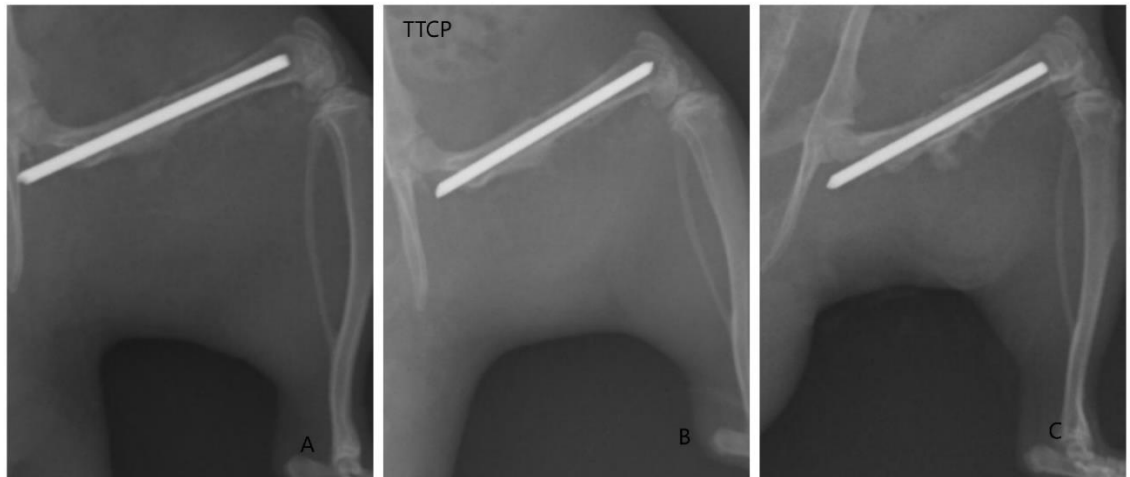
Şekil 4.5. Negatif kontrol grubundan elde edilen radyolojik direkt grafi görüntüleri.
A: postop 7. Gün, B: postop 14. Gün, C: postop 28. Gün



Şekil 4.6. Pozitif kontrol grubundan elde edilen radyolojik direkt grafi görüntüleri.
A: postop 7. Gün, B: postop 14. Gün, C: postop 28. Gün



Şekil 4.7. Grandus B-One grubundan elde edilen radyolojik direkt grafi görüntüleri.
A postop 7. Gün, B: postop 14. Gün, C: postop 28. Gün



Şekil 4.8. TTCP grubundan elde edilen radyolojik direkt grafi görüntüleri. A: postop 7. Gün, B: postop 14. Gün, C: postop 28. Gün

7. günde yapılan radyolojik görüntülemde pozitif kontrol grubu direkt grafilinde kallus dokusu hiç gözlemlenmedi. Pozitif kontrol grubunda 1 ratta intrameduller tespit geri gelmiş olarak görüldü. Grandus B-One grubu direkt grafilinde 7. günde uygulanan materyale ait görüntüler mevcuttu, kallus dokusuyla benzer görünüm mevcuttu. TTCP grubu direkt grafilinde 7. günde minimal kallus dokusu görünümü mevcuttu.

14. günde yapılan radyolojik görüntülemde pozitif kontrol grubu direkt grafilinde özellikle femur distal bölgelerinde olmak üzere kallus dokusu görüldü. Grandus B-One grubu direkt grafilinde 14. günde femur distal bölgelerde daha yoğun olmak üzere kallus dokuları ve uygulanan materyal ile uyumlu görüntü mevcuttu. TTCP grubu direkt grafilinde 14. günde femur distal, proksimal ve kırık bölgesinde kallus dokuları görüldü.

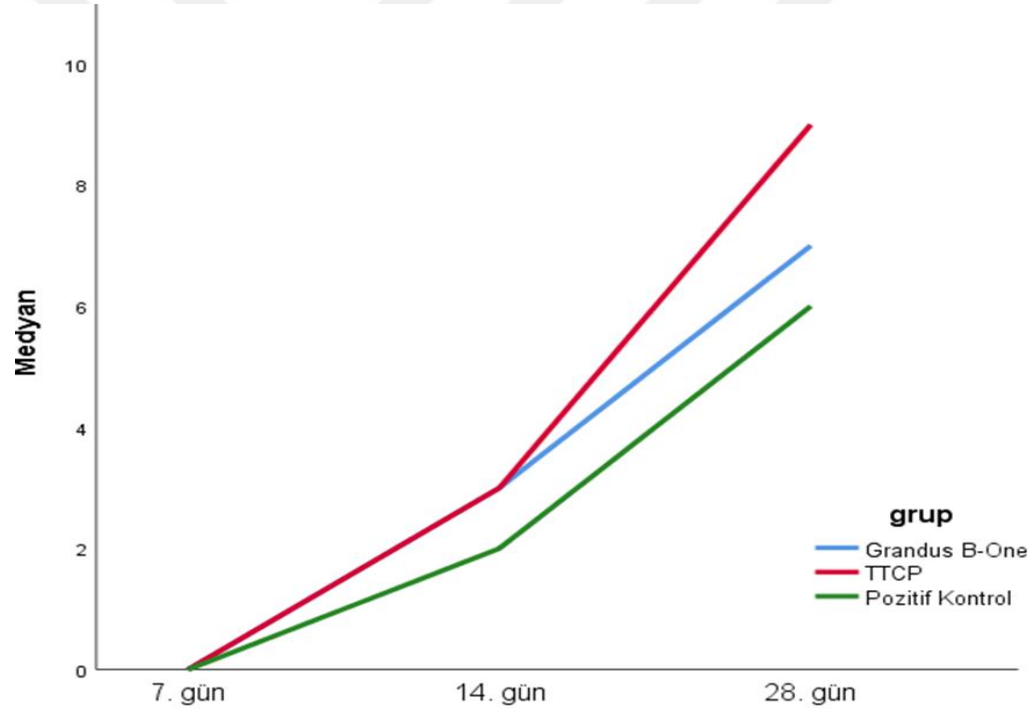
28. günde yapılan radyolojik görüntülemde pozitif kontrol grubu direkt grafilinde defekti dolduran ama remodele olmayan, defekti tam dolduramayan ancak yoğun kallus dokusu olan ve defekt alanını dolduramayan minimal kallusa sahip görünüm mevcuttu. Grandus B-One grubu direkt grafilinde 28. günde defekt alanının büyük kısmını dolduran ancak tam olarak remodele olmayan görünüm mevcuttu. Grandus B-One grubunda 28. günde bir ratta K telinin geri gelmiş olduğu görüldü. TTCP grubu direkt grafilinde 28. günde defekt alanın büyük kısmını hatta tamamını dolduran ancak tamamen remodele olmamış görünüm mevcuttu.

Negatif kontrol grubu direkt grafilinde 7,14 ve 28. günde değişiklik görülmedi. Görüntüler sağlıklı kemik dokusu ile uyumluydu.

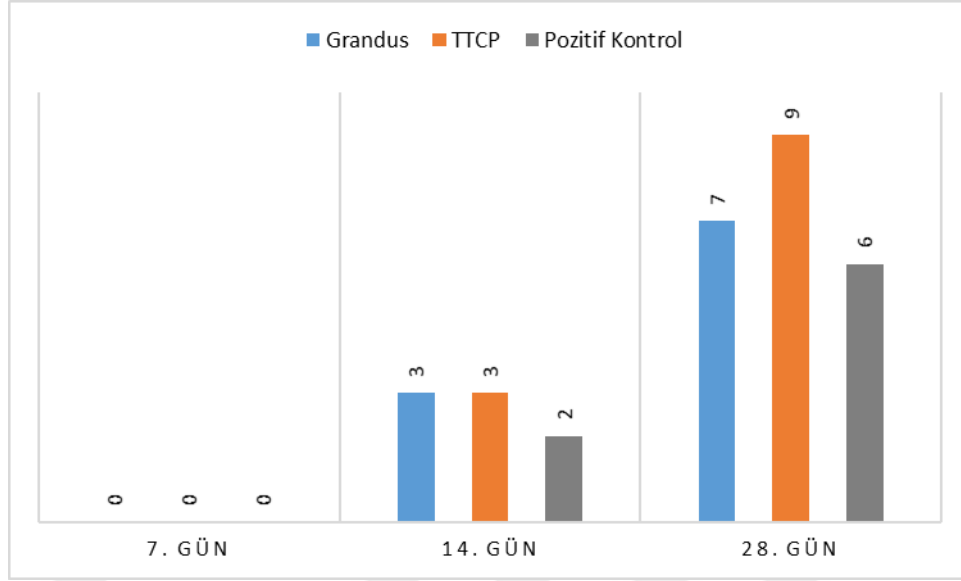
Bu çalışmada 44 adet rat her biri 11 şer adet olmak üzere 4 ayrı gruba ayrılmıştır. Sağ femurlarına deneysel açık kırık modeli oluşturulan her grupta 11 rat olan toplamda 33 adet rat bulunmaktadır. Tüm deneysel kırık oluşturulan ratlar 7. 14. ve 28. günün sonunda kaynama düzeyleri Modifiye Lane ve Sandhu sınıflaması aracılığı ile skorlanarak incelenmiştir (Tablo 4.1.-Şekil 4.9.-Şekil 4.10).

Tablo 4.1. Deneysel gruplar içi tekrarlı ölçümlerinin karşılaştırılması

	Grandus B-one (n=11) M[min maks]	TTCP (n=11) M[min maks]	Pozitif Kontrol (n=11) M[min maks]
7. gün	0 [0 1]	0 [0 1]	0 [0 1]
14. gün	3 [2 4]	3 [2 3]	2 [1 3]
28. gün	7 [4 9]	9 [4 10]	6 [3 8]
p^1	<0,001	<0,001	<0,001
7.gün-14.gün p^2	0,025	0,020	0,059
7. gün-28.gün p^2	<0,001	<0,001	0,025
14.gün-28.gün p^2	0,030	0,040	0,020



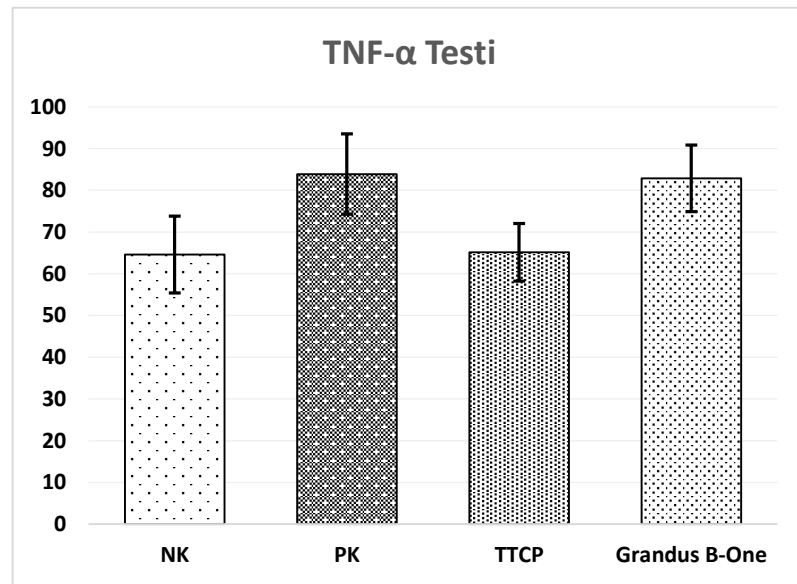
Şekil 4.9. Gruplarda ölçek skorlarının zamana değişim çizgi grafiği



Şekil 4.10. Radyolojik bulguların gruplarda dağılımları

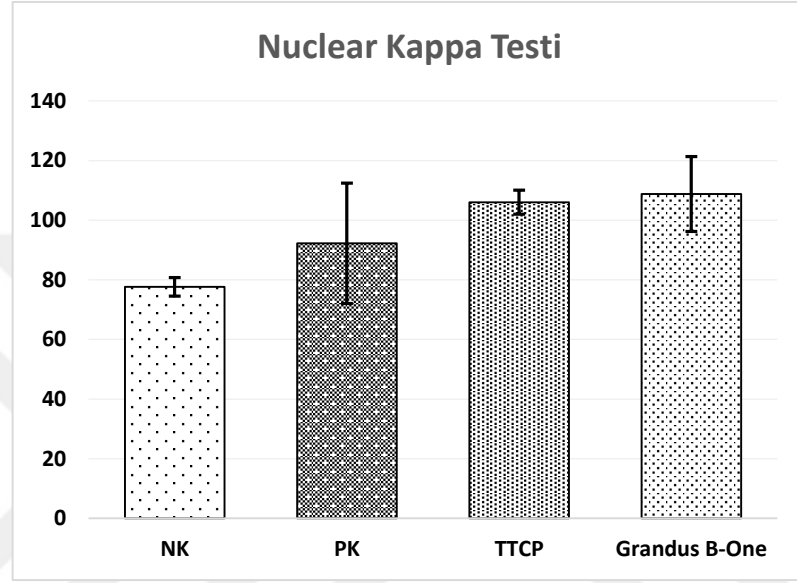
4.3. Biyokimyasal Bulgular

28. günün sonunda yüksek doz ürethan anestezisi ile sakrifiye edilip ratlardan intakardiyak yöntemle 5 cc kan alındı. Alınan kanlar santrifüj edilerek eksi 80 derecede saklandı. Kanlar ticari olarak temin edilebilen bir enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) kit (SinoGeneclon, HangZhou, Çin) kullanılarak analiz edildi (Şekil 4.11-Şekil 4.12-Şekil 4.13.-Şekil 4.14).



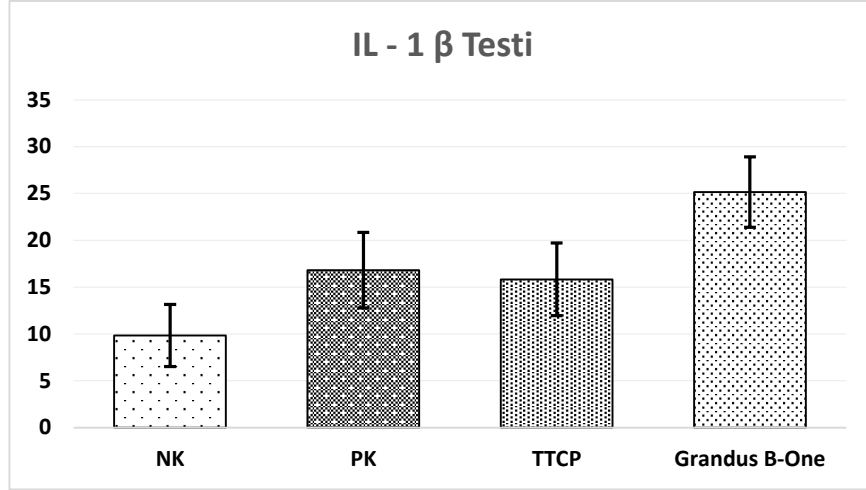
Şekil 4.11. TNF-a ELISA testi analizlerinin gruplarda dağılımı

28. gün sakrifiye edilen ratlardan alınan kanlarda yapılan TNF-a ELISA testi sonuçlarına göre pozitif kontrol grubu ve Grandus B-One grubu TNF-a değerleri negatif kontrol grubu ve TTCP grubuna göre daha yüksek olarak bulunmuştur. NK ve TTCP grubu sonuçları birbirine yakın değerler olarak bulundu. PK ve Grandus B-One grubu sonuçları birbirine yakın değerler olarak bulunmuştur.



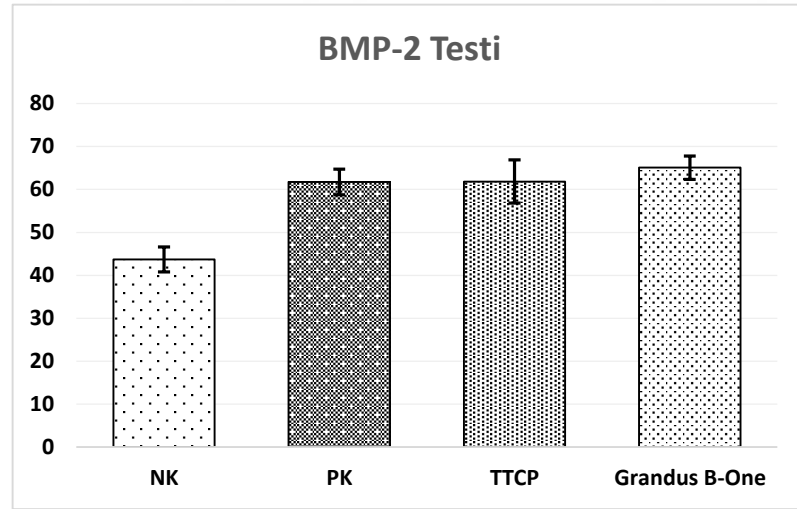
Şekil 4.12. Nükleer Kappa Elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı

28. gün sakrifiye edilen ratlardan alınan kanlarda Nükleer Kappa B testi Elisa sonuçlarına göre en yüksek değer Grandus B-One grubunda görülmüştür. Grandus B-One' a en yakın değer TTCP grubunda görüldü. En düşük değerler negatif kontrol grubunda görüldü. Pozitif kontrol grubu değerleri negatif kontrol grubundan yüksek TTCP grubundan düşük olarak bulunmuştur.



Şekil 4.13. IL-1B Elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı

28. gün sakrifiye edilen ratlardan alınan kanlarda IL-1B sonuçlarına göre en yüksek değer Grandus B-One grubunda görüldü. Grandus B-One'dan sonra yüksek değer pozitif kontrol grubunda görüldü. Negatif kontrol grubu sonuçları en düşük değerlere sahip olarak görüldü. TTCP grubu değerleri negatif kontrol grubundan yüksek pozitif kontrol grubundan düşük olarak görüldü.



Şekil 4.14. BMP-2 Elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı

28. gün sakrifiye edilen ratlardan alınan kanlarda BMP-2 sonuçlarına göre en yüksek değerler Grandus B-One grubunda olmasına rağmen pozitif kontrol ve TTCP grubu değerleri de negatif kontrol grubuna göre yüksek olarak görüldü.

4.4. Histopatolojik Bulgular

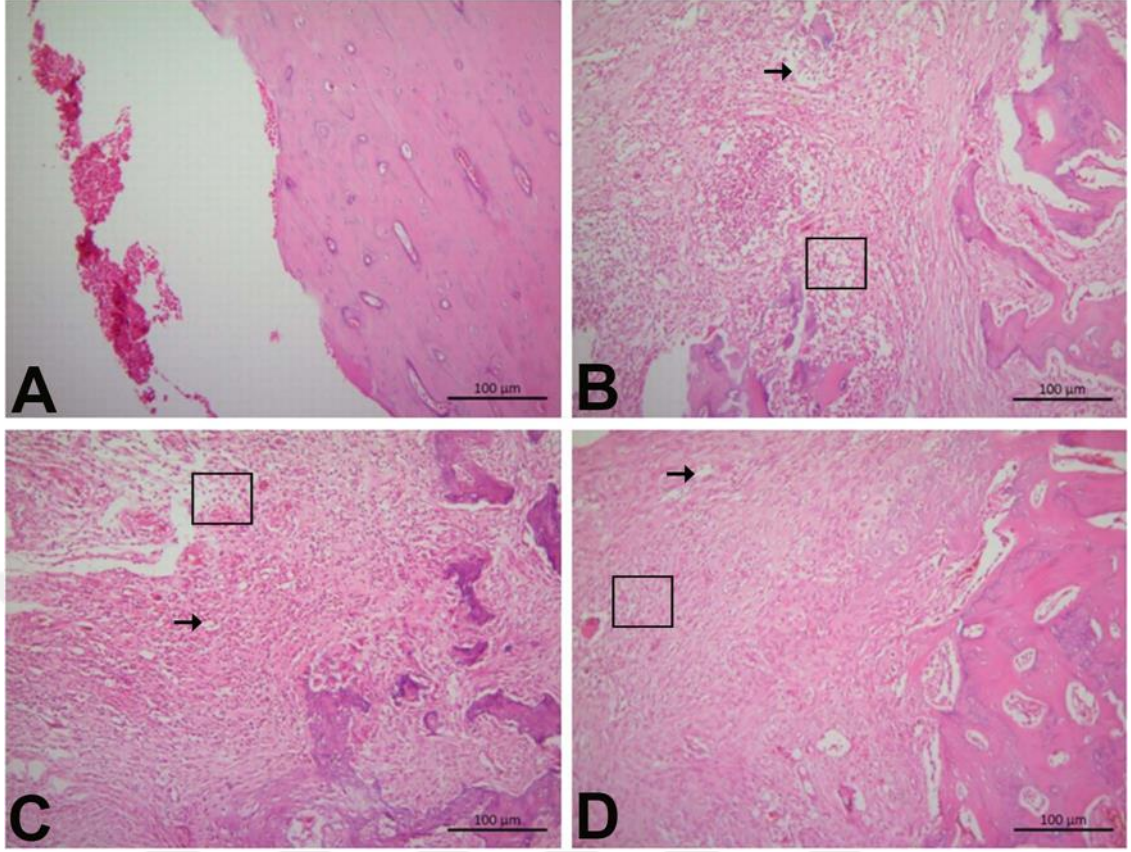
Ratlardan alınan kemik doku örnekleri Parafin bloklardaki örneklerden 5 µm'lik kesitler alınarak Hematoksilen-Eosin ve Masson's Trichrome Stain (MST) ile boyandı. Değerlendirmede inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, yeni damar oluşumu, fibrosit/fibroblast aktivitesi, kondrosit/kondroblast aktivitesi, fibröz doku ve kıkırdak doku oluşumu gibi histopatolojik bulgular semikantitatif olarak yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi (Tablo 4.2-Tablo 4.3).

Tablo 4.2. Hematoksilen-Eozin ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Bulgular

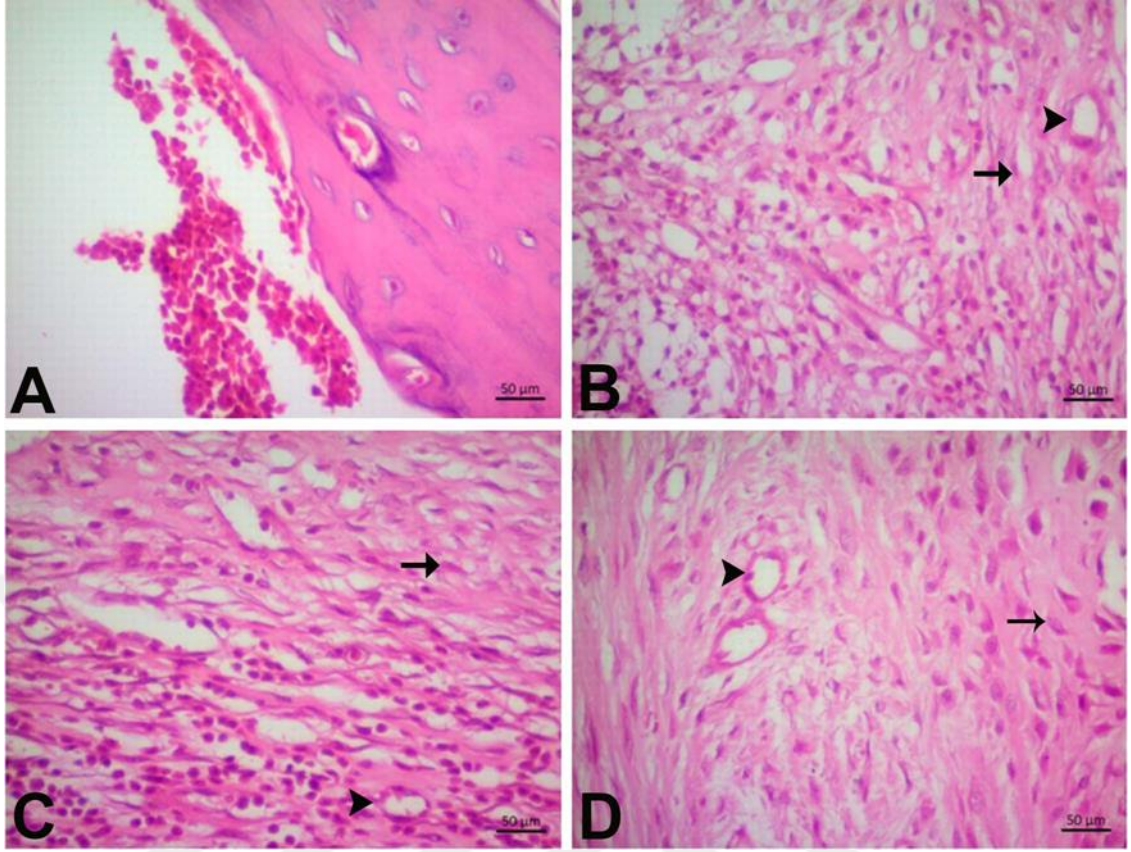
Gruplar	İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	Ödem	Yeni damar oluşumu	Fibrosit/fibroblast aktivitesi	Kondrosit/kondroblast aktivitesi
PK	2,83±0,40	2,66±0,51	1,00±0,00	1,16±0,40	0,33±0,51
Grandus B-One	2,00±0,00	1,83±0,40	0,83±0,00	1,83±0,40	0,33±0,51
TTCP	1,16±0,40	1,00±0,00	2,66±0,51	2,83±0,40	2,66±0,51

Negatif kontrol grubu ratların kemik dokuları normal histolojik görünümdeydi. Genel olarak histopatolojik bulgular PK grubunda en şiddetli durumda gözlenirken, Grandus B-One grubunda orta, TTCP grubunda ise hafif olarak belirlendi.

İnflamatuvar hücre infiltrasyonu ve ödem PK grubunda şiddetli, Grandus B-One grubunda orta, TTCP grubunda ise hafif olarak belirlendi. Yeni damar oluşumu da PK ve Grandus B-One grubunda hafif, TTCP grubunda şiddetliydi. Fibrosit/fibroblast aktivitesi ise PK grubunda hafif, Grandus B-One grubunda orta olarak belirlenirken, kondrosit/kondroblast aktivitesinin bu iki grupta henüz önemli düzeyde şekillenmediği tespit edildi. Diğer iki gruptan farklı olarak TTCP grubunda fibrosit/fibroblast ile kondrosit/kondroblast aktivitesi şiddetli düzeydeydi (Şekil 4.15-4.16).



Şekil 4.15. Hematoksilen-Eozin ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Görünümler
A- NK grubu. Normal histolojik görünüm. B- PK grubu. Şiddetli düzeyde ödem (ok) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (□), C- Grandus B-One grubu. Orta düzeyde ödem (ok) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (□), D- TTCP grubu. Hafif düzeyde ödem (ok) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (□). H-E.



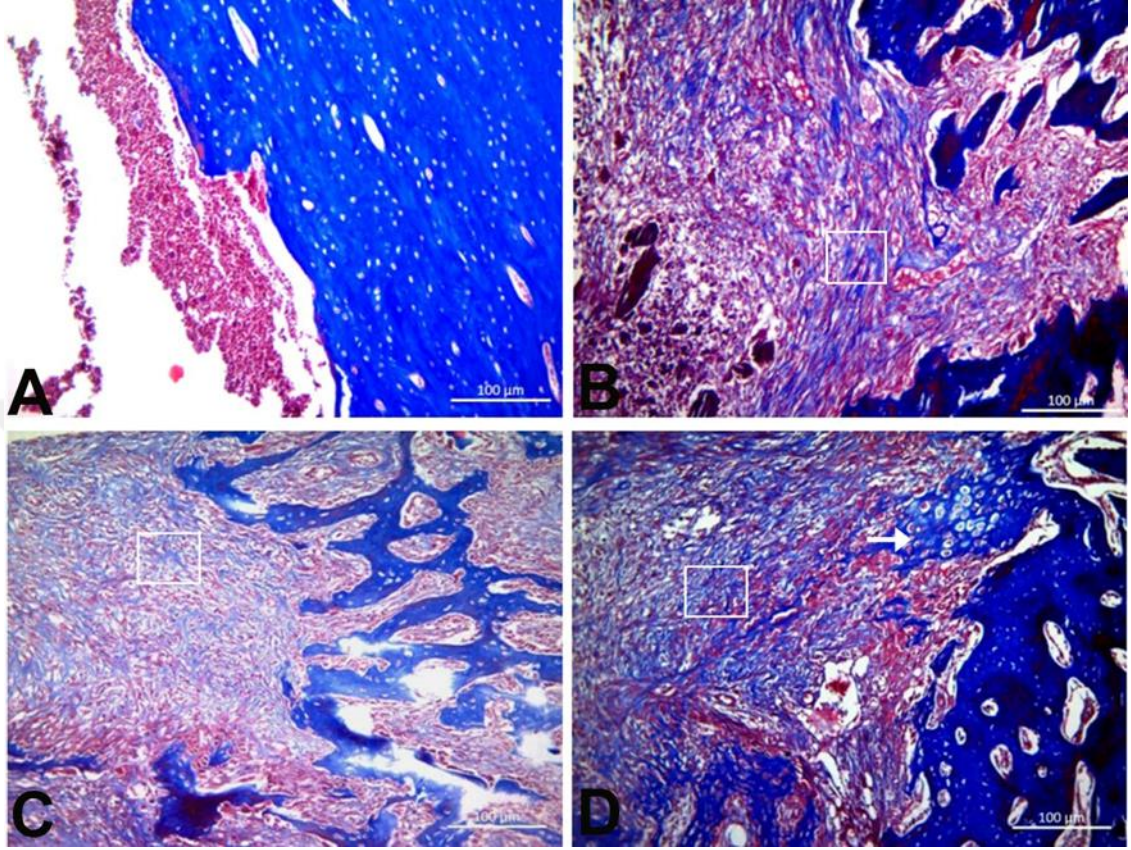
Şekil 4.16. Hematoksilen-Eozin ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Görünümler
A- NK grubu. Normal histolojik görünüm. B- PK grubu. Hafif düzeyde yeni damar oluşumları (okbaşı) ve fibroblast/fibrosit aktivitesi (ok), C- Grandus B-One grubu. Hafif düzeyde yeni damar oluşumları (okbaşı) ve orta düzeyde fibroblast/fibrosit aktivitesi (ok), D- TTCP grubu. Şiddetli düzeyde yeni damar oluşumları (okbaşı) ve kondrosit/kondroblast aktivitesi (ince ok), H-E.

Tablo 4.3. Masson's Trichrome ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Bulgular

Gruplar	Fibröz doku oluşumu	Kıkırdak doku oluşumu
PK	1,16±0,40	0,33±0,51
Grandus B-One	2,00±0,00	0,16±0,40
TTCP	2,83±0,40	1,83±0,40

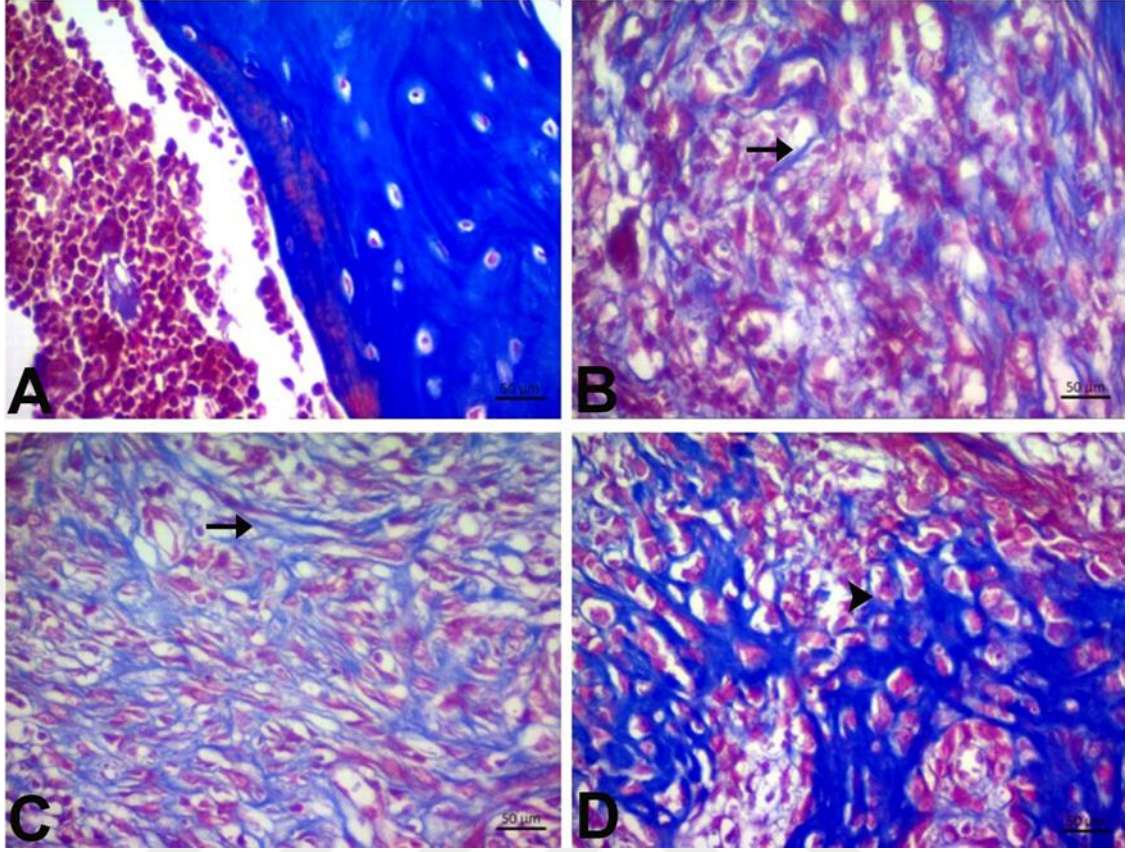
Negatif kontrol grubundaki ratların kemik örnekleri normal histolojik yapıdaydı. Tespit edilen bulgulardan olan fibröz doku oluşumu uygulama gruplarından; PK grubunda hafif, Grandus B-One grubunda orta, TTCP grubunda ise şiddetliydi. Kıkırdak doku oluşumunun ise PK ve Grandus B-One grubunda henüz

önemli düzeyde şekillenmediği belirlenirken, TTCP grubunda ise orta düzeyde şekillendiği belirlendi (Şekil 4.17-4.18).



Şekil 4.17. Masson's Trichrome ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Görünümler

A- NK grubu. Normal histolojik görünüm. B- PK grubu. Hafif düzeyde fibröz doku oluşumu (□), C- Grandus B-One grubu. Orta düzeyde fibröz doku oluşumu (□), D- TTCP grubu. Şiddetli düzeyde fibröz doku oluşumu (□), MST.



Şekil 4.18. Masson's Trichrome ile Yapılan Boyamada Gruplara Göre Histopatolojik Görünümler

A- NK grubu. Normal histolojik görünüm. B- PK grubu. Hafif düzeyde fibröz doku oluşumu (ok), C- Grandus B-One grubu. Orta düzeyde fibröz doku oluşumu (ok), D- TTCP grubu. Orta düzeyde kıkırdak doku oluşumu (okbaşı), MST.

4.5. İstatiksel Bulgular

4.5.1. Radyolojik İstatiksel Bulgular

İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro wilk testi ile incelendi. Normal dağılmayan skor değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi ve Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Grup içi tekrarlı ölçümlerin karşılaştırılması ise Fridman testi ve All pairwise post hoc testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistik olarak sayısal değişkenler için medyan, min-maks, kategorik değişkenler için ise sayı değerleri verilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS Windows

version 23.0 paket programı kullanılmış ve $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4.4. Deneysel Gruplar içi Tekrarlı Ölçümlerinin Karşılaştırılması

	Grandus B-one (n=11) M[min maks]	TTCP (n=11) M[min maks]	Pozitif Kontrol (n=11) M[min maks]
7. gün	0 [0 1]	0 [0 1]	0 [0 1]
14. gün	3 [2 4]	3 [2 3]	2 [1 3]
28. gün	7 [4 9]	9 [4 10]	6 [3 8]
p¹	<0,001	<0,001	<0,001
7.gün-14.gün p²	0,025	0,020	0,059
7. gün-28.gün p²	<0,001	<0,001	0,025
14.gün-28.gün p²	0,030	0,040	0,020

Tekrarlı ölçümlerde kaynama skorlarının deney grupları içinde karşılaştırılmış sonuçlar Tablo 4.4.'de sunulmuştur. Grandus B-one; 7.gün, 14. gün ve 28.gün skor düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Anlamlılığın hangi dönemden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 7.gün skor düzeylerine göre, 14 ve 28. gün skor düzeylerinde görülen artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. ($p<0.05$). 14. gün skor düzeylerine göre, 28. gün skor düzeylerinde artışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p=0.030$).

TTCP; 7.gün, 14. Gün ve 28.gün skor düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Anlamlılığın hangi dönemden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; TTCP grubunda 7.gün skor düzeylerine göre, 14 ve 28. gün skor düzeylerinde görülen artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. ($p<0.05$). 14. gün skor düzeylerine göre, 28. gün skor düzeylerinde artışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p=0.040$).

Pozitif kontrol; 7.gün, 14. Gün ve 28.gün skor düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Anlamlılığın hangi dönemden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Pozitif kontrol grubunda 7.gün skor düzeylerine göre, 14. Gün skor düzeyindeki artışın anlamlı düzeyde olmadığı ($p=0.059$) fakat 28. gün skor düzeylerinde görülen artışların anlamlı düzeyde olduğu gözlenmiştir. ($p=0.025$). 14. gün skor düzeylerine göre, 28. gün skor düzeylerinde artışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p=0.020$).

Tablo 4.5. Deneyssel gruplar arasında ölçümlerinin karşılaştırılması

	7. gün	14. gün	28. gün
	M[min maks]	M[min maks]	M[min maks]
Grandus B-one	0 [0 1]	3 [2 4]	7 [4 9]
TTCP	0 [0 1]	3 [2 3]	9 [4 10]
Pozitif Kontrol	0 [0 1]	2 [1 3]	6 [3 8]
p¹	0,569	0,008	0,027
Grandus-TTCP p ²	-----	0,001	0,097
Grandus-Poz. Kontrol p ²	-----	0,082	0,008
Poz. Kontrol-TTCP p ²	-----	0,403	0,302

Deney grupları arasında tekrarlı ölçümlerde kaynama skorlarının karşılaştırılmış sonuçlar Tablo 4.5.'de sunulmuştur. Gruplar arasında. 7. gün kırık kaynama skorlarında anlamlı düzeyde farklılıklar gözlenmemiştir ($p=0,549$).

14. gün kaynama skorlarında, Grandus B-one grubundaki kaynama skoru 3 [2 4], TTCP grubundaki kaynama skoruna 3 [2 3] kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,001$). Diğer gruplarda anlamlı düzeyde farklar gözlenmemiştir.

28. gün kaynama skorlarında, Grandus B-one grubundaki kaynama skoru 7 [4 9], Pozitif kontrol grubundaki kaynama skoruna 6 [3 8] kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,008$). Diğer gruplarda anlamlı düzeyde farklar gözlenmemiştir.

4.5.2. Biyokimyasal İstatistiksel Bulgular

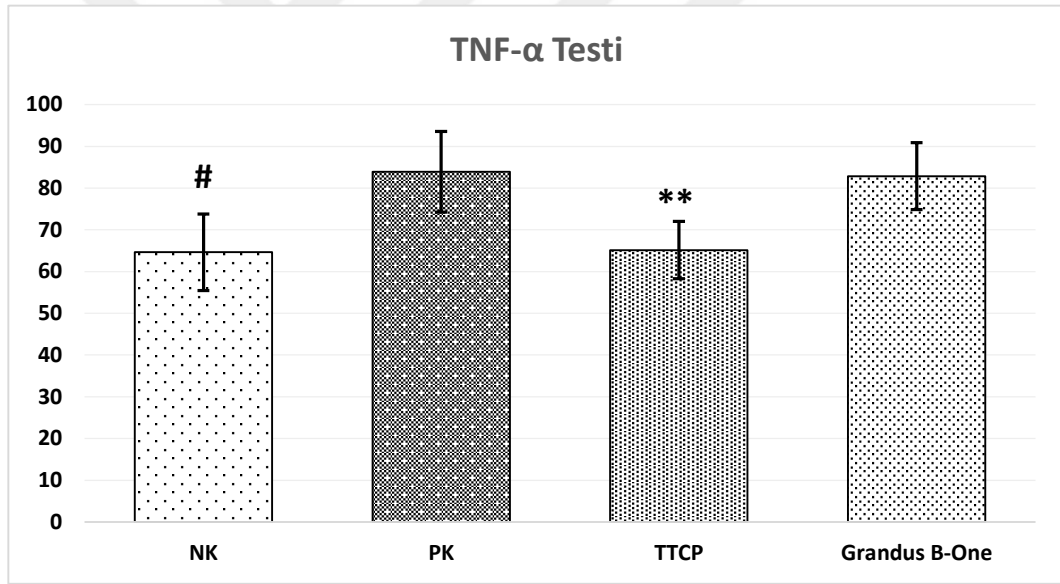
One way Anova Post-Hoc Tukey testine göre 0,05 anlamlılık var.

işareti, Negatif kontrolün Pozitif kontrole göre $p<0,05$ anlamlılığını gösterir.

işareti, Negatif kontrolün Pozitif kontrole göre $p<0,001$ anlamlılığını gösterir.

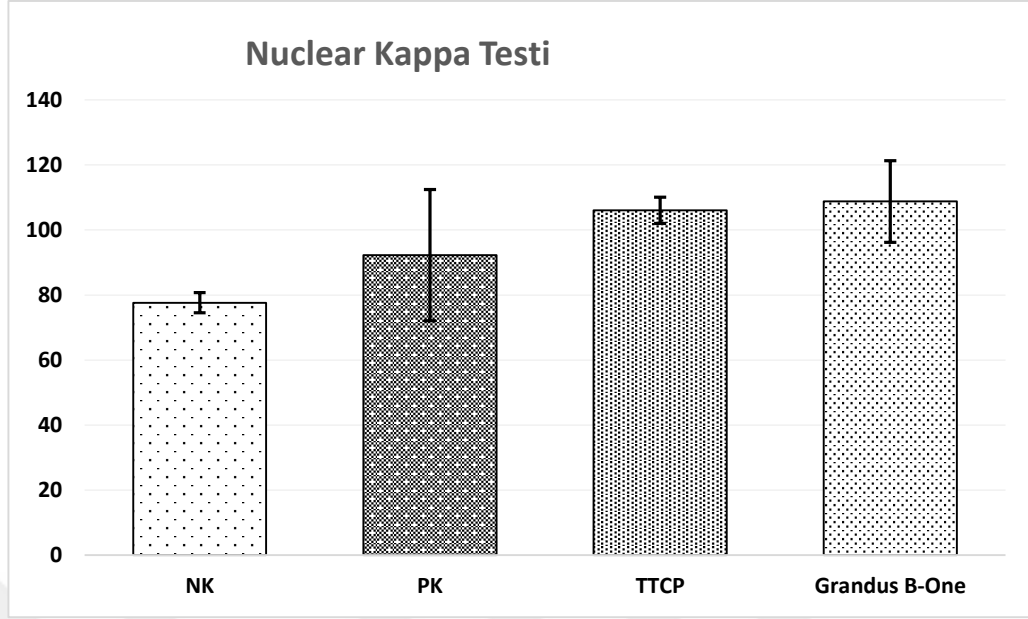
** işareti, tedavi grubunun pozitif kontrole göre $p<0,05$ anlamlılığını gösterir.

Şekil 4.19. ELISA tastine göre gruplar arası anlamlılık işaretleri



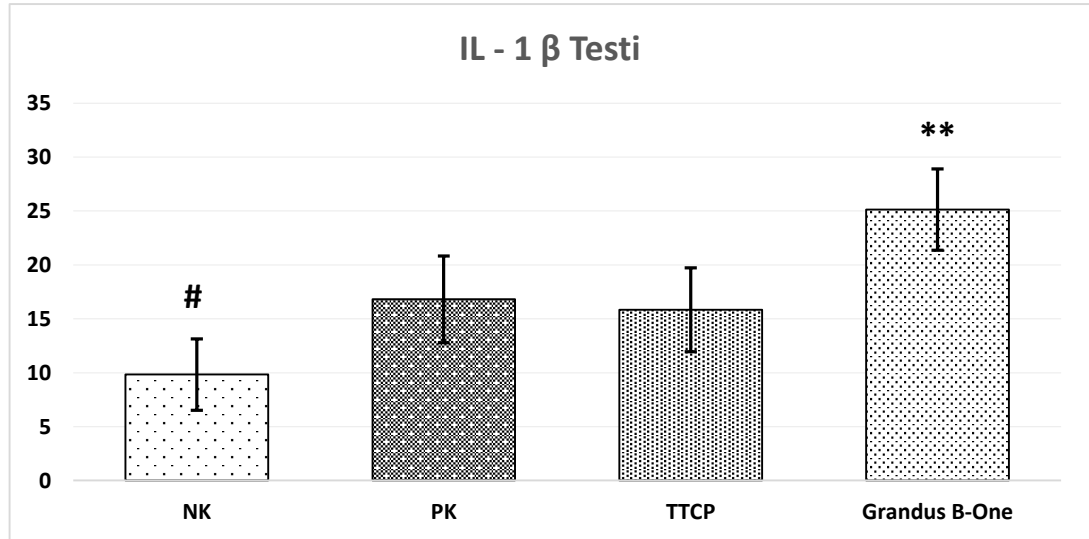
Şekil 4.20. TNF-a ELISA testi analizlerinin gruplarda dağılımı

One way Anova Post-Hoc Tukey testine göre 28. gün tüm ratlardan alınan kanlarda yapılan TNF-a ELISA testi sonuçlarında Negatif kontrol grubu sonuçlarının Pozitif kontrol grubu sonuçlarına göre $p<0,05$ anlamlı olduğu ve tedavi grubu olan TTCP'nin pozitif kontrol grubuna göre $p<0,05$ anlamlı olduğu gösterilmiştir.



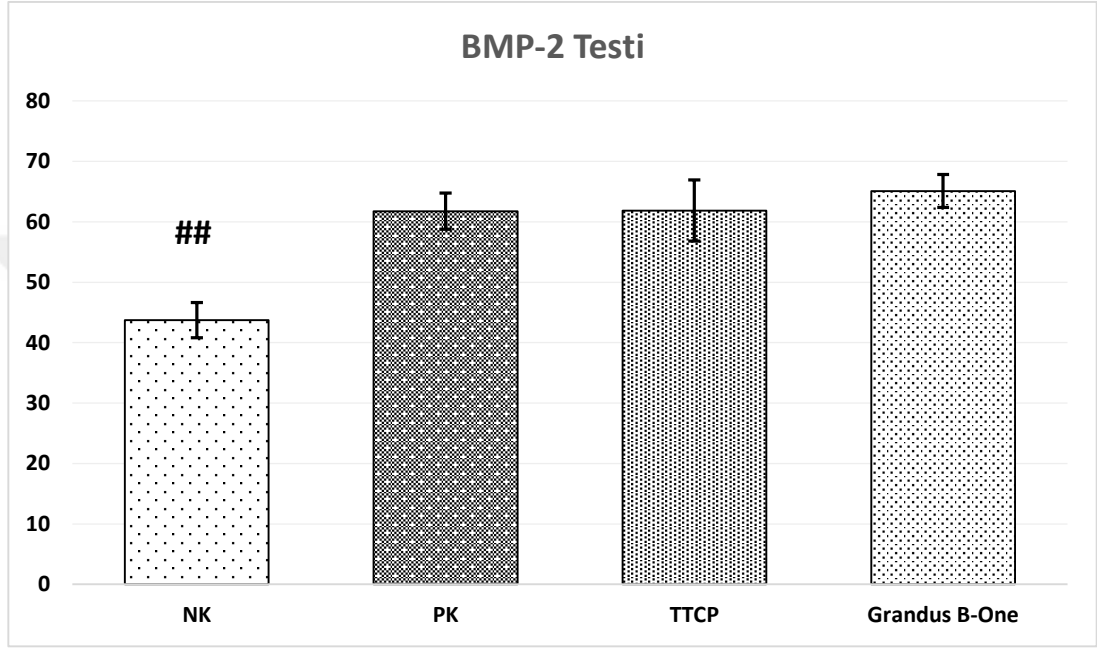
Şekil 4.21. Nükleer Kappa elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı

One way Anova Post-Hoc Tukey testine göre 28. gün tüm ratlardan alınan kanlarda yapılan NFkB ELISA testi sonuçlarında gruplar arasındaki farklarda istatistiksel olarak anlamlılık gösterilememiştir.



Şekil 4.22. IL-1B ELISA testi analizlerinin gruplarda dağılımı

One way Anova Post-Hoc Tukey testine göre 28. gün tüm ratlardan alınan kanlarda yapılan IL-1B ELISA testi sonuçlarında Negatif kontrol grubu değerlerinin Pozitif kontrol grubu değerlerine göre $p<0,05$ anlamlı olduğu ve tedavi grubu değerlerinin pozitif kontrol grubu değerlerine göre $p<0,05$ anlamlı olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.23. BMP-2 elisa testi analizlerinin gruplarda dağılımı

One way Anova Post-Hoc Tukey testine göre 28. gün tüm ratlardan alınan kanlarda yapılan BMP-2 ELISA testi sonuçlarında Negatif kontrol grubu değerlerinin Pozitif kontrol grubu değerlerine göre $p<0,05$ anlamlı olduğu gösterilmiştir. Diğer gruplar arası anlamlı fark gösterilmemiştir.

4.5.3. Histopatolojik İstatistiksel Bulgular

İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler SPSS 20.00 programı ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılık nonparametrik testlerden olan Kruskal Wallis ile farklılığı oluşturan grup ise Mann Whitney U testi ile belirlendi. ($p < 0.05$).

Hematoksilen-Eozin ile yapılan boyamada inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, yeni damar oluşumu, fibrosit/fibroblast aktivitesi, kondrosit/kondroblast aktivitesi gibi bulgular tespit edildi. Tespit edilen bulgular açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkların olduğu görüldü (Tablo 4.6.- $p<0.05$).

Tablo 4.6. Hematoksilen-Eozin ile yapılan boyamada gruplara göre histopatolojik bulgular

Gruplar	İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	Ödem	Yeni damar oluşumu	Fibrosit/fibroblast aktivitesi	Kondrosit/kondroblast aktivitesi
PK	2,83±0,40 ^a	2,66±0,51 ^a	1,00±0,00 ^a	1,16±0,40 ^a	0,33±0,51 ^a
Grandus B-One	2,00±0,00 ^b	1,83±0,40 ^b	0,83±0,00 ^a	1,83±0,40 ^b	0,33±0,51 ^a
TTCP	1,16±0,40 ^c	1,00±0,00 ^c	2,66±0,51 ^b	2,83±0,40 ^c	2,66±0,51 ^b

^{a,b,c} Aynı sütunda bulunan harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

Hematoksilen-Eozin ile yapılan boyamada histopatolojik olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, yeni damar oluşumu, fibrosit/fibroblast aktivitesi, kondrosit/kondroblast aktivitesi gibi bulgular tespit edildi. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından PK, Grandus B-One ve TTCP grupları arasındaki farklılıklar istatistik incelemede anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Ödem açısından PK, Grandus B-One ve TTCP grupları arasındaki farklılıklar istatistik incelemede anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Fibrosit/fibroblast aktivitesi açısından PK, Grandus B-One ve TTCP grupları arasındaki farklılıklar istatistik incelemede anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Yeni damar oluşumu açısından PK ve Grandus B-One grubu arasında anlamlı fark gösterilememiştir ($p>0.05$). Yeni damar oluşumu açısından TTCP grubu, PK ve Grandus B-One grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0.05$) göstermiştir. Kondrosit/kondroblast aktivitesi açısından PK ve Grandus B-One grubu arasında anlamlı fark gösterilememiştir ($p>0.05$). Kondrosit/kondroblast aktivitesi açısından TTCP grubu, PK ve Grandus B-One grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0.05$) göstermiştir.

Masson's Trichrome ile yapılan boyamada fibröz doku ile kıkırdak doku oluşumunun şekillendiği tespit edildi. Tespit edilen bulgular açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar görüldü (Tablo 4.7, $p<0.05$).

Tablo 4.7. Masson's Trichrome ile yapılan boyamada gruplara göre histopatolojik bulgular

Gruplar	Fibröz doku oluşumu	Kıkırdak doku oluşumu
PK	1,16±0,40 ^a	0,33±0,51 ^a
Grandus B-One	2,00±0,00 ^b	0,16±0,40 ^b
TTCP	2,83±0,40 ^c	1,83±0,40 ^c

^{a,b,c} Aynı sütunda bulunan harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

Masson's Trichrome ile yapılan boyamada fibröz doku ile kıkırdak doku oluşumunun şekillendiği tespit edildi. . Fibröz doku ile kıkırdak doku oluşumu açısından PK, Grandus B-One ve TTCP grupları arasındaki farklılıklar istatistik incelemede anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Kemik, iskelet sisteminin en önemli yapı taşı olmakla birlikte, metabolik olarak aktif, yapısal olarak da dinamik canlı bir yapıdır (1). Kemik doku metabolik, endokrin ve hematolojik sistemlerde önemli rol oynayan, hayati önemi olan organları koruyan ve iskelet sistemine hareket kazandıran, minerallerden oluşan bağ dokudur (2,3). İskelet sistemindeki kasların kasılmasıyla oluşan kuvvetleri, kaldıraç sistemi oluşturarak bedensel hareketlere dönüştürür (4). Kırık iyileşmesi; kendine has yara onarımı ile iyileşen, karmaşık ama iyi organize edilen bir dizi hücresel ve moleküler olayları içerir (6). Kemik fibröz skar dokusu oluşturmada iyileşebilen birkaç dokudan biridir. Kırık iyileşmesi direkt veya dolaylı yolla oluşabilmektedir (7). Kemik kırıkları, travmatik nedenlerle hastane yatışlarının en sık nedenidir (5,8). Bu kırıklar; özellikle yüksekten düşmeler, trafik kazaları gibi yüksek enerjili travmalar nedeniyle oluşur (8). Kırık oranını arttıran önemli faktörler de ileri yaş ve osteoporozdur. Bu faktörler çalışan ileri yaş nüfus da kemik kırıklarının yaygın olmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla bu gruptaki kırık tedavileri hem maliyet hem de verimlilik kaybına sebebiyet vermektedir. Bu hastaların kırık tedavilerinde yükselen maliyeti; kırık kaynama süresi ve rehabilitasyon süresi de önemli miktarda arttırmaktadır (9). Kırık iyileşmesi tamamen çözülememiş karmaşık bir sistem üzerinden sağlanmaktadır ve kemik kırıkları günümüzde halen önemli bir sorun oluşturmaktadır. Kırık iyileşmesini aydınlatmak, kırık iyileşmesini hızlandırmak, kırık kaynamasını sağlamak adına çokça çalışma vardır. Bu nedenlerden dolayı çalışmamız deneysel kırık modelinde kırık iyileşmesini değerlendirmek üzerine planlanmıştır.

Kırık iyileşmesini arttırmak için birçok yöntem denenmiştir. Özellikle defektif kemik kırıklarında kemik iyileşme sorunları yaygındır. Literatürde birçok mineral ve ilacın kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elektriksel uyarı, düşük yoğunluklu ultrasonografi, ekstrakorporeal şok dalgası tedavisi gibi birçok tedavi yöntemi ile C vitamini, D vitamini, paratiroid hormonu, montelukast, bor gibi birçok ilaç ve lokal uygulanan biyolojik iyileşme faktörleri, osteojenik materyaller, osteokondüktif materyaller, büyüme faktörleri kırık iyileşmesini uyarmak ve iyileştirmeye yardımcı olmak için kullanılmıştır. Tetrakalsiyum fosfat ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) (TTCP) kemik kusurlarını onarmak için kullanılan bazı

hidroksiapatit kalsiyum fosfat çimentolarının oluşumunda kullanılan lokal uygulanan biyolojik iyileştirme faktörleri grubunda yer alan osteokondüktif bir bileşiktir (5,70).

İnsan, var olduğu zamandan başlayarak sürekli olarak doğayı anlamaya, insanı anlamaya, insanın doğadaki yerini anlamaya çalışmıştır. Devam eden bu süreç içerisinde hastalıklar ve hastalıkların tedavilerini anlamlandırılmaya ve geliştirilmeye çalışılmıştır. Bunun için de gözlemsel çalışmalar ve deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmuştur. Bu deneysel çalışmalarda deney hayvanlarının çok önemli yerleri vardır (14). Deney hayvanları üzerinde çeşitli hastalık modelleri oluşturulmuş ve sonuçları araştırılmıştır. Ortopedi alanında da en çok kırık modelleri üzerine deneysel çalışmalar yapılmıştır. Tarihte ilk olarak 1970 de Jackson ve arkadaşları tarafından ratlar üzerinde kapalı kırık oluşturulmuştur. 1984 yılında Bonnarens ve Einborn, Jackson ve arkadaşları tarafından oluşturulmuş model üzerinden kırık modeli tanımlamışlardır (16,17). Milattan önceki yıllara dayanan kırık iyileşmesi sorunu halen daha net olarak aydınlatılamamıştır. Kemik kırıklarında, kalsiyum fosfat bileşiklerden Tetrakalsiyum Fosfat'ı ana bileşeni olarak kullanan Grandus B-One' ın kırık tespiti ve kırık kaynaması üzerine etkisini araştırmak ve insanlar üzerinde oluşturabileceği etkileri, yan etkileri ve biyouyumluluğu hakkında fikir edinebilmek için bu deneysel çalışma tercih edilmiştir.

Tarihte ilk olarak 1970 de Jackson ve arkadaşları tarafında ratlar üzerinde kapalı kırık oluşturulmuştur. 1984 yılında Bonnarens ve Einborn, Jackson ve arkadaşları tarafından oluşturulmuş model üzerinden kırık modeli tanımlamışlardır (16,17). Kırık iyileşmesini ve kırık iyileşme sürecini incelemek için yapılan çalışmaların çoğunda rat ve fare modelleri kullanılmaktadır. Ratların kullanılmasının bir sebebi de ratlarda iyileşmenin daha çabuk olması ve kolay üretilebilir olmasıdır (18,19). Literatürde birçok farklı hayvan kırık çalışmalarında deneysel amaçlı olarak kullanılmıştır. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel kırık çalışmalarının %38'i ratlarda yapılmıştır (95). Rat kullanma nedenimiz, şartlara kolay uyum sağlamaları, enfeksiyona dirençli olmaları, dayanıklı olmaları, metabolizmalarının hızlı olması ve izogenik ratların daha kolay temin ediliyor olmasıdır (90). Ratların kullanıldığı birçok kırık modeli deneysel çalışmasının olması da rat kullanmamızda etkili olmuştur.

Dişi ratlarda hormonal seviyeler arası dönemsel dengesizlik görülebileceği için, bütün dişilerin hormonal sikluslarının aynı zamana denk gelmesinin zor olduğu için, bu durumun gruplar arası kırık kaynamasını farklı etkileyeceği düşünüldüğü için ve kırık iyileşmesini standardize edebilmek için erkek cinsiyet rat kullanılmıştır (90).

 alışmalar, deney hayvanlarının yaşlarının kırık iyileşmesi üzerinde önemli rolü olduğunu göstermiştir. Yaş arttıka kırık iyileşme süreci de uzamaktadır. Ergen dönem yani 6 haftalık ratlar 4 hafta içinde kırık boşluğunu doldurabilmek için kemik oluşturabilirler. 26 haftalık ratlarda aynı kırık boşluğunun kemik ile doldurulabilmesi için 10 haftaya ihtiyaç vardır (90). Çalışmamızda 9 haftalık erkek ratlar kullanılmıştır.

Ratlar üzerinde yapılan birçok kırık deneyi mevcuttur. Bu kırıklar kabaca açık kırık modeli (96–98) ve kapalı kırık modeli (99–101) olarak ayrılabilir. Kemiklerde açık kırık olması kırık hattındaki hematomun boşalmasına kırık kontaminasyonuna neden olmaktadır ve kırık kaynamasını yavaşlatmaktadır. Cerrahi sırasında aşırı diseksiyon yapılması, kırığın yetersiz tespiti kırık kaynamasını azaltmaktadır (65). Açık kırık modelinde kapalı kırık modeline göre, ekstra osseoz vasküler yapılar etkilenir, periost ve kortikal yapılar mekanik ve termal olarak etkilenir, kemik doku çevresi kaslar travmatik olarak etkilenir, kırık hematomu etkilenir. Ancak açık kırık modelinde tam anatomik redüksiyon yapılabilmesi ya da farklı defektif modeller oluşturulabilir olması nedeniyle yüksek standardize edilmiş kırıklar oluşturulabilir. Açık kırık modelinde tespitin intramedüller olarak yapılması da stabilizasyonu etkileyeceği için gecikmiş kaynamaya neden olmaktadır. Klein ve arkadaşlarının osteotomi ve açık kırık modeli karşılaştırması çalışmasında, osteotomi modelinde 5 hafta sonra yapılan histolojik örneklerde sadece kıkırdak ve fibröz doku tarafından köprülenen osteotomi boşluğu gösterilmiştir (102). Açık kırık modeli tercih etme nedenimiz, tüm ratlarda kırık modelini ve buna bağlı kallus oluşumunu standardize etmektir ve daha duyarlı karşılaştırma yapmamıza imkan vermesidir. Greft uygulamasının kırık hattına lokal yapılacak olması da açık kırık modelini se memizde etkili olmuştur. Çalışmamızda da radyolojik olarak 4. haftada kırık hattında kallus dokusu oluştuğu gösterildi ancak remodelasyon tam olarak başlamamıştı ve histopatolojik olarak da kırık modeli oluşturulan tüm gruplarda 4. haftada fibröz doku ve kıkırdak doku gösterilmiştir.

Literatürde kırıklarda intramedüller tespit çalışmalarına çok rastlamaktayız (96,98,103,104). İntramedüller tespit uygulamasının, malzeme teminin ve kullanımının kolay olması ve çok kullanılan bir yöntem olmasından dolayı tarafımızca tercih edilmiştir.

Deneyisel kırık modellerinde intramedüller (İM) tespit modelini insan kemik fiksasyon modeline daha benzer yapabilmek için İM pinin rotasyonunu ve eksenel hareketini azaltmak gerekmektedir. İM pinin eksenel ve rotasyonel hareketini yok etmek ve pinin kemik medullasında mikro hareketlerinden kaynaklanabilecek ikincil yaralanmaları engellemek için kilitleme vidaları veya sıkıştırma vidaları kullanılabilir (17). Çalışmamızda sekonder kemik kaynaması beklediğimiz için, uyguladığımız Grandus B-One malzemesinin kırık uçları arasında yapıştırıcı görev yapabileceğini beklediğimiz ve hareketi azaltacağını düşündüğümüz için İM tespitinde rotasyon veya hareketi engellemeye dayalı ekstra materyal kullanmadık. Grandus B-One kullanılan grubun radyolojik ve histopatolojik verileri pozitif kontrol grubuna göre daha anlamlı olarak gösterilmiştir ($p=0,008$ ve $p<0.05$).

Bu çalışmada K teli kırık hattından retrograd uygulanmıştır. Daha sonra K teli kırığın distaline ilerletilmiştir. K teli eklemlere zarar vermeden uygulanmış ve rijit olmayan tespit sağlanmıştır (87). Eklemlere zarar verilirse ratların mobilize olmasının gecikebileceği ve ratlarda ağrıya bağlı zorluklarla karşılaşacağı düşünülmüştür. Bu nedenlerle K telini ekleme çıkarılmadan kırık tespiti gerçekleştirilmiştir.

Stabilite ve kırık iyileşmesi arasında denge vardır. Stabilite gerinimi belirler. Gerinim de iyileşme tipini belirler. İki türlü stabiliteden bahsedilebilir. Göreceli stabilite; kırık bölgesinin küçük miktarda hareketine izin verir ve kallus dokusu ile iyileşme sağlanır. Mutlak stabilite de ise kırık bölgesinin nerdeyse hiç hareketine izin vermez ve kemiğin doğrudan iyileşmesine olanak sağlar, kallus oluşmaz. %2'den az gerinim varlığında primer kemik iyileşmesi olur ve endosteal iyileşme ile kemik kaynar. %2-%10 arasındaki geriniminde sekonder kemik iyileşmesi görünür ve enkondral ossifikasyon ile kemik kaynar. %10'un üzerinde gerinim olması kemik oluşumuna engel olur. Gerinim, kırık aralığı mesafesindeki değişimin kırık aralığı mesafesince bölünmesi olarak ifade edilir. En yüksek kırık gerinimi, arada boşlukla

beraber fikse edilmiş basit kırıklarda görülür yani tam redükte edilmemiş tespitlerde görülür (20,72). Yaptığımız çalışmada intramedüller tespit yöntemi kullanıldığı için kırık hattında harekete izin verilmiştir. Kırık bölgesindeki hareketin %2 ila %10 arasında olması sağlanmıştır. Sekonder kemik iyileşmesi elde etmek amaçlanmıştır. Radyolojik görüntülere göre tüm gruplarda kallus dokusu oluşumu gösterilmiştir.

Özbay ve arkadaşlarının yaptığı rat açık kırık osteotomi modelinde deney 28. günde sonlandırılmıştır ve biyomekanik test yapılmamıştır (105). Kratzel ve arkadaşları tarafından yapılan ratlarda tibia açık kırık ve intramedüller tespit deneysel çalışmasında, postop 28. gün sakrifiye edilen tibia örnekleri stabil olmamaları, biyomekanik teste uygun olmamaları ve çeşitli öngörülemeyen zorlukları nedeniyle istatistiksel analize eklenememiştir. Ancak bu gruptaki değer ortalamaları diğer gruplardan açıkça çok daha düşük olduğu görülmüştür. Kratzel ve arkadaşlarının yaptığı ratlarda intramedüller tespitli açık tibia osteotomi modelinde postop 84. güne kadar histolojik olarak kaynamama veya geç kaynama bulguları gösterilmiştir (106). Çalışmamızda 28. gün sakrifiye edilen femurlar biyomekanik teste tabi tutulmadı. Wingerter ve arkadaşlarının ratlarda açık kırık modelinde K teli fiksasyonu ve plak fiksasyonun karşılaştırdığı deneysel çalışma 28 gün olarak tasarlanmıştır. 28. günün sonunda K teli fiksasyon grubunda histolojik olarak organize yeni kemik oluşumuna dair kanıt gösterilememiştir. Biyomekanik test yapılmamıştır. K teli fiksasyonunun kararsız oluşu nedeniyle kaynamayı geciktirdiği gösterilmiştir (107). Kapalı kırık modelinde kırık iyileşmesi, yaralanmanın oluşturulmasından itibaren 6 ila 8 hafta içerisinde tamamlanır. Kırık bölgesinde kallus oluşumu ilk 3 haftadan itibaren görülmeye başlar. Kemik mineralizasyonun artarak 6. haftada tam kemik stabilizasyonu sağlanmış olur (16). Bu çalışmanın bitiş noktası (yani 4 hafta), literatürde bildirilen kırık iyileşmesi karşılaştırma çalışmaları süresine dayalı olarak tahmin edilmiştir (94,108–110). Çalışmada gruplar arasında ki akut kırık iyileşmesini karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Kemik kırıklarını incelemek için kullanılan biyomekanik testler arasında ‘3 nokta eğilme’ ve ‘4 nokta eğilme’ testleri kullanılmaktadır. Üç nokta eğilme testi kemiğin orta hattında yüksek makaslama stresi meydana getirebilmektedir ve transvers kırık oluşturmaktadır. Üç nokta eğilme testinde görülen eğilmenin, makaslama

kuvvetleri ve eğme streslerinin toplamıyla oluştuğunu düşünülmektedir. Normal ideal şartlarda bu şekilde bir etkileşim istenmez. Makaslama kuvvetinin olmaması ya da önemsiz olabilmesi için, biyomekanik teste tabi tutulan kemiğin uzunluk/kalınlık oranının en az 20:1 olması gerekmektedir. Rat kemiklerinde bu oran 10:1 dir. Tüm bu sebeplerden dolayı rat kemiklerinde biyomekanik testlerden elde edilen sonuçlarda gerilme yüksek, esneklik katsayısı da düşük çıkmaktadır. Üç nokta eğilme testi uygulamasında bu sorunları en aza indirmek için kemik altına koyulan destekler arası mesafe önemlidir. Destek noktaları arası mesafe kemiğin orjinine ve geometrisine göre belirlenirse makaslama kuvvet azalacaktır. Destek noktaları arası mesafe 15 mm olursa oluşan eğilme kuvveti çok büyük oranda (%85-90) eğme stresi ile sağlanmış olur. Dört nokta eğme testinde yük uygulama mekanizması nedeniyle makaslama kuvvet oluşmaz. Ancak her noktaya eşit kuvvet uygulanması gerekmektedir. Bu şart düzgün geometrili materyaller için uygulanabilir. Tüm bu sebeplerden dolayı femur ve tibia gibi simetrik olmayan materyallerde üç nokta testi daha çok kullanılmaktadır (111). Bu nedenlerle çalışmamızda üç nokta eğme deneyi planlamıştık. Ancak 4. Haftada deneyi sonlandırdığımız için femurlar biyomekanik test yapmaya uygun değildi. Ratlarda yapılan kapalı kırık modellerinde kemik kaynamasını ortalama 4 hafta olarak bildirilmiştir. Deney süresi daha uzun tutularak biyomekanik test yapılabilir. Çalışmamızın asıl amacı gruplar arası kırık kaynamasına etkiyi karşılaştırmak olduğu için 4 hafta süre daha uygun olarak değerlendirilmiştir. Daha çok deneysel çalışma yapılarak, rat sayısını daha fazla tutarak farklı haftalarda sakrifikasyon yaparak biyomekanik testler yapılabilir.

Hayvanlar üzerinde yapılan, hemorajik şok modelinde geleneksel resusitasyona ek olarak doğrudan peritoneal resusitasyon çalışmasında, doğrudan peritoneal resusitasyon uygulamasının hemorajik şokun çok yönlü patofizyolojisi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Doku perfüzyonu, immünomodülasyon ve anti-sıvı sekestrasyonu gibi etkileri gösterilmiştir (89). Deneysel çalışmamızda cerrahi uygulanan ratlara perop vücut hemostazı sağlamak için intraperitoneal sıcak ringer laktat uygulaması yapılmıştır. Bu uygulamanın ratları postop dönemde daha erken normal hayata döndürdüğünü düşünmekteyiz.

Tibia kırık modeli yapılan deneysel çalışmalarda fibula sağlam bırakılarak rotasyon oluşması engellenmiş, kaynamaya destek sağlanmış ve daha standart model ortaya çıkarılmıştır (96,98). Uyguladığımız greftin, kırık bölgesindeki yüzey alanı büyüdükçe daha etkili olacağı ve greftin yapıştırma özelliği sayesinde tespite destek olacağını düşündüğümüz için kırık deneyi femur bölgesinde uygulanmıştır.

Histopatolojik değerlendirmede akut kırık iyileşmesine baktığımız ve gruplar arası karşılaştırmayı amaçladığımız için inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, yeni damar oluşumu, fibrosit/fibroblast aktivitesi, kondrosit/kondroblast aktivitesi, fibröz doku ve kırık dokusu oluşumu gibi histopatolojik bulgular semikantitatif yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olacak şekilde değerlendirme yöntemi kullanılmıştır.

Radyolojik değerlendirmede kırık iyileşmesini değerlendirmek için Modifiye Lane ve Sandhu sınıflaması kullanılmıştır (91). Kırık çalışmalarının çoğunluğunda Modifiye Lane ve Sandhu sınıflaması kullanıldığı için ve radyolojik incelemede en sağlıklı değerlendirmenin Modifiye Lane ve Sandhu sınıflaması olduğunu düşündüğümüz için çalışmada bu puanlama kullanılmıştır. Daha objektif ve hassas değerlendirme yapılabilmesi için çalışma ekibinde olmayan ve ortopedi uzmanı olan üç kişi (YSD, AEÖ, MK) tarafından kör skorlama yapılmıştır.

Kalsiyum fosfatlar ortopedi de potansiyel klinik uygulamaları olan yeni nesil kemik greftleri arasındadır. Kalsiyum fosfatlar biyouyumlulukları, osseointegrasyon ve osteokodüktif özellikleri nedeniyle kemik onarımı için ortopedi alanında yaygın kullanılan malzemelerdir (10–12). Benzer şekilde çalışmamızda kullandığımız TTCP ve Grandus B-One'ın kırık kaynamasına olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. TTCP ve Grandus B-One'ın kırık iyileşmesini radyolojik ve histopatolojik ölçeklerde arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre Grandus B-One ve TTCP'nin biyouyumlu olduğu, osteokodüktif ve osteointegrasyon potansiyellerinin olduğu gösterilmiştir. Ratların sakrifikasyon aşamasında ve histopatolojik incelemelerde TTCP ve Grandus B-One'ın kaslara ve çevre dokulara yapışmadığı, nekroza yol açmadığı ve fibrizise neden olmadığı gösterilmiştir.

Kalsiyumfosfat çimentolar (CPC) ile kompozit yapı iskeleleri oluşturulmuş. Bu kompozit iskeleler osteoblast ve benzeri hücrelerin yapışmasını, yayılmasını, çoğalmasını, canlılığını desteklemiş ve sitotoksik özellik göstermemiştir (112). Tetrakalsiyum fosfat ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) (TTCP) kemik kusurlarını onarmak için kullanılan bazı hidroksiapatit kalsiyum fosfat çimentolarının oluşumunda kullanılan lokal uygulanan biyolojik iyileştirme faktörleri grubundaki osteokondüktif bir bileşiktir (5,70). Benzer şekilde çalışmamızda Grandus B-One ve TTCP'nin osteokondüktif olduğu, kemiğin canlılığını ve hücrelerin çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir.

Yapılan bir hayvan çalışmasında magnezyumfosfat kompozit (MPC) ile magnezyumfosfat/tetrakalsiyumfosfat kompozit (TTCP/MPC) karşılaştırmalı olarak çalışılmış. TTCP/MPC'nin MPC'ye göre daha iyi mekanik özelliklere sahip olduğu gösterilmiş. TTCP'nin MPC'ye eklenmesi ile tavşanlarda oluşturulan kemik kusurlarındaki yeni kemik oluşumunun arttığı gösterilmiş (113). Çalışmamızda TTCP ve Grandus B-One'ın PK'ya kıyasla kemik oluşumunu desteklediği ve hızlandırdığı gösterilmiştir.

TTCP türevi kalsiyum fosfat çimentoların uygulandığı tavşan femur defektlerinde, defekt olan bölgede 4. haftada yeni kemik oluşumları, aktif osteoblast benzeri hücreler yeni damarlanmalar ve osteositler görülmüş. 12. haftada uygulanan çimento neredeyse tamamen emilmiş ve homojen bir görünüm izlenmiş. 24. haftada ise neredeyse yeni sağlam kemik dokusu olduğu gözlenmiş. Bu uygulamada çimento etrafında nekrotik doku, kapsül, fibrotik doku, enfektif odak oluşmamış (114). Benzer olarak çalışmamızda greftler etrafında nekrotik doku, kasül, fibrotik doku ve enfektif odak gösterilememiştir. Benzer olarak çalışmamızda histopatolojik olarak özellikle TTCP grubunda yeni damar oluşumları gösterilmiştir. 4. haftada sonunda yapılan histopatolojik incelemede PK ve Grandus B-One grubunda hafif düzeyde, TTCP grubunda şiddetli düzeyde fibrosit/fibrosit aktivitesi, kondrosit/kondrosit aktivitesi, yeni damar oluşumu görüldü. Çalışmamızda farklı olarak 4. haftada kemikleşme ve osteositler gösterilememiştir. Bunun nedeni olarak çalışmayı açık kırık olarak planlamamız ve kırık hattında harekete izin vermemiz olarak düşünmekteyiz. Takip süresinin kısa tutulması da tamamen kemikleşme aşamasını gösteremememize neden

olmuştur. Çalışmamızda gruplar arası akut kırık kaynamasını değerlendirmek istediğimiz için takip süresini kısa tuttuk ancak daha uzun takip süresi ve daha stabil kırık tespiti ile sonuçların araştırılması planlanmaktadır.

Bildiğimiz kadarıyla ıslak alanda kemiğe yapışabilen fizyolojik ve biyolojik olarak parçalanabilen yüksek yapışkanlığa sahip biyomateryal bildirilmemiştir veya klinik kullanımda değildir (11). Çalışmamızda kullandığımız Grandus B-One materyal ıslak alanda uygulamaya uygun olarak görüldü. Grandus B-One materyalinin yapıştırıcılığı yüksek oranda değildi, kırık hattındaki kemikleri birbirine yapıştırdığı ve implanata yapışmadığı görülmüştür. Yapıştırma açısından prelinik ve klinik biyomekanik testlerin yapılması gerekmektedir. Histolojik verilere göre TTCP ve Grandus B-One'ın biyouyumlu olduğu görülmüştür.

Greft iyileşmesi aşamalarını 5 aşama olarak değerlendirebiliriz. İlk aşama inflamasyon aşaması kemotaksisin nekroz ile uyarıldığı ve hematoma oluştuğu evredir. İkinci aşamada mezenkimal hücrelerin inflamasyonu, göçü, proliferasyonu ve greft içinde, çevresinde fibrovasküler doku oluşumudur. Üçüncü aşamada greft içine damarlanma oluşur. Dördüncü aşamada greft yüzeyinde lokal osteoklastik yıkım oluşur. Beşinci aşamada ise greft yüzeylerinde intramembranöz ve endokondral kemik oluşumu gelişir. Yeniden şekillenme evresi son aşamadır ve yıllarca sürer. Kemik grefti yeterli mekanik stabiliteye ulaşmazsa revaskülarizasyon ve hücre farklılaşması etkilenir, greft birleşmesi engellenir (20,73). Benzer şekilde çalışmamızın 4. haftasında yapılan histopatolojik verilere göre inflamasyon ve ödem PK grubunda en şiddetli olarak değerlendirilmiştir. Yeni damar oluşumu, fibrosit/fibroblast aktivitesi, kondrosit/kondroblast aktivitesi, kırıkta oluşumu TTCP grubunda en şiddetli olarak değerlendirilmiştir. Fibröz doku oluşumu en şiddetli olarak TTCP grubunda, orta şiddetli olarak Grandus B-One grubunda ve en düşük olarak da PK grubunda görülmüştür. Greft iyileşmesi aşamalarına göre PK grubu ve Grandus B-one grubu 2. aşamadan 3. aşamaya geçiş evresinde ve TTCP grubu 3. aşamadan 4. aşamaya geçiş evresinde olarak düşünülebilir. TTCP grubunun daha hızlı kaynama sağladığı, Grandus B-One grubunun orta ve PK grubunun en yavaş kaynama sağladığını düşünmekteyiz.

Hidroksiapatit ve tetrakalsiyum fosfat (TTCP) gibi kalsiyum fosfat bileşikleri seramik matriksler olarak adlandırılır. TTCP' nin olduğu grup enjekte edilebilir seramik çimentolardır. TTCP genellikle karışımların içinde kullanılmıştır. Bu karışımlarla likid macun şeklinde karıştırılıp enjekte edilebilir sementler oluşturulur. Ardından belirgin ısı artışı olmadan sertleşirler. Meydana gelen sertleşmiş materyalin kompresif güçlere dayanıklılığı kansellöz kemiklere eşdeğerdır. Oluşan sertleşmiş materyal kolay rezorbe olan kalsiyum fosfat kristalleri içerir ve osteoklastlar tarafından remodelize edilir. Klinik olarak açık ve kapalı olarak kırık sahasına ve kemik kaybı olan bölgelere uygulanabilirler (75). Benzer şekilde Grandus B-One'ın da kırığa ve kırık bölgesine mekanik destek olabileceğini, defektif kırıklarda mekanik destek sağlayabileceğini ve zayıf kemiklerde kompresif kırıklara karşı koruyucu olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bununla ilgili preklinik ve klinik biyomekanik testlerin yapılıp bu durumun çözüme kavuşturulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Kalsiyum fosfat greftler osteokondüktiftir. Hayvan çalışmalarında kalsiyum fosfatın % 95'inin 26-86 haftada emildiğini göstermiştir. Emilebilir kemik dolgusu olarak kullanılabilir. Kırık hattında sızarak ekleme, çevre dokulara zarar verebilirler (13). Çalışmamızda Grandus B-One ve TTCP'nin kırık hattına uygulanmalarının kolay olduğu ve cerrahi sırasındaki ihtiyaçlarımızı karşıladıkları görülmüştür. Grandus B-One'ın sertleşmesi kısa sürmüştür (<2 dk) ancak kırık hattından taşma oluşturduğu görülmüştür. Kırık hattı dışına taşan malzemenin sertleşme işlemi tamamlandıktan sonra bisturi yardımı ile çıkarılabildiği gözlemlenmiştir. Ancak bu işlem dikkatli yapılması gerekmektedir çünkü sertleşen malzemenin tamamen çıkabileceği görülmüştür. Ratların sakrifikasyonuna, radyolojik görüntülemelere ve histopatolojik değerlendirmelere göre kasların içinde, kırık hattı dışında kemikleşme görülmemiştir. Kaslarda ve çevre yumuşak dokularda nekroz, enfeksiyon görülmemiştir.

Kalsiyum fosfatların kemik çimento yapısında kullanımları ve uygulamaları çok artmıştır. Artmış sıkıştırma mukavemeti, defektif alanları tamamen şeklini alarak dolduran dolgu yapıları bu osteokondüktif malzemelerin kullanımlarını arttırmıştır. Distal radyal metafiz kırığı, tibia plato kırığı, kalkaneus kırığı, kalça kırığı ve omurga kırığında yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda kırıkların onarımının güçlendirildiği, revizyon ihtiyacının azaldığı, hastaların fonksiyonel sonuçlarının

artığı, daha erken yük vermeye imkan sağladığı gibi faydalardan bahsedilmiştir (13,115–119). Benzer olarak çalışmamızda cerrahi uygulama sırasında Grandus B-One'ın kolay şekillendirilebildiği, defektif alanın şeklini alabildiği ve kırık hattına destek olduğu görülmüştür.

Tsai ve arkadaşlarının tavşanlar üzerinde yaptığı deneysel TTCP çalışması sonucunda kalsiyum fosfat implantını çevreleyen dokuda inflamatuvar yanıt, nekroz, fibröz kapsüllenme olmadığı görülmüş. Kalsiyum fosfat implantının kemik doku ile sıkı bağlantı oluşturduğu gösterilmiş. Kalsiyum fosfat implantı içinde, çevresinde osteoblast hücreler, osteositler, kan damarları gösterilmiş. 24 hafta sonrasında kalsiyum fosfat implantının neredeyse tamamen emildiği ve kemik remodelasyonunun tamamlanmak üzere olduğu gösterilmiştir (120). Benzer şekilde çalışmamızda greftin çevresindeki yumuşak dokuda inflamatuvar yanıt, nekroz ve fibröz kapsüllenme görülmemiştir. Fibrosit, fibroblast, kondrosit, kondroblast ve damar oluşumu gösterilmiştir. Çalışma 4. haftada sonlandırıldığı için TTCP ve Grandus B-One'ın tamamen kemikleşmesi gösterilememiştir ancak daha uzun deneysel çalışmalar planlamaktayız.

Klinik olarak uygulanabilir ve kullanılabilir kemik yapıştırıcısında olması gereken özellikler şunlardır. Biyouyumlu ve steril olmalı, yeterli kırık tespiti yapabilmeli, kemik iyileşmesini bozmamalı, kolay ve çabuk uygulanabilir olmalı (ulaşılması zor bölgeler için 10 dakikanın altında uygulama süresi) ve ideal kemik iyileşmesini tamamladıktan sonra toksik metabolit oluşturmada parçalanabilir olmalıdır. Günümüzde kemik tespitlerinde en çok uygulanan yöntem olan implant tedavisine göre ideal kemik yapıştırıcısı fikri daha az ameliyat süresini, daha az kemik adaptasyon durumunu, daha az metal alarım durumunu, daha az implant kaynaklı enfeksiyon durumunu (biyofilim tabaka), daha az tekrar ameliyat durumunu (implant çıkarımı), daha iyi kemik tespiti gibi etmenleri düşündürmektedir ve kemik yapıştırıcısı fikrini cazip hale getirmektedir (121). Deneysel çalışmada yapıştırıcı olarak kullandığımız ürün Grandus B-One steril ve kolay steril edilebilir bir ürün olarak görülmüştür. Kırık tespitinde yeterli olmadığını özellikle kesme kuvvetlere karşı bir implantla beraber uygulanmasının daha güvenilir olabileceğini düşünmekteyiz. Kemik iyileşmesini bozmadığı gösterilmiştir. Kolay uygulanabilir

enjekte edilebilir ve 2 dakika çalışma süresi olduğu çalışmamızda görülmüştür. Ancak bu ürünle ilgili daha net bilgi edinebilmek için daha çok çalışma yapılması gerekmektedir.

Biyobozunur kemik yapıştırıcısı düşüncesi, kırıklarda ve/veya kemik defektlerinde implant kullanılmadan kalıcı kemik tespiti, osteointegrasyon sağlayan ve yerini yeni oluşacak kemik dokusuyla değiştirebilecek ancak bu esnada kemiğin biyomekanik stabilitesini sağlayabilecek biyouyumlu materyal geliştirmektir. Günümüzde ıslak ortamda kemik dokusuna güçlü yapışabilen, biyouyumlu, iyi osteointegrasyon özelliğine sahip biyomateryal bulunmamaktadır. Kemik yapıştırıcıları kesme kuvvetlerine, sıkıştırma kuvvetlerine, gerilim kuvvetlerine karşı dayanıklı mekanik olarak stabil kalabilmesi gerekir. Cerrahi esnasında ürünü uygulayabilmek için yeterli çalışma süresi, sertleşme süresinin çabuk olması, metal implantlara yapışabilmesi, biyouyumlu olması ve biyolojik olarak parçalanabilir olması, ortama veya hastaya toksik metabolit oluşturmaması gerekmektedir (11,122). Çalışmamızda kullandığımız Grandus B-One kemik yapıştırıcısının sayılan birçok özelliği taşıdığı ancak daha da geliştirilmesi gerektiği çalışmamızda gösterilmiştir.

Kemik dokusu kırıklarda veya defektif bölgelerde iyileşme sağlayabilmek için rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Ancak ciddi kemik kaybı, revizyon ameliyatlar, tümör rezeksiyonu gibi durumlar kemiğin rejenerasyon kapasitesini üstünde ihtiyaç gerektirmektedir. Kemik dokusu mühendisliği bu ihtiyacı karşılayabilecek sentetik biyomateryaller üzerinde çalışmaktadır (12). Çalışmamızda uyguladığımız Grandus B-One'ın bu ihtiyacı karşılama potansiyelinin olduğunu düşünmekteyiz.

Kalsiyum fosfatlar (CaP) uzun zamandır kemik greft materyali ve defekt dolgu materyali olarak kullanılmaktadır. Bu malzemelerin kalsiyumfosfat yapıları kemiğin doğal mineral bileşenleri ile benzer olması bu malzemelere olan ilgiyi arttırmaktadır. Bu malzemeler nispeten zayıf yapıda ve kırılgandır ve kemiğe zayıf yapışma özelliklerine sahiptirler. İmplantların kemiğe sabitlenmesi için uzun zamandır en yaygın kullanan enjekte edilebilir malzeme polimetil metakrilat (PMMA) çimentosudur. Ancak PMMA implant ve kemik arası dolgu görevi görür, yapıştırıcı olarak kullanılmaya çalışılmış ancak başarı elde edilememiştir (122). PMMA'lar

biyolojik olarak parçalanamazlar ve metil metakrilat monomer toksiktir. PMMA'lar ciddi ısı oluşumuna, büzölmelere ve çevre dokuda nekrozlara neden olurlar (11,123). Benzer olarak çalışmamızda kullandığımız Grandus B-One'ın kemiğe zayıf yapışma özelliğine sahip olduğu görölmüştür. Sertleşirken ısı açığa çıkarmadığı ve çevresinde nekroza yol açmadığı görölmüştür. Grandus B-One'ın kemik dolgu maddesi ve kemik grefti olarak kullanılabileceği çalışmamızda gösterilmiştir.

Kemik dokusu oluşumu için kullanılacak biyomateryalin sahip olması gereken özellikler vardır. Bu özellikler osteoindüksiyon, osteokondüksiyon, osteointegrasyondur. Ayrıca biyomateryal, uygulandığı ortamda kimyasal ve mekanik olarak stabil olmalı, kolayca steril edilebilir olmalı, yeterli üretilebilirliğe sahip olmalıdır (3). Kemik dokusu mühendisliğince geliştirilen biyometeryallerin amacı, defekt bölgesinde kemik dokusunun yenilenmesini desteklemek, yerine geçecek kemik dokusuna iskelet sağlamak ve biyobozunur olarak yeni kemik dokusuyla değiştirilmesini sağlamaktır. Otogreftler dokuya uyumlu olmaları, immüjenik reaksiyona neden olmamaları ve osteojenik yapıda olmaları nedeniyle kemik rekonstrüksiyonlarında kullanılmaya çok uygundur. Graft içerisinde bulunan hücreler yeni kemik oluşumunu teşvik ederler. Otogreftler hücrelerin tutunmasını, yerleşmesini, büyümesini, vasküler dokuların büyümesini destekleyen gözenekli bir matrikse yani iskelete sahiptir. Ciddi kemik defektlerinde en yaygın tercih edilen yöntem vaskülarize otogreftlemedir. Ancak graft tedarik etmede azalma, graft alınan bölgede enfeksiyon, kanama, yara izi, kronik ağrı oluşumu ve bu işlemde hasta morbiditesi gibi komplikasyonlar ve eksiklikler greftleme için farklı kaynaklara ihtiyaç doğurmuştur. Kemik dokusu mühendisliği, verici sahada morbidite olmadan, vaskülarizasyon problemi olmadan, enfeksiyon olmadan alıcı sahada immün reaksiyonla karşılaşmadan, kemik oluşumunu ve iyileşmesini başarabilmeyi amaçlamaktadır. Kemik dokusunda kullanılacak olan biyomateryalin amacı zaman içinde emilerek yerine yeni kemik dokusunun oluşmasını sağlamaktır (3). Ishaug ve arkadaşları, kemik oluşumu için kullanılması planlanan iskele malzemelerinde olması gereken kriterleri tanımlamıştır. Buna göre iskele malzemesi osteoblastların bağlanmasına izin vermelidir, iskele osteoblastların proliferasyonu ve işlevi için uygun ortam sağlamalıdır, iskele hücrelerin hayatta kalabilmesi için vasküler invazyona izin

vermelidir, iskele malzemesi biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır ve parçalandığı zaman ortaya toksik metabolit çıkarmamalıdır ve son olarak iskele üç boyutlu şekiller halinde işlenebilmelidir (12). Benzer şekilde çalışmamızda kullandığımız TTCP ve Grandus B-One malzemelerinin hücrelerin bağlanmasına izin verdikleri, hücrelerin proliferasyonuna izin verdikleri, hücrelerin işlevi için uygun oldukları, vasküler invazyona izin verdikleri, iskele olarak kullanılabilecekleri gösterilmiştir. Grandus B-One'ın kemik greft ihtiyacını karşılayabilecek potansiyelinin olduğunu düşünmekteyiz. Yapıştırıcı özelliğinin artırılması üzerine çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Jahandideh ve arkadaşlarının tavşanlar üzerinde yaptığı deneysel çalışma sonuçlarına göre TCP/kollajen nanokompozitinin kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda önemli bir rolü olduğunu ve kemik kırıklarında iskele olarak kullanılabileceğini doğrulamaktadır (12). Trikalsiyum fosfat çalışmasına benzer şekilde çalışmamızda TTCP'nin de izole veya kompozit uygulamalarda iskele görevi görebileceğini düşünmekteyiz.

Mevcut literatürde birçok biyoaktif siman kırık iyileşmesi çalışılmış olsa da, bilginiz dahilinde, kırık iyileşmesinde kullandığımız biyoaktif siman olan TTCP'nin etkisine ilişkin sınırlı sayıda deneysel çalışma bulunmaktadır (124). TTCP etkisi üzerine sınırlı çalışma yapılmış olması dolayısıyla TTCP uygulamasına yönelik daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır ve bu çalışmanın gelecekteki çalışmalara yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Kemik kaynamasını biyolojik olarak hızlandırabilecek çalışmalarda yapılmıştır. Bunlar otojen ve allojen kemik greftleri, sentetik greftler, otojen kemik iliği ve büyüme faktörleri (118,126,127), BMP (128,129), TGF- β (130,131), Fibroblast büyüme faktörü (132,133), insülin benzeri büyüme faktörü, büyüme hormonu (134), PDGF (135), vasküler endotelial büyüme faktörü (136,137) ve NGF (138)'dir. Çalışmamızda uyguladığımız greftler sentetik greftler olarak gruplandırılmaktadır. Ancak sentetik greftler ile büyüme faktörlerinin kompozit kullanımlarının kemik iyileşmesi üzerine daha etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda uyguladığımız sentetik greftlerin osteokondüktif etki

gösterdiği bilinmektedir ve çalışmamızda da osteokondüktif etkileri gösterilmiştir. Bu sentetik greftlerle kompozit olarak osteoindüktif malzemelerin kullanımının kırık iyileşmesine daha çok katkısı olacağını ve bu konuda daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Yaralanmadan sonra TNF- α ve IL-1B, kırık bölgesinde iki modlu bir zamansal dağılımda yükselir. Peri-fraktür konsantrasyonları ilk inflamatuvar fazda yükselir, daha sonra onarım sürecinin çoğu için normal fizyolojik seviyelere düşer, ancak daha sonra yeniden şekillenme fazında yükselir (77,78). Çalışmamızın sonuçlarına göre PK ve Grandus B-One grubu TNF-a değerleri yüksek olarak görülmüştür. Buna göre inflamasyon aşamasında oldukları düşünülmüştür. TTCP grubu TNF-a değerleri NK grubuna yakın olarak görülmüştür. Bu sonuçlara göre TTCP grubunun inflamasyon evresini bitirdiği ancak yeniden şekillenme evresine daha geçmediği olarak değerlendirilmiştir.

IL-1 β ve TNF- α , kırık oluştuktan sonra 21. gün ila 28. gün arasındaki aralıkta başlayan yeniden şekillenme döneminde yükselir. TNF- α 'nın nükleer faktör kappa-B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörünü salgılayan kondrositlerin sayısını ve osteoklastlara farklılaşabilen CD14+ monositlerin trans-endotelial göçünü arttırdığı gösterilmiştir. Bu iki mekanizma, TNF-a'nın hem yerleşik osteoklastların kemik rezorpsiyon kapasitesini artırmasına hem de kemiğin yeniden şekillenme sürecini teşvik etmek için belirli bir alandaki toplam osteoklast sayısını potansiyel olarak artırmasına izin verir (7,77–79). TNF-a ve IL-1 sitokinler kırık onarım sürecinin başlatılmasında, intramembranöz kemik oluşumu ve trabeküler kemiğin yeniden şekillenmesinde önemli roller oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (78). Çalışmamızda NFkB değerlerinin tüm gruplarda NK'ye göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Grandus B-One grubundaki NFkB değerleri en yüksek olarak gösterilmiş PK grubunda ise en düşük olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre osteoklast kemik rezorpsiyon kapasitesinin en çok Grandus B-One ve sonrasında TTCP grubunda arttığı gösterilmiştir. Grandus B-One ve TTCP'nin biyouyumlu ve yıkılabilir olduğunu desteklemektedir. Çalışmamızda IL-1B değerlerine göre en yüksek seviye Grandus B-one grubunda gösterilmiştir. Orta seviyede TTCP grubunda gösterilmiştir ve kırık yapılan gruplar arasında en düşük IL-1B seviyesi PK grubunda

gösterilmiştir. Tüm bu sonuçlara göre Grandus B-One IL-1B, NFkB ve TNF-a seviyelerini en çok yükselten grup olmuştur ve kırık iyileşmesi açısından Grandus B-One'ın katkısı olduğu gösterilmektedir. Uzun takip süreli ve haftalık biyokimyasal tetkikli deneysel çalışma planlanmasının, Grandus B-One uygulamasında sitokinlerin davranışlarını daha net açıklayabileceğini düşünmekteyiz.

Kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), makrofajlar tarafından salgılanan çok işlevli proteinlerdir ve kemik gelişimine ve kırıkların onarımına yardımcı olurlar. BMP'ler, yeni osteositlerin (osteoinduktif) oluşumuna yardımcı olan büyüme faktörleridir. Bu, spesifik membrana bağlı reseptörlerin aktivasyonu ile gerçekleştirilir. BMP-2, osteoinduktif olarak tanımlanır, yani kemik büyümesini ve oluşumunu indüklemek ve artırma yeteneğine sahiptir ve ayrıca osteojenik yola doğru hücre kemotaksisini, proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekler (80,81). TGF-β1 ve BMP-2 plazma seviyeleri kırıklar sonrası dönemde artmaktadır. Normal kaynama görülen gruplarda TGF-β1 seviyeleri 2. Haftada zirve değerine ulaşmaktadır. Normal kaynama görülmeyen ya da kaynamama problemi olan gruplarda TGF-β1 seviyeleri daha geç dönemde zirve değere ulaşmaktadır. Plazma BMP-2 seviyeleri normal kaynama görülen gruplarda 1. haftada zirve değere ulaşırken, kaynamama görülen gruplarda 2. Haftada zirve değere ulaşmaktadır. Genel olarak, plazma TGF-β1 veya BMP-2 seviyeleri, normal kaynama ve kaynamama grupları arasında önemli ölçüde farklı değildir (82,83). BMP-2 seviyelerinin geç dönemde pik yapmasıyla geç kaynama arasında bağlantı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur ancak net bağlantı kurulamamıştır. Benzer şekilde çalışmamızda muhtemelen uzamış kaynama durumuna bağlı olarak kırık modeli uygulanan tüm gruplarda BMP-2 seviyeleri 28. günde yüksek olarak gösterilmiştir. BMP-2 seviyesi en yüksek olan grup Grandus B-One grubu olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre özellikle Grandus B-One ve TTCP grubunda yüksek kaynama potansiyeli olduğu ve sitokinleri güçlü şekilde uyardıkları gösterilmiştir.

Çalışmamızda TTCP uygulanan grupta kemik iyileşmesinin Grandus B-One grubuna göre daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak Grandus B-One'ın kemik dokular arasında yer kaplaması olduğunu düşünmekteyiz.

X-ışınlarının aksine, mikro bilgisayarlı tomografi (BT), kemirgen çalışmalarında kemik yapısını, yoğunluğunu ve ayrıca kaynamama kırıklarını incelemek için en yerleşik görüntüleme tekniğidir (108). Çalışmamızda kısıtlılıklar; takip süresi kısalığı, sadece deney sonunda sakrifikasyon yapılmış olması, osteotomi modeli uygulamasının frezeler yardımıyla yapılmış olması, uyguladığımız tespit yönteminin mutlak olmaması, radyolojik görüntülemenin tek yönlü yapılmış olması ve radyolojik olarak BT kullanılmamış olması olmuştur. Sıçan sayısının artması ve standardizasyon kaybı nedeniyle farklı kırık tipleri veya farklı kırık iyileşmesi aşamaları veya haftaları araştırılamamıştır. Kırık iyileşmesinin önemli bir parçası olan kırık hematoma da açık kırık modeli nedeniyle çıkarılmıştır. Grandus B-One'ın yapıştırma kuvvetinin yeterince güçlü olmaması stabiliteyi etkilemiştir. İzole TTCP ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olması da çalışmamızı kısıtlayıcı faktör olarak etkilemiştir.

Deney hayvanlarının çoğunun hücresel biyolojisi, immünolojisi, histolojisi, iyileşme süreçleri, doku yapıları insanlardan farklıdır. İnsanlarda kırık iyileşmesi; ileri yaş, diyabet, osteopoz gibi birçok etken altında oluşturulmaya çalışılmaktadır. Ancak deney hayvanları genellikle sağlıklı, normal, sağlam hayvanlar üzerinde yapılmaktadır. Bu tip nedenlerle etkili hayvan deney çalışmaları sonuçları bile en önemli test olan insan çalışmaları sonuçları arasında tutarsızlıklar olabilir (15). Deneysel hayvan çalışmalarının ve sonuçlarının insanlar üzerinde aynı etkiyi yaratmayacağını bilmekteyiz. Bu deneysel çalışmada deney hayvanlarında uygulanan malzemeler arası karşılaştırma yapıldığı için sonuçların anlamlı olduğu düşünülmüştür.

Yaptığımız deneysel çalışmada veteriner, ortopedist, farmakolog bulunuyordu çalışmamızın olumlu yönleri arasındadır.

Normal vücut ağırlığı artışıdaki değişikliklerin, ameliyat prosedürüne tabi tutulan büyüyen genç yetişkin sıçanlarda basit ve objektif bir ağrı ölçüsü olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırdık. Daha fazla araştırma, bu çalışmadaki gözlemlerimizin farklı yaş ve cinsiyetlerdeki sıçanları ve dişi sıçanları kapsayıp kapsamadığını belirleyecektir (125). Postop kilo kaybı ve artışının ağrı ile ilişkili

olabileceğine dair yayınlar mevcuttur. Çalışmamızda TTCP grubu postop kilo kaybı açısından en iyi grup olarak görülmüştür. Grandus B-One grubu kilo kaybı PK ya göre daha iyi olarak görülmüştür. Tüm bu sonuçlara göre postop dönemde en az ağrının TTCP grubunda, en çok ağrının PK grubunda olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Literatürde TTCP'nin kırık üzerine olan etkisine dair çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Grandus B-One kemik yapıştırıcı malzemesinin kesme kuvvetlerine karşı dayanıklı olmadığı tek başına kırık tedavisinde kullanılmasının uygun olmadığı görülmüştür. Grandus B-One'ın çok parçalı kırıklarda implant ile tespiti zor olan küçük parçaların ve hiçbir yerden beslenmesi olmayan tamamen serbest ve implantlar ile tespiti zor olacak parçaların tespitinde implanta ek olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Serbest parça ile büyük kemik doku arasına Grandus B-One uygulanacağı için serbest parçanın beslenmesi üzerine Grandus B-One'ın nasıl etkisi olacağına dair çalışma bulunmamaktadır. Grandus B-One biyolojik malzemesinin kırık iyileşmesini engellemediği hatta destek olduğu gösterilmiş olup kırık tespitinde implantlarla birlikte ve defekt bölgesinde greft olarak uygulanabileceği görülmüştür. Kemik yapıştırıcılarla ilgili daha çok deneysel çalışma ve geliştirici çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Radyolojik veriler değerlendirildiğinde Grandus B-One grubu verileri PK grubu verilerine göre daha anlamlı yüksek çıkması ve TTCP grubu verilerinin Grandus B-One grubu verilerine göre daha yüksek çıkması TTCP'nin kırık iyileşmesi üzerine ciddi katkısının olduğunu göstermektedir. Ayrıca Grandus B-One'ın da kırık tespitinde ve kırık iyileşmesinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir.

Biyokimyasal olarak TNF-a, BMP-2, NFkB ve İL-1B verileri değerlendirildiğinde kırık iyileşmesi aşamalarında TTCP grubunun en ileride olduğu, Grandus B-One grubunun ortada ve PK grubunun en geride olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar TTCP'nin ve Grandus B-One'ın kırık iyileşmesini hızlandığını göstermektedir.

Histopatolojik H & E yapılan boyamada inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, fibrosit/fibroblast aktivitesi açısından PK, Grandus B-One ve TTCP grupları arasındaki farklılıklar istatistik incelemede anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Yeni damar oluşumu ve kondrosit/kondroblast aktivitesi açısından TTCP grubu, PK ve Grandus B-One grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0.05$) göstermiştir. Masson's Trichrome ile yapılan boyamada fibröz doku ile kıkırdak doku oluşumu açısından PK, Grandus B-One ve TTCP grupları arasındaki farklılıklar istatistik incelemede anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Bu sonuçlara göre kırık iyileşmesi aşamalarında TTCP grubunun en ileride olduğu, Grandus B-One grubunun ortada ve PK grubunun en geride olduğu görülmektedir.

Grandus B-One'ın TTCP ile karşılaştırıldığında daha geç kaynama aşamasında olmasının nedeni olarak Grandus B-One'ın kemik uçları arasında yer kaplaması olduğunu düşünmekteyiz. Ancak Grandus B-One'ın kırık iyileşmesini olumlu etkilediği çalışmamızda gösterilmiştir. Kemik yapıştırıcı olarak daha anlamlı incelemeler yapabilmek için Grandus B-One'ın başka kemik yapıştırıcı malzemeler ile karşılaştırılmalı çalışmalarının yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Çalışma sonuçlarımıza göre TTCP distile su ile çözülerek kırık hattına uygulandığında kırık iyileşmesini hızlandırıyor, kırık iyileşmesini olumlu yönde destekliyor ve kemik uçları arasında yer kaplamıyor olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre TTCP kemik uçlarına uygulanarak kaynamayı artırmaktadır. Daha çok deneysel çalışma ile desteklenerek klinik uygulamalarda da kullanılabilirliği sağlanabilir olarak görülmektedir.

Kemik kırıkları ve defektleri dolayısıyla her geçen gün greft ihtiyacı artmaktadır. Kemikleşebilen, kırık iyileşmesini hızlandırabilecek, kırık stabilitesine katkı sağlayabilecek sentetik greft ihtiyacı günümüzde üzerinde yoğun çalışılan konular arasındadır. Grandus B-One ve TTCP'nin kemik iyileştirme potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Grandus B-One'ın defektif kemik rekonstrüksiyonlarında önemli rolü olabileceği ve kemik kırıklarında iskele olarak kullanılabileceği görülmektedir. Osteokondüktif olan Grandus B-One ve TTCP'nin yapısına osteoindüktif faktörler eklenerek kırık iyileştirme potansiyelleri daha da artırılabilir. Ayrıca Grandus B-One'ın kemik yapıştırma özelliğinin de artırılması gerekmektedir.

7. KAYNAKÇA

1. Hart NH, Newton RU, Tan J, Rantalainen T, Chivers P, Siafarikas A, vd. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2020;20(3):347.
2. Singh S, Bray TJ, Hall-Craggs MA. Quantifying bone structure, micro-architecture, and pathophysiology with MRI. *Clin Radiol*. 2018;73(3):221-30.
3. Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2020;110:110698.
4. Bhattacharjee P, Kundu B, Naskar D, Kim HW, Maiti TK, Bhattacharya D, vd. Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. *Acta Biomater*. Kasım 2017;63:1-17.
5. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):45-54.
6. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma*. 2005;19(10):S4-6.
7. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-5.
8. Ekegren CL, Edwards ER, de Steiger R, Gabbe BJ. Incidence, Costs and Predictors of Non-Union, Delayed Union and Mal-Union Following Long Bone Fracture. *Int J Environ Res Public Health*. Aralık 2018;15(12):2845.
9. Bonafede M, Espindle D, Bower AG. The direct and indirect costs of long bone fractures in a working age US population. *J Med Econ*. 01 Şubat 2013;16(1):169-78.
10. Gu Y, Zhuang R, Xie X, Bai Y. Osteogenic stimulation of human dental pulp stem cells with self-setting biphasic calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(4):1669-78.
11. Kirillova A, Kelly C, von Windheim N, Gall K. Bioinspired Mineral–Organic Bioresorbable Bone Adhesive. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(17):1800467.
12. Mohseni M, Jahandideh A, Abedi G, Akbarzadeh A, Hesarakı S. Assessment of tricalcium phosphate/collagen (TCP/collagene)nanocomposite scaffold

- compared with hydroxyapatite (HA) on healing of segmental femur bone defect in rabbits. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 17 Şubat 2018;46(2):242-9.
13. William Jr G, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, vd. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery: a critical analysis. *JBJS.* 2007;89(3):649-58.
 14. Uludağ Ö, ADIYAMAN ÜNİVERSİTESİ TF. History and Importance of Ethical Rules in Animal Experiment Studies. 2019;
 15. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, vd. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007;8(1):1-13.
 16. Handool KO, Ibrahim SM, Kaka U, Omar MA, Abu J, Yusoff MSM, vd. Optimization of a closed rat tibial fracture model. *J Exp Orthop.* 2018;5(1):1-9.
 17. Shen H, Gardner AM, Vyas J, Ishida R, Tawfik VL. Modeling complex orthopedic trauma in rodents: bone, muscle and nerve injury and healing. *Front Pharmacol.* 2021;2408.
 18. Haffner-Luntzer M, Hankenson KD, Ignatius A, Pfeifer R, Khader BA, Hildebrand F, vd. Review of animal models of comorbidities in fracture-healing research. *J Orthop Res.* 2019;37(12):2491-8.
 19. Freeman KT, Koewler NJ, Jimenez-Andrade JM, Buus RJ, Herrera MB, Martin CD, vd. A fracture pain model in the rat: adaptation of a closed femur fracture model to study skeletal pain. *J Am Soc Anesthesiol.* 2008;108(3):473-83.
 20. Thompson SR, Miller MD. *Miller's Review of Orthopaedics.* Elsevier, Incorporated; 2016.
 21. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect.* 1987;36:27-48.
 22. Ott SM. Cortical or trabecular bone: what's the difference? *Am J Nephrol.* 2018;47(6):373-6.
 23. Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone mechanical properties in healthy and diseased states. *Annu Rev Biomed Eng.* 2018;20:119-43.
 24. Keaveny TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC. Biomechanics of trabecular bone. *Annu Rev Biomed Eng.* 2001;3(1):307-33.

25. Szabo E, Rimnac C. Biomechanics of immature human cortical bone: A systematic review. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2022;125:104889.
26. Özşen M, Yalçinkaya Ü, Bilgen MS, Yazici Z. Fibrous dysplasia: clinicopathologic presentation of 36 cases. *Age.* 2018;20(11):20-40.
27. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* 2011;343(2):289-302.
28. Dudley HR, Spiro D. The fine structure of bone cells. *J Cell Biol.* 1961;11(3):627-49.
29. Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):313-23.
30. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272.
31. Rutkovskiy A, Stenslkken KO, Vaage IJ. Osteoblast differentiation at a glance. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016;22:95.
32. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):1-7.
33. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-38.
34. Tate MLK, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(1):1-8.
35. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol.* 1999;27(8):1229-41.
36. Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, vd. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):77-90.
37. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, vd. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(1):19-26.
38. Mdder UI, Khosla S. Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem.* 2008;103(2):393-400.
39. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration. *Front Pharmacol.* 2020;11:757.

40. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092(1):385-96.
41. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103-8.
42. Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki \Lukasz, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis.* 2017;20(3):291-302.
43. Marenzana M, Arnett TR. The key role of the blood supply to bone. *Bone Res.* 2013;1(1):203-15.
44. Shim SS. Physiology of blood circulation of bone. *JBJS.* 1968;50(4):812-24.
45. Brookes M, Revell WJ. Blood supply of bone: scientific aspects. Springer Science & Business Media; 2012.
46. Cunningham C, Scheuer L, Black S. Developmental Juvenile Osteology. Second Edition. San Diego: Academic Press; 2016. 632 s.
47. Kiaer T. Bone perfusion and oxygenation: Animal experiments and clinical observations. *Acta Orthop Scand.* 1994;65(sup257):3-41.
48. Cowin SC, Cardoso L. Blood and interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue. *J Biomech.* 2015;48(5):842-54.
49. McCarthy I. The physiology of bone blood flow: a review. *JBJS.* 2006;88(suppl_3):4-9.
50. Dwek JR. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol.* 2010;39(4):319-23.
51. Nahian A, Chauhan PR. Histology, periosteum and endosteum. İçinde: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021.
52. Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):548-65.
53. Mackie E, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46-62.
54. Breeland G, Sinkler MA, Menezes RG. Embryology, bone ossification. İçinde: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2020.

55. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855.
56. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*. 2010;77(1):4-12.
57. Looker AC. Interaction of science, consumer practices and policy: calcium and bone health as a case study. *J Nutr*. 2003;133(6):1987S-1991S.
58. Bonjour JP. Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. *J Am Coll Nutr*. 2011;30(sup5):438S-448S.
59. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol*. 2005;187(3):311-25.
60. Goltzman D. Functions of vitamin D in bone. *Histochem Cell Biol*. Nisan 2018;149(4):305-12.
61. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol*. 2000;81(6):405-22.
62. Chee C, Sellahewa L, Pappachan JM. Inhaled corticosteroids and bone health. *Open Respir Med J*. 2014;8:85-92.
63. Williams GR, Bassett JD. Thyroid diseases and bone health. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(1):99-109.
64. Olney RC. Regulation of bone mass by growth hormone. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41(3):228-34.
65. Tanrıku S, Gönen E. Kırık iyileşmesi. *TOTBID Derg* [İnternet]. 2017 [a.yer 11 Nisan 2022];16(6). Erişim adresi: <https://dergi.citius.technology/Journal/PView/9174/totbid-dergi>
66. MD FMA, MD STC, MD JHB. *Campbell's Operative Orthopaedics, 4-Volume Set*. Philadelphia, PA; 2016.
67. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T hua, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016;86:119-30.
68. Ono T, Takayanagi H. Osteoimmunology in bone fracture healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(4):367-75.
69. El-Jawhari JJ, Jones E, Giannoudis PV. The roles of immune cells in bone healing; what we know, do not know and future perspectives. *Injury*. 2016;47(11):2399-406.

70. 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 Rep.* 01 Haziran 2020;12:100249.
71. Buza III JA, Einhorn T. Bone healing in 2016. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2016;13(2):101.
72. Elliott DS, Newman KJH, Forward DP, Hahn DM, Ollivere B, Kojima K, vd. A unified theory of bone healing and nonunion: BHN theory. *Bone Jt J.* 2016;98(7):884-91.
73. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;371:10-27.
74. Moseke C, Gbureck U. Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* 01 Ekim 2010;6(10):3815-23.
75. Aykın Şimşek, Gökhan Çakmak, Erdal Cila. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. *Türk Ortop Ve Travmatoloji Birliği Derneği Derg [İnternet].* 2004;3(3-4). Erişim adresi: https://dergi.totbid.org.tr/uploads/pdf_75.pdf#:~:text=Kemik%20grefti%20olarak%20otogreftler%20ve,ve%20kompozit%20greftler%20tercih%20edilebilir.
76. Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of Acute Fractures with a Collagen-Calcium Phosphate Graft Material. A Randomized Clinical Trial*†. *JBJS.* Nisan 1997;79(4):495.
77. Karnes JM, Daffner SD, Watkins CM. Multiple roles of tumor necrosis factor-alpha in fracture healing. *Bone.* 01 Eylül 2015;78:87-93.
78. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, vd. Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of NF-κB Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6):1004-14.
79. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* Haziran 2008;14(2):179-86.
80. Poon B, Kha T, Tran S, Dass CR. Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls. *J Pharm Pharmacol.* 01 Şubat 2016;68(2):139-47.

81. Ali AA, Mukhtar MM, Shaheen S, Mohamed AO. Assessment of plasma BMP-2, BMP-7, BMP-10, vitamin D, and TGF β 1 in simple fractures among Sudanese patients. PLOS ONE. 19 Şubat 2021;16(2):e0247472.
82. Hara Y, Ghazizadeh M, Shimizu H, Matsumoto H, Saito N, Yagi T, vd. Delayed Expression of Circulating TGF- β 1 and BMP-2 Levels in Human Nonunion Long Bone Fracture Healing. J Nippon Med Sch. 15 Ocak 2017;84(1):12-8.
83. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, vd. A Single Percutaneous Injection of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Accelerates Fracture Repair. JBJS. Ağustos 2003;85(8):1425-35.
84. 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. 01 Aralık 2020;51(12):2840-5.
85. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model - Claes - 2009 - Journal of Orthopaedic Research - Wiley Online Library [İnternet]. [a.yer 22 Nisan 2022]. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.20712>
86. Neagu TP, Țigliş M, Popp CG, Jecan CR. Histological assessment of fracture healing after reduction of the rat femur using two different osteosynthesis methods. Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol. 2016;57(3):1051-6.
87. Diwan AD, Wang MX, Jang D, Zhu W, Murrell GAC. Nitric Oxide Modulates Fracture Healing. J Bone Miner Res. 2000;15(2):342-51.
88. Cavanaugh DL, Berry J, Yarboro SR, Dahners LE. Better Prophylaxis Against Surgical Site Infection with Local as Well as Systemic Antibiotics. J Bone Joint Surg Am. 01 Ağustos 2009;91(8):1907-12.
89. Garrison RN, Conn AA, Harris PD, Zakaria ER. Direct peritoneal resuscitation as adjunct to conventional resuscitation from hemorrhagic shock: A better outcome. Surgery. 01 Ekim 2004;136(4):900-8.
90. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, vd. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. Bone. 01 Ekim 2011;49(4):591-9.

91. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* Nisan 1987;18(2):213-25.
92. Klopfleisch R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology - a systematic review. *BMC Vet Res.* 21 Haziran 2013;9(1):123.
93. Meimandi-Parizi A, Oryan A, Bigham-Sadegh A, Sayahi E. Effects of chitosan scaffold along with royal jelly or bee venom in regeneration of critical sized radial bone defect in rat. *Iran J Vet Res.* 2018;19(4):246-54.
94. Chou DT, Hong D, Oksuz S, Schweizer R, Roy A, Lee B, vd. Corrosion and bone healing of Mg-Y-Zn-Zr-Ca alloy implants: Comparative in vivo study in a non-immobilized rat femoral fracture model. *J Biomater Appl.* Nisan 2019;33(9):1178-94.
95. 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.* 19 Temmuz 2018;19(1):243.
96. Krischak GD, Augat P, Sorg T, Blakytyn R, Kinzl L, Claes L, vd. Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 01 Ocak 2007;127(1):3-9.
97. 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. *Arch Orthop Trauma Surg.* 01 Eylül 2003;123(7):327-32.
98. Shefelbine SJ, Augat P, Claes L, Beck A. Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. *J Orthop Res.* 01 Mart 2005;23(2):489-93.
99. 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.* 01 Ağustos 2007;81(2):132-8.
100. 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). *J Bone Miner Res.* 2002;17(11):2038-47.

101. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res.* 1984;2(1):97-101.
102. Klein M, Stieger A, Stenger D, Scheuer C, Holstein JH, Pohlemann T, vd. Comparison of healing process in open osteotomy model and open fracture model: Delayed healing of osteotomies after intramedullary screw fixation. *J Orthop Res.* 2015;33(7):971-8.
103. Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int.* 01 Aralık 2007;18(12):1641-50.
104. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats - Luger - 1998 - *Lasers in Surgery and Medicine* - Wiley Online Library [İnternet]. [a.yer 28 Nisan 2022]. Erişim adresi: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1096-9101\(1998\)22:2%3C97::AID-LSM5%3E3.0.CO;2-R](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1096-9101(1998)22:2%3C97::AID-LSM5%3E3.0.CO;2-R)
105. Özbay H, Atçı T, Adanır O, Alagöz E, Çay T. Effects of social stress and fluoxetine treatment on fracture healing in a rat femur fracture model. *Injury.* 01 Şubat 2022;53(2):362-7.
106. Kratzel C, Bergmann C, Duda G, Greiner S, Schmidmaier G, Wildemann B. Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing. *BMC Musculoskelet Disord.* 08 Ekim 2008;9(1):135.
107. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H. Comparison of Two Different Fixation Techniques for a Segmental Defect in a Rat Femur Model. *J Invest Surg.* 01 Ocak 2007;20(3):149-55.
108. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, vd. Development of a Reliable Non-Union Model in Mice. *J Surg Res.* 01 Haziran 2008;147(1):84-91.
109. Zhang Y, Xu J, Ruan YC, Yu MK, O’Laughlin M, Wise H, vd. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nat Med.* Ekim 2016;22(10):1160-9.
110. Jähn K, Saito H, Taipaleenmäki H, Gasser A, Hort N, Feyerabend F, vd. Intramedullary Mg2Ag nails augment callus formation during fracture healing in mice. *Acta Biomater.* 01 Mayıs 2016;36:350-60.

111. Kemik Biyomekaniği [İnternet]. [a.yer 28 Nisan 2022]. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/403627>
112. Xu HHK, Weir MD, Simon CG. Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration. *Dent Mater*. 01 Eylül 2008;24(9):1212-22.
113. Bioactive tetracalcium phosphate/magnesium phosphate composite bone cement for bone repair - Jingxian Liu, Jianguo Liao, Yanqun Li, Zhengpeng Yang, Qiwei Ying, Yufen Xie, Aiguo Zhou, 2019 [İnternet]. [a.yer 17 Mayıs 2022]. Erişim adresi: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0885328219845597>
114. Wang X, Zhang X, Castellot J, Herman I, Iafrati M, Kaplan DL. Controlled release from multilayer silk biomaterial coatings to modulate vascular cell responses. *Biomaterials*. 01 Mart 2008;29(7):894-903.
115. Zimmermann R, Gabl M, Lutz M, Angermann P, Gschwentner M, Pechlaner S. Injectable calcium phosphate bone cement Norian SRS for the treatment of intra-articular compression fractures of the distal radius in osteoporotic women. *Arch Orthop Trauma Surg*. 01 Şubat 2003;123(1):22-7.
116. Lobenhoffer P, Gerich T, Witte F, Tschern H. Use of an Injectable Calcium Phosphate Bone Cement in the Treatment of Tibial Plateau Fractures: A Prospective Study of Twenty-Six Cases With Twenty-Month Mean Follow-Up. *J Orthop Trauma*. Mart 2002;16(3):143-9.
117. Horstmann WG, Verheyen CCPM, Leemans R. An injectable calcium phosphate cement as a bone-graft substitute in the treatment of displaced lateral tibial plateau fractures. *Injury*. 01 Şubat 2003;34(2):141-4.
118. Schildhauer TA, Bauer TW, Josten C, Muhr G. Open Reduction and Augmentation of Internal Fixation With an Injectable Skeletal Cement for the Treatment of Complex Calcaneal Fractures. *J Orthop Trauma*. Temmuz 2000;14(5):309.
119. Goodman SB, Bauer TW, Carter D, Casteleyn PP, Goldstein SA, Kyle RF, vd. Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment. Laboratory and initial clinical results. *Clin Orthop*. 01 Mart 1998;(348):42-50.

120. Tsai CH, Lin RM, Ju CP, Chern Lin JH. Bioresorption behavior of tetracalcium phosphate-derived calcium phosphate cement implanted in femur of rabbits. *Biomaterials*. 01 Mart 2008;29(8):984-93.
121. Böker KO, Richter K, Jäckle K, Taheri S, Grunwald I, Borchering K, vd. Current State of Bone Adhesives—Necessities and Hurdles. *Materials*. Ocak 2019;12(23):3975.
122. Farrar DF. Bone adhesives for trauma surgery: A review of challenges and developments. *Int J Adhes Adhes*. 01 Mart 2012;33:89-97.
123. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*. 01 Aralık 2000;21(23):2405-12.
124. Kaymaz B, Yılmaz O, Taşova AO, Anapa D. Tetracalcium phosphate treatment on experimental fracture model in rats. *Jt Dis Relat Surg*. 28 Mart 2022;33(1):172-9.
125. Brennan MP, Sinusas AJ, Horvath TL, Collins JG, Harding MJ. Correlation between body weight changes and postoperative pain in rats treated with meloxicam or buprenorphine. *Lab Anim*. Mart 2009;38(3):87-93.

EKLER

EK-1. ETİK KURUL ONAY FORMU

TOPLANTI TARİHİ : 31.08.2021

TOPLANTI SAYISI : 7

KARAR N0 201: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Orhan KARSAN'ı yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Ratlarda Deneysel Kırık Defekti Modelinde Grandus B-One Biyolojik Onarım İmplantı Tedavisi”** isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 20.08.2021 tarihli ve E-42190979-000-2100217175 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

EK-2- CERRAHİ TIP BİLİMLERİ KURUL KARARI

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜM BAŞKANLIĞI

OTURUM TARİHİ : 13.10.2021

OTURUM SAYISI : 09

Cerrahi Tıp Bilimleri Bölüm Kurulumuz 13.10.2021 tarihi Çarşamba günü Saat 10.00’da Başhekimlik Salonunda bulunan Kurul Odasında Prof. Dr. Orhan KARSAN’ın; başkanlığında toplandı ve aşağıdaki kararlar alınmıştır.

KARAR NO : 25 – Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanlığının 27.09.2021 tarih ve 2100257477 sayılı **“Ratlarda Deneysel Kırık Defekti Modelinde Grandus B-One Biyolojik Onarım İmplantı Tedavisi”** konulu tezle ilgili yazısı görüşüldü,

Dr. Bilal KARABAK’ın; anılan tez konusunun kabulüne ve Tez Yöneticiliğini,

Prof. Dr. Orhan KARSAN’ın 1. Tez danışmanı

Doç.Dr. Kutsi TUNCER’in; 2. Tez danışmanı olarak yapmalarına,

Mevcudun oy birliğiyle karar verildi.

EK-3- ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

tez bilal

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 8	% 3	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	www.berilhanmedikal.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	openaccess.firat.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<% 1
9	acikerisim.ufuk.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1