

**RATLARDA KALVARİAL DEFEKT MODELİNDE
BOR NİTRÜR VE/VEYA HİDROKSİAPATİTLİ SCAFFOLD
UYGULAMASININ KEMİK REJENERASYONUNA ETKİLERİ**

Muhammed YAYLA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Zekai HALICI**

Doktora Tezi-2015

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA KALVARİAL DEFİKT MODELİNDE BOR
NİTRÜR VE/VEYA HİDROKSİAPATİTLİ SCAFFOLD
UYGULAMASININ KEMİK REJENERASYONUNA
ETKİLERİ**

Muhammed YAYLA

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zekai HALICI**

ERZURUM

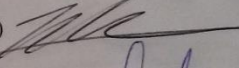
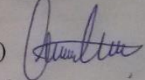
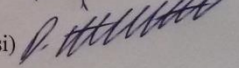
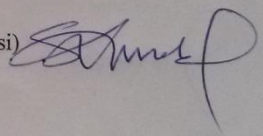
2015

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA KALVARİAL DEFEKT MODELİNDE BORNİTRÜR
VE/VEYA HİDROKSİAPATİTLİ SCAFFOLD UYGULAMASININ
KEMİK REGENERASYONUNA ETKİLERİ**

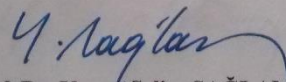
Muhammed YAYLA

Tez Savunma Tarihi : 05.06.2015

Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Zekai Halıcı (Atatürk Üniversitesi)	
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu (Atatürk Üniversitesi)	
Jüri Üyesi	: Doç. Dr. İsmail Malkoç (Atatürk Üniversitesi)	
Jüri Üyesi	: Doç. Dr. Durdu Altuner (Erzincan Üniversitesi)	
Jüri Üyesi	: Yrd. Doç. Dr. Semih Kunak (Ordu Üniversitesi)	

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemğin yapısı ve fonksiyonu	3
2.2.Kemğin biyokimyası	3
2.3.Kemğin Anatomisi	4
2.4.Kemik Metabolizması Düzenleyicileri	6
2.5.Kemğin Yeniden oluşumsı.....	7
2.6.Kırık İyileşmesi.....	10
2.7 Kemik Defektləri.....	15
2.8. Kritik Büyüklükte Kemik Defekti.....	15
2.9. İyileşmeyi Etkileyen Faktörler	15
2.10.Kemik Defektinde Otogreft Yerine Kullanılan Malzemeler.....	17
2.10.1. Allojenik Bioimplantlar	19
2.10.2. Dondurulup Kurutulmuş Kemik Allogreftleri (Mineralize ve Demineralize)	20
2.10.3. Sentetik malzemeler	22
2.11.Kemik Grefti İyileşmesi.....	24

2.11.1. Genel	24
2.12. Bor Mineralinin Genel Özellikleri	26
2.12.1. Bor Mineralinin Kemik Doku Üzerine Etkisi	27
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. Materyal	29
3.2. Deney Planı	29
3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	31
3.2.3. Scaffold İmalatı.....	32
3.2.4.Hidroksiapatit Üretimi	33
3.2.5. Trikalsiyumfosfat (TcP)–Hekzagonal Bor Nitrür Kompozitlerinin Hazırlanması.....	35
3.2.6. Bor Nitrür ve Hidroksiapatit Emdirilmiş Scaffold Malzeme Karakterizasyonu.....	36
3.2.7. Kalvarial Defekt Modeli	39
3.2.8. Radyolojik Çalışmalar.....	41
3.2.8.1. BT (Bilgisayarlı Tomografi) Analizi	41
3.2.9.Moleküler Analizler	41
3.2.10. Histopatolojik Analizler	44
3.2.10.1.Rutin Histolojik ve Hematoksilen Eozin Prosedürü:	44
3.2.10.2. Leica TP 1050 Cihazı Takip Basamakları	44
3.2.11. İstatiksel Analizler	45
4. BULGULAR	46
4.1. BT (Bilgisayarlı Tomografi) Bulguları	46

4.2. Histopatolojik Bulgular	47
4.3. Moleküler Bulgular	55
5.TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	72
EKLER.....	93
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	93
EK-2. ETİK KURUL ONAYI FORMU	94

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmamda, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, fikirleriyle her zaman yol gösteren, çalışmalarımda katkı ve desteklerini esirgemeyen, mesleğimin inceliklerini öğrenmemde emeği geçen, tez danışmanım Prof. Dr. Zekai HALICI'ya en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca doktora eğitimim süresince, yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim çok değerli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU hocama, çalışmalarımda yol gösterici olan Doç. Dr. Elif ÇADIRCI, Doç. Dr. Emre KARAKUŞ, Doç. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK, Doç. Dr. Beyzagül POLAT, Doç. Dr. Yasin BAYIR, Yrd. Doç. Dr. Erol AKPINAR'a, katkılarından dolayı Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU'ya, Yrd. Doç. Dr. Adem KARAMAN'a, Prof. Dr. Nuran AY, Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN, Dr. Feray BAKAN, Dr. Selami DEMİRCİ, Arş. Gör. Şeyma YAYLA, Arş. Gör. Erdem TOKTAY, Dr. Atilla TOPÇU, Uzm. Ecz. R. Anıl UĞAN, Arş. Gör. Harun ÜN, Dr. Mevlüt ALBAYRAK'a, bu çalışmayı 112M495 proje numarası ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a ve bölüm personeliyle birlikte, sevgili asistan arkadaşlarıma; birlikte paylaştığımız sıcak çalışma ortamı ve dostlukları için de teşekkür ederken, bana her zaman destek ve yardımcı olan çok değerli amcam Mustafa TAŞAR'a, babam Veyis YAYLA'ya, annem Şerife YAYLA'ya ve kardeşlerime sabırları ve fedakârlıkları için şükranlarımı iletirim.

Muhammed YAYLA

ÖZET

Ratlarda Kalvarial Defekt Modelinde Bor Nitrür Ve/Veya Hidroksiapatitli Scaffold Uygulamasının Kemik Rejenerasyonuna Etkileri

Amaç: Bu çalışmanın amacı farklı konsantrasyonlarda Bor nitrür ve/veya hidroksiapatit içeren PLGA scaffoldlarının sıçanlardaki kalvarial kemik defekti üzerinde etkilerini araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Çalışma grup başına 20 dişi sıçan olacak şekilde gerçekleştirildi. Sağlıklı hayvanlar kontrol grubu olarak kullanıldı (Grup 1). Anestezi altında ratlara kritik derecede (8 mm çapında) kalvarial defekt oluşturuldu. Farklı konsantrasyonlarda BN-HA içeren PLGA scaffoldlar defektli alana yerleştirildi ve cerrahi alan kapatıldı. Bir grupta defekt oluşturuldu ancak PLGA uygulaması yapılmadı (Grup 2). Operasyondan sonraki 2, 4 ve 8. Haftalarda bilgisayarlı tomografi görüntüleri çekilen gruplardan 4. ve 8. haftalarda doku örnekleri toplandı.

Bulgular: Operasyondan sonraki 4. Haftalarda Defekt, PLGA, %10HA ve %10BN gruplarında herhangi bir iyileşme izlenmezken %2,5BN ve %5BN gruplarında iyileşme gözlemlendi. Ancak 8. Haftada defekt grubu hariç diğer gruplarda iyileşme gözlenirken özellikle 2,5%BN içeren gruplarda daha iyi iyileşme bulguları mevcuttu. Real Time PCR analizlerinde OPN, ALP, Runx2 ve BMP-2 gibi bazı kemik iyileşme parametreleri incelendi. %2,5BN içeren gruplarda diğer gruplara göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Histopatolojik incelemeler de BT bulgularını ve Real Time PCR bulgularını destekler niteliktedir.

Sonuç: Bu çalışma BN ve/veya HA içeren PLGA skaffoldlarının sıçanlarda kalvarial kemik iyileşmesini artırdığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Bn, bor, defekt, kalvaria, kemik, rat

ABSTRACT

The Effects Of Scaffold Embedded BN And/Or HA Nano Particules On Bone Regeneration In Rat Calvarial Defect Model

Aim: This study investigated PLGA scaffolds including different concentrations of Bornitrür and/or Hidroxiopatite on calvarial bone defect in rats.

Materials and Methods: This study performed in 20 female rats groups. Heathy ones were control rats (Group 1). Under anesthetics conditions critical size (8 mm diameter) calvarial defect induced in rats. PLGA scaffolds containing different concentrations of BN+HA located in defected area. In one group defect induced but no PLGA applied (Group 2). At the 2st, 4nd and 8th week after operation, Computed tomography images obtained and tissue samples collected 4nd and 8th weeks.

Results: In 4nd week after operation any healing could not recognized in Defect, PLGA, %10HA and %10BN groups but healing observed in %2.5BN groups. At the 8th week healing observed in all groups (except for Defect group) especially better healing results observed in %2.5BN groups. In Real Time PCR analyses, OPN, ALP, Runx2 and BMP-2 investigated. %2.5BN groups exerted better results when compared other groups. In addition, histopathological analyses were supporting our CT and Real Time PCR results.

Conclusions: This study showed that PLGA scaffolds containing BN and/or HA significantly increased bone healing in critical sized calvarial defects in rats.

Key Words: Bn, bone, boron, calvaria, defect, rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen fosfataz
ARF	: Aktivasyon-rezorbsiyon-formasyon
BMP	: Bone morfogenic protein
BN	: Bor nitrür
BT	: Bilgisayarlı tomografi
Ca	: Kalsiyum
CBFA1	: Hücrenin çekirdeğine bağlanan faktör alfa
DBM	: Demineralize kemik matrisi
HA	: Hidroksi apatit
KYB	: Kemik yapısı birimi
M-CSF	: Makrofaj-koloni stimulan faktör
OC	: Osteokalsin
OPG	: Osteoprotegerin
OPN	: Osteopontin
PDGF	: Trombosit türevli büyüme faktörü
PLGA	: Poli-laktit ko-glycolideasid
PO₄	: Fosfat
RANK	: Reseptor aktivatör nükleer faktör
RunX2	: Runt-iliskili transkript faktör
SPP1	: Secreted phosphoprotein 1
TGF	: Transforming growth faktör
TNF	: Tumour necrotizan factor
VEGF	: Vasküler endotelial growth faktör
XRD	: X-ışını difraksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa No
Şekil 2.1.	Kemikte bulunan farklı hücreler: osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler.....	4
Şekil 2.2.	Haversian sistemdeki olgun kortikal ve süngerimsi kemik arasındaki ilişki.....	9
Şekil 3.1.	48.saat yaşlandırma süresi sonucu üretilen 750°C’de sinterlenmiş numunenin XRD spektrumu ve Raman	34
Şekil 3.2	Sinterleme öncesi ve sonrası HAp örneğine ait ikincil elektron SEM (üst) ve TEM (alt) görüntüleri.....	35
Şekil 3.3.	PLGA örneğine ait Raman spektrumu	36
Şekil 3.4.	%10 HAp ve farklı oranlarda BN içeren PLGA örneklerine ait Raman spektrumları	37
Şekil 3.5.	Katkısız PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	37
Şekil 3.6.	%10 HAp ve farklı oranlarda BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri	41
Şekil 3.7.	Farklı oranlarda BN içeren %10 HAp-PLGA örneklerine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri.....	38
Şekil 3.8.	Deneyin yapılışı.....	45
Şekil 4.1.	Grupların 2. Hafta BT defekt çap ölçümleri	62
Şekil 4.2.	Grupların 4. Hafta BT defekt çap ölçümleri.....	62
Şekil 4.3.	Grupların 8. Hafta BT defekt çap ölçümleri.....	63
Şekil 4.4.	Defekt, PLGA, %10HA grubunun 4. ve 8. hafta kesit görüntüleri.....	64
Şekil 4.5.	%2,5BN+HA, %5BN+HA, %10BN+HA grubunun 4. ve 8. hafta kesit görüntüleri.....	65
Şekil 4.6.	%2,5BN, %5BN, %10BN grubunun 4. ve 8. hafta kesit görüntüleri....	66

Şekil 4.7.	%2,5BN+%10HA ve %2,5BN grubunun 4. ve 8. hafta yakınlaştırılmış kesit görüntüleri.....	67
Şekil 4.8.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta Yabancı Cisim Bulguları.....	68
Şekil 4.9.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta Yabancı Cisim Bulguları.....	68
Şekil 4.10.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta Primer Kemik Oluşum Bulguları.....	69
Şekil 4.11.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta Primer Kemik Oluşum Bulguları.....	69
Şekil 4.12.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta Fibrozis Bulguları.....	70
Şekil 4.13.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta Fibrozis Bulguları.....	70
Şekil 4.14.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta TNF- α mRNA ekspresyonları.....	71
Şekil 4.15.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta TNF- α mRNA ekspresyonları.....	72
Şekil 4.16.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta Osteopontin mRNA ekspresyonları.....	73
Şekil 4.17.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta Osteopontin mRNA ekspresyonları.....	73
Şekil 4.18.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta BMP-2 mRNA ekspresyonları.....	74
Şekil 4.19.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta BMP-2 mRNA ekspresyonları.....	74

Şekil 4.20.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta Runx-2 mRNA ekspresyonları.....	75
Şekil 4.21.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta Runx-2 mRNA ekspresyonları.....	76
Şekil 4.22.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta ALP mRNA ekspresyonları.....	77
Şekil 4.23.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta ALP mRNA ekspresyonları.....	77

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 2.1.	İdeal greft materyalinin özellikleri.....	23
Tablo 3.1.	Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	31
Tablo 3.2.	Hidroksiapatit üretiminde incelenen deneysel parametreler.....	33
Tablo 3.3.	Sentezlenen HAp'ye ait kafes parametreleri ve kristal çapları.....	35
Tablo 3.4.	HAp örneğine ait elementel analiz verileri.....	40
Tablo 3.5.	Deney Planı.....	44

1. GİRİŞ

Günümüzde artan iş temposu ve trafik kazaları sonucunda; kafatası kırıklarıyla daha sık karşılaşılmaktadır.¹ Yapılan çalışmalar kalvariumda defekte yol açan nedenler arasında travmanın %67, tümörlerin ise %17 gibi büyük bir paya sahip olduklarını göstermektedir.² Bu gibi durumlardan sonuçlanan kemik hasarlarında kemik iyileşmesini sağlamak ülkemiz ve tüm dünya geneli için önemli sağlık sorunları arasındadır.^{3, 4}

Kemik defektlerinin iyileşmesinde primer amaç, kendiliğinden ve hızlı bir şekilde iyileşmeyi sağlamaktır. Ancak oluşan defektin büyüklüğüne göre iyileşme azalmakta ve hatta hiç iyileşmemekte ve cerrahi müdahaleye gerek duyulmaktadır.⁵⁻⁷ Uygulanan tedavi yaklaşımları arasında “altın standart” yaklaşım otogreft kullanımıdır.⁸ Ancak hastada sağlıklı kemiğin yeteri kadar olmaması ve otogreftin alınacağı bölgedeki oluşacak problemler otogreft kullanımını sınırlamaktadır. Otogreft dışında kranium defektlerinin iyileştirilmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Ksenogreftler, allogreftler, altın, gümüş, titanyum gibi metaller ve alloplastik materyaller de bu tür defektlerde kullanılmaktadır. Her bir yöntemin avantajı bulunmasına rağmen bu tür yaklaşımların sonucunda doku rezorbsiyon, enfeksiyon, doku reaksiyonu ve donör alan morbiditesi gibi önemli klinik problemler ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden enfeksiyon riski bulunmayan, doku ile uyumlu yeni kraniyoplastik materyeller geliştirilmektedir. Kemik defektlerinin yeniden yapılanması amacıyla kullanılan materyallerin, osteojenik aktivitelerinin olması ve kemik rejenerasyonu ile tamirini stimüle edici özelliklerinin bulunması tercih edilmektedir.⁹ Kemik gibi dokuların inorganik yapısını meydana getiren, kalsiyum fosfatlı bir biyoseramik malzeme olan hidroksiapatit (HA) bu amaçla kullanılmaktadır ve büyük kemik defektlerinde yapısal desteğe ihtiyaç duyulduğunda önem kazanmaktadır.⁹

Bor madeninden birçok malzeme üretilmiş olup konumuzla ilgili en önemli ve en destekleyici malzeme ise nanoteknoloji ile üretilmiş Bor nitrürdür (BN). Bor nitrür, kendine has fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip oluşu nedeni ile mühendislik uygulamalarında tercih edilen bir malzemedir. Yapısal olarak grafit benzer hekzagonal yapıda, düşük yoğunluğu, yüksek ısı

iletkenliği, kimyasal kararlılığı ve toksik olmaması gibi özellikleri nedeni ile tıp, ilaç ve kozmetik sektöründe de tercih edilen bir malzemedir.

En önemli iz elementlerden biri olan boron embriyojeneziz, kemik büyümesi ve immün fonksiyonların sürdürülmesi gibi pek çok fizyolojik olaylarda önemli rollere sahiptir.¹⁰ Konumuzla ilgili olarak Lahiri D ve ark. 2011 yılında yaptığı bir çalışmada BN ve hidroksiapatitin in-vitro ortamda osteoblastların biyokompatitesinde önemli rollerinin olduğunu göstermiştir.¹¹

Boron kemik büyümesindeki bu etkilerinin osteoindüktif büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin salınımı artırarak katkı sağladığı gösterilmiştir.¹²⁻¹⁴ Yine 2015 yılında yapılan bir çalışmada osteoporotik ratlardaki femur defektinde boron içeren scaffold uygulamasının iyileşmeye katkı sağladığı gösterilmiştir.¹⁵ 2010 yılında yapılan diğer çalışmada ise BN toksisitesinin olmadığını gösterilmiştir.¹¹ Ayrıca hücre kültürü çalışmaları boron kemik gelişimi için faydalı olduğunu göstermektedir. 1 veya 10 ng/mL Bor dozlarının 0 ve 0.1 ng/mL dozlarıyla hücre kültüründe karşılaştırılması sonucu 1 veya 10 ng/mL dozlarında bor'un osteoblast (MC3T3-E1) hücrelerinde tip 1 kollajen, osteopontin, osteokalsin ve Runx2 mRNA ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir.¹⁶ Ayrıca bor verilmesinin BMP 4, 6 ve 7 seviyelerini artırdığı da gösterilmiştir.

Çalışmamızın konusu ile ilgili olarak HA-hBN kompozitlerinin kalvarial kemik defektlerinin iyileşmesi alanında kullanıldığı bir uygulama henüz yoktur. Bizde ayrı olarak çalışmamızda kritik boyuttaki kafatası defektlerinde scaffold içine emdirilen BN ve HA'nın farklı kombinasyonlarının kemik iyileşmesinde etkili olup olmayacağını radyolojik, histolojik ve moleküler yöntemler ile incelemeyi ve kalvarial defektlerin tedavisinde yeni yöntemler geliştirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemiğin yapısı ve fonksiyonu

Biyolojik olarak dinamik bir doku olan kemik metabolik olarak aktif hücrelerden oluşmaktadır. Kemiğin 3 önemli ana fonksiyonu vardır: Mekanik destek, vital organlar ve kemik iliğinin korunması, serum kalsiyum ve fosfat dengesinin korunmasıdır.^{17, 18} Kemiğin iyileşme potansiyeli kırığın tipine göre değişmekte ve aynı zamanda pek çok biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik mekanizmalardan etkilenmektedir.^{19, 20} Kemik iyileşme sürecinde depozisyon, resorpsiyon yeniden yapılanma aşamaları meydana gelmektedir.^{19, 21} Kemik iyileşmesinin temel biyolojik ve fizyolojik prensiplerini anlamak için kemiğin biyokimyasal ve anatomik yapısının çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

2.2. Kemiğin biyokimyası

Kemik organik ve inorganik iki kısımdan oluşur. Kemiğin fonksiyonlarının tam olarak yerine getirebilmesi için organik ve inorganik matrisin belli oranlarda bulunması gerekmektedir. Kemik ağırlığının %20'si su, kuru kemik ağırlığının %60-70'i inorganik kalsiyum fosfat, %30-40'ı ise organik fibröz protein ve kollajenden oluşmaktadır.²²⁻²⁴

Organik kısım; osteoblastlar tarafından salgılanan mineralize olmamış organik yapıdan oluşur (osteoid).

Tip I kollajen → %90

nonkollajenöz proteinler (glikoproteinler, proteoglikanlar),

peptitler,

karbohidratlar,

lipidler

} %10

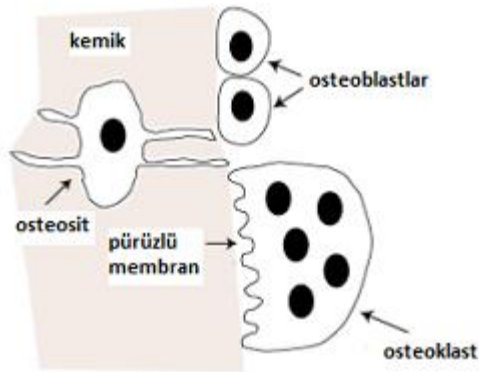
İnorganik kısım; kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum, sodyum gibi minerallerden oluşmaktadır. Vücuttaki kalsiyumun %99'u, fosforun %85'i, magnezyum ve sodyumun %40-60'ı iskelet sistemindedir. Kemikteki kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklinde

bulunmaktadır. Gelişimini tamamlamış bir kemik dokuda kollajen lifler porus adı verilen boşluklar bırakacak şekilde dizilmiştir ve bu boşluklara hidroksiapatit kristalleri(HA) yerleşiktir.²²⁻²⁴

HA kristallerinin önemiye, osteoid mineralizasyonu, kollajenlerle birlikte kemiğin sertlik ve dayanıklılığını sağlamasıdır.²²⁻²⁴ Osteoid kemiğin mineralize olmayan organik matriks kısmıdır ve osteoblastlar tarafından salgılanmaktadır. Osteoid yaklaşık %90 tip-1 kollajen içermektedir ve geri kalan %10'luk kısmı ise kollajen olmayan proteinler, glikoproteinler, proteoglikanlar, peptidler, karbohidratlar ve lipitlerden oluşmaktadır.²⁵ Kollajen fibrillerin tercih doğrultusunda katmanda katmana yetişkin bir kemikte değişmesi kemiğin lameller yapısını kazandırmaktadır.²⁶ İnorganik mineral tuzları tarafından osteoid mineralizasyonu kemiğin sert ve sağlam olmasını sağlar. Osteoidin kalsifikasyonu salıverildikten sonra birkaç gün içinde başlamaktadır ancak tamamlanması aylarca sürmektedir.^{27, 28}

2.3.Kemiğin Anatomisi

Kemiğin hücresel elemanlarını osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve hematopoetik kemik iliği hücreleri oluşturmaktadır (Şekil 2.1).^{18, 25, 29}



Şekil 2.1. Kemikte bulunan farklı hücreler: osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler.³⁰

Osteoprogenitör hücreler endosteum ve periosteumun iç kısmında bulunmaktadır.³¹ Periost eklem yüzeyleri hariç kemiğin tüm bölgelerini saran vasküler bağ dokusudur. Endosteum kemiğin iç medullar yüzeyindeki hatlarıdır. Endosteum tabakası fibröz dokudan yoksundur ancak, tek katmanlı osteogenik hücrelerden oluşmaktadır.³²

Osteoblastlar metabolik olarak aktif olan olgunlaşmış kemik hücreleridir.²⁶ Osteoblastlar paratiroid hormon ve prostaglandin reseptörlerine sahiptir.³³

Ayrıca osteoblastlar östrojenler, Vitamin-D3, adhezyon molekülleri ve pek çok sitokin reseptörlerininde eksprese etmektedir. Osteoblastların plazma membranında alkalın fosfataz bol miktarda bulunmaktadır. Alkalın fosfatazın serum konsantrasyonu kemik formasyonu için indeks olarak kullanılmaktadır.

Osteositler küçük osteositik lakunalarda kemik lamellasının içine eş merkezli olarak gömülü olan olgun osteoblastlardır.²⁶ Herbir osteositin kan damarlarına ve diğer osteositler ile hücre hatları arasında sitoplazmik bağlantı süreci silindirik kanaliküler boyunca uzanmaktadır. Bu süreç osteoid kalsifikasyonundan önce organize edilmekte ve tüm kemik matriksine yayılmaktadır. Osteositler aynı zamanda ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun düzenlenmesine yardımcı olmaktadır.²⁰

Osteoklastlar kemik rezorpsiyonundan sorumlu hücrelerdir.²⁶ Osteoklastlar çok nukleuslu kandaki monositlerden farklılaşan dev hücrelerdir. Osteoklast farklılaşması ve aktivasyonuna yol açan pek çok faktör bulunmaktadır (tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör (TNFR)/TNF like proteins: osteoprotegerin (OPG), reseptör aktivatör of nuklear faktör (NF)- B (RANK) ve RANK ligand (RANKL)).³⁴

Osteoklastların kemik rezorpsiyonu hormonal ve hücrel mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir. Osteoklastların plazma membranında monosit koloni stimulan faktör (M-CSF) ve kalsitonin reseptörleri bulunmaktadır.¹⁷ Osteoklastların aktivasyonu Howships lakuna olarak adlandırılan bölme ile sınırlandırılmaktadır. Howship lakunaları düşük pH'ya sahiptir. Doğal asit kemiğin mineral içeriğinin çökünmesine neden olur ve bu sayede kemiğin organik matriksi proteazlar ve kollagenezlar tarafından parçalanabilir duruma gelmektedir.^{26, 35}

Vücudumuzda 3 tip kemik bulunmaktadır; woven kemik, kortikal kemik ve kanselloz kemik.^{26, 36} Sadece mikroskobik kanallar içeren kortikal (kompakt) kemik çok yoğundur.³⁷ Bu kısım kemiğin dış tabakasını oluşturur ve iskelet sisteminin destekleyici ve koruyucu işlevinin

büyük bölümünü sağlar. Toplam kemik kütlesinin %80'i kortikal, %20'si ise süngerimsi kemikten oluşmaktadır. Süngerimsi kemik trabeküllerden oluşmaktadır. Süngerimsi kemik omurgada, uzun kemiklerin uç kısmında ve fetüste bulunur.

Olgun kemik lameller kemiktir. Lamellar kemik birbirine paralel kollajen liflerden yapılan katmanlar veya lamellerden oluşur. Lamellar kemiklerde lakuna adı verilen boşluklar kanalikuli olarak adlandırılan tübüler kanallar yoluyla birbirine bağlanmıştır. Osteositler bu boşluklara yani lakunalara gömülüdür ve kemik ile besin ve uyarı alış verişi kanalikuliler aracılığıyla olur. Olgun kortikal kemikte lamellerin sıralanışı düzenlidir ve bu yapı osteon adını alır. Osteonlar, havers kanalı adı verilen merkezi bir kanalın etrafını saran yoğun matriks halkalarından (lameller) oluşur.^{25, 37} Havers kanalları kan damarlarını içerir ve bunlar kemiğin uzun eksenine paraleldir. Bu kan damarları ile kemik yüzeyindeki kan damarları kanalikuliler aracılığıyla birbirine bağlanır.

2.4.Kemik Metabolizması Düzenleyicileri

Kemik metabolizması hormonal ve lokal faktörlerle düzenlenir. Kemik metabolizmasındaki en önemli kalsitropik hormonlar paratiroid hormonu, D vitamin ve kalsitonindir.¹⁹ Paratiroid hormonu plazma kalsiyum konsantrasyonunu artırır ve vücudun hücre dışı kalsiyumunu sabit düzeyde tutar. Osteoblastlar sitoskeletal değişiklikleri tetikleyen tek kemik hücresi ve paratiroid hormon reseptörleri olan tek hücredir. D vitamini bağırsak ve böbrek kalsiyum bağlayıcı proteinleri uyarır ve aktif kalsiyum taşınımını kolaylaştırır.³⁸ Kalsitonin, akut bir şekilde yükselen plazma kalsiyum düzeyine cevaben tiroid bezinin parafoliküler hücreleri (C-hücreleri) tarafından salgılanır. Kalsitonin, kalsiyumun bağırsaklar tarafından emilimini inhibe ederek, böbrekteki Ca ve PO₄'un yeniden emilimini inhibe eder ve kemik düzeyindeki osteoklastik aktiviteyi inhibe ederek kandaki kalsiyum düzeylerine etki eder.³⁹

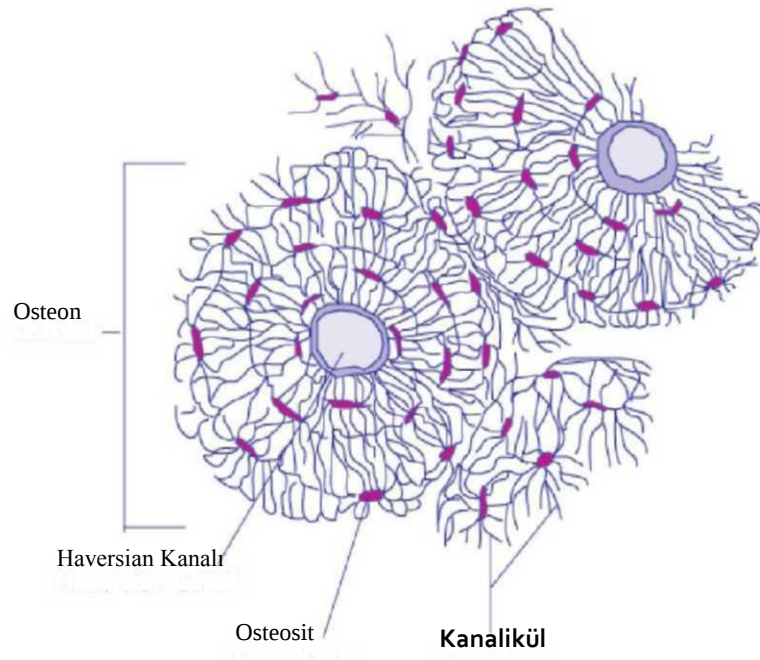
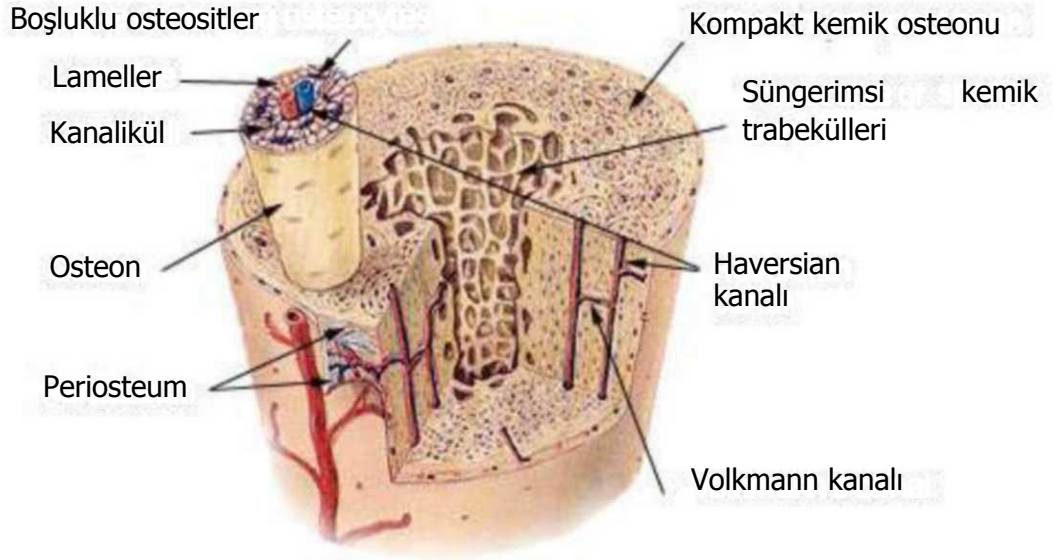
Kemik metabolizmasını trombositler, makrofajlar ve fibroblastlardan salınan bir dizi büyüme faktörü de etkiler.⁴⁰ Bu büyüme faktörleri, iyileşen kemiklerin vaskülerize olmasını, sertleşmesini, birleşmesini ve mekanik olarak işlevsel hale gelmesini tetikler.²⁰ Mezenşimal türevli hücrelerin taşınmasını, çoğalmasını ve kemik oluşturu hücreler haline gelmesini tetikleyebilir.

Kemik iyileşmesini hızlandıran büyüme faktörleri, diğerlerinin yanı sıra kemik morfojenik protein (BMPlar), insülin benzeri büyüme faktörleri, dönüştürücü büyüme faktörleri, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörüdür.⁴⁰ BMP'ler, mezenşimal hücrelerin kemik hücreleri haline gelmesini tetikleyen kemik matrisi türevli bir glikoprotein ailesidir.⁴¹ Normalde çok küçük miktarlarda bulunsalar da pek çok BMP, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak sentezlenmiştir ve şu anda kemik yenilenmesini kolaylaştırma potansiyellerini değerlendirmek üzere klinik deneylerden geçmektedir.⁴²⁻⁴⁴ Diğer proteinler, kemik iyileşmesini farklı şekillerde etkilemektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü de anjiyogenez, kemik oluşumu, hücre dışı matris sentezi düzenlenmesi ve kontrol hücre aracılı aktivitelerin düzenlenmesinde rol oynar.⁴⁵

2.5. Kemiğin Yeniden Oluşması

Yetişkin iskeleti dinamik bir halde olup sürekli bozulmakta ve osteoklastik ile osteoblastik aktivitelerin kemikli yüzeylerde ve haversian sistemindeki koordineli hareketleri ile düzeltilmektedir.²⁰ Kemik formasyonu ve rezorbsiyonu, kemik gelişiminin düzenli bir fonksiyonu ya da eski kemiğin yerini yeni kemiğin aldığı döngü mekanizması olarak ortaya çıkar.¹⁷ Kemiğin yeniden oluşum aktivitesi, esasen periferde olup konsantrik kemik büyümesi ve lamellar kemiğin döngü özelliğiyle sonuçlanır. Olgun iskelet elementinde kemik formasyonu, genellikle kemik rezorbsiyonunun daha önce döngüsel bir yapıda meydana geldiği yerde oluşur. Bu olgu, ilk olarak Frost tarafından açıklanan aktivasyon-rezorbsiyon-formasyon (ARF) dizisini takip eder. ARF dizisi, rezorbsiyon ve hareketi eski ve yeni kemik segmentleriyle birlikte sementte sınırlayan ters-dönme fazı ile ön plandaki osteoklastik aktiviteden ortaya çıkan “kesik koniyi” kapsar. Sonuç olarak, kapanan koni osteoblastik aktivitenin özelliğidir ve dinlenme fazı, konsantrik bir ortamda yeni bir kemik yapısı biriminin (KYB) oluşumuna yol açar.⁴⁶ Bu tür bir sistemde oluşan lamellar kemik, bir haversian sisteminde özelliğe halka benzeri bir yapı kazandırır (Şekil 2.2). Süngerimsi kemiğin yeniden oluşmasının rezorptif fazı yaklaşık olarak 10 gün sürer.³⁹ Süngerimsi kemiğin tam olarak yeniden oluşum döngüsü ise yaklaşık olarak 3-6 ayı bulur (Eriksen, Axelrod, & Melsen,

1994). Kortikal kemik anatomik açıdan farklı olsa da, yeniden oluşması aynı biyolojik ilkeleri izler.²⁶



Şekil 2.2. Haversian sistemdeki olgun kortikal ve süngerimsi kemik arasındaki ilişki ¹

2.6.Kırık İyileşmesi

Kemik, erişkin yaşamında yenilenme potansiyelini koruyan ve kendi kendini tamir için önemli kapasiteye sahip olan birkaç organdan biridir. Bağ dokusu skar oluşumuyla iyileşen diğer dokuların aksine, kemik iyileşmesi genellikle eski şekil ve işlevin geri gelmesine imkan tanır. Bu eşsiz özellik, ya insan iskeletinin periyodik olarak yeniden şekillenmesi ya da kemik greftleri ve kırıklarının iyileşmesi şeklinde kendini göstermektedir.⁴⁷

Kemik kırığı, teknik olarak dışsal veya içsel bir mekanik kuvvet nedeniyle kemiğin kalsifiye yapısının aniden kırılmasıdır. Kırık iyileşmesine ilişkin çağdaş görüş ve anlayış, fizyolojik ve biyomekanik ilkelerin yanı sıra moleküler düzeyde çok sayıda faktörü kapsamaktadır. Bu farklı elemanların koordinasyonlu etkileşimi karmaşık kemik iyileşme yolunu oluşturmaktadır. Kemik iyileşme aşamaları embriyonik endokondral kemik oluşumu sıralı aşamalarını takip eder.⁴⁸ Üç temel histolojik kemik iyileşme türü vardır. Bunlar arasındaki farklılık kırık bölgesinin rijit fiksasyonuna ve kemik segmentleri arasındaki boşluğun büyüklüğüne bağlıdır. Kemik kırığı bölgelerindeki iyileşme şeklini farklı redüksiyon teknikleri ve kırık ortamları belirler.^{47, 49}

Birincil kemik iyileşmesi, granülasyon dokusu oluşumu olmaksızın osteonal iyileşmeye imkân tanıyacak şekilde sıkıca sabitlenmiş ve anatomik olarak mikrometrik düzeye indirgenmiş bir kırık olarak tanımlanmaktadır.⁴⁸ *Soudure autogene* (otojen kaynama) veya birincil iyileşme teorisi ilk olarak ortopedik alanda tanımlanmıştır. Danis, dış kallus oluşumu gösteremeyen, fiksasyon plakaları tarafından indirgenmiş uzun kemik kırıklarının radyografik analizini bildirmiştir. Birincil kemik iyileşmesinde, kemik proliferasyonu seviyesinin bunun oluşumu için duyulan mekanik ihtiyaçla orantılı olması anlamında Wolff yasasının klasik ilkesine uyulmaktadır.⁵⁰ Sonuç olarak, birincil kemik

iyileşmesinde, rijit fiksasyonun sağladığı stabilite, stabil bir kallus oluşturmak için duyulan biyolojik ihtiyacı ortadan kaldırabilir.⁵¹

Teorik olarak, birincil kemik iyileşmesinde interfragmenter boşluk ihmal edilebilir ve osteoklastik rezorpsiyon tarafından genişletilmediği sürece hücrelerin ve kapillerin minimal içe büyümesini engeller. Osteoklastlar, günde 50-80 pikometrelik(pm) bir hızla kırık boşluğu boyunca boylamasına “osteoklastik rezorpsiyon” oluşturur.⁵² Osteoklastik rezorpsiyon; osteoblastik proliferasyon ve vasküler içe büyümede 200 pm’lik bir kaviteye neden olur. Osteoblastlar daha sonra genç hastalarda günde 2 pm oranında ve yaşlı hastalarda 0.5-1.0 pm oranında yeni çevresel lameller üretir.⁵¹ Yeniden oluşum süreci sonuç olarak eski yapının yerine Haversian bir sistemdeki kırık bölgesi boyunca boylamasına oluşan bir katmanlı kemik oluşturur.

Rijit fiksasyon ile tedavi edilen kırıklar, her ikisi de kırık dokudan kemik oluşumu sağlayan birincil iyileşme veya boşluk iyileşmesi ile iyileşebilir. Bazı çalışmalar birincil kemik iyileşmesinin gerçekçi olamayacak kadar yüksek düzeyde stabilite gerektirdiğini ve klinik uygulamada nadiren ulaşabildiğini ortaya koymaktadır. Bu argüman, rijit fiksasyon durumlarında boşluk iyileşmesi teorisini daha da destekliyor gibi görünmektedir.⁴⁹ Bir kırık rijit fiksasyon ile tedavi edildiğinde işlev sırasındaki kas gerginliği kemik segmentleri arasında boşluk oluşturabilir. Boşluk iyileşmesi bu durumlarda oluşur. Periosteum, endosteum veya önceden mevcut kanallardan gelen vasküler içe büyüme boşluğu işgal edip bölgeye mezenşimal osteoblastik prekürsörler sağlayabilir. Yeni kemik, önceden osteoblastik aktivite veya kartilajinöz prekürsörler olmadan doğrudan kırık segmentlerinin yüzeyine çökebilir. Boşluk 0.3 mm’den azsa doğrudan katmanlı kemik oluşacaktır.⁴⁶ İndirgenmiş kırık bölgelerinde kritik değer boşluk iyileşmesi için 1 mm’dir.⁴⁶ 1 mm’den büyük boşluklar örülen kemikle ve daha sonra trabeküler bölgeler içindeki katmanlı kemik birikmesi ile dolar. Müteakip altı hafta

boyunca katmanlı kemik, kırık hattı boyunca boylamasına oluşumunu sürdürecektir. Yeniden oluşum birkaç ay boyunca gerçekleşecek ve katmanlı kemiğin kırık kemik segmentlerinin uzun aksı boyunca yeniden yönlenmesine neden olacaktır.⁴⁶ Yeniden oluşum sürecine işlevin ve sağlamlığın geri dönüşü eşlik edecektir.

İkincisi, kemik iyileşmesi ilgili kırık segmentlerin granülasyon dokusu müdahalesiyle yeniden birleşmesiyle karakterizedir. Rijit fiksasyon ile tedavi edilen kırıkların çoğunda ikincil kemik iyileşmesi ile devam edilmektedir. İkincil kemik iyileşmesi hem intramembranöz hem de endokondral kemikleşmeyi kapsar ve kallus oluşumuna neden olur. Kallus, kırık iyileşme süreci boyunca homojen değildir. Philips farklı bölgelerin iyileşme sürecine katkısını açıklamıştır.⁴⁹ Dört temel bölge; medüller kanal, korteksler arasındaki bölge, subperiostal tabaka ve çevresindeki yumuşak dokulardır. Medüller kanal ve interkortikal bölgeler yumuşak kallus oluşumu yoluyla yenilenir ve daha sonra endokondral kemikleşme yoluyla kemiği oluşturur. Subperiostal alan ve kırığın hemen çevresindeki yumuşak dokular sert bir kallus oluşturur ve intramembranöz kemikleşme yoluyla kemik oluştururlar. Philips aynı zamanda beş geçici kronolojik kırık iyileşme aşaması tanımlamıştır. Bunlar; hematoma oluşumu, inflamasyon, anjiyogenez, kırıkta oluşumu ve kemik yeniden oluşumdur.⁴⁹

Bu olaylar akışında bazı biyolojik ön gereklilikler tespit edilmiştir.^{47,53} Hücre dışı osteokondüktif matriksin yanı sıra pek çok lokal ve sistemli düzenleyici faktörün, sitokinlerin ve hormonların çeşitli hücre türleriyle etkileştiği görülmektedir. Engelsiz bir kemik iyileşme süreci için hareketli bir hücre popülasyonu zorunlu bir birincil unsurdur. Multipotent mezenşimal hücreler kırık yara alanında kullanılır veya dolaşım yoluyla buraya aktarılır. Bir kırığa kemik iliği yanıtı kemik iliği içindeki hücresel dağılımın yüksek ve düşük hücresel yoğunluktaki bölgelerde erkenden yeniden yapılanmasını kapsar.^{54,55} Yüksek hücresel yoğunluğun bulunduğu bölgeler mezenşimal kök hücrelerin

oseoblastlara dönüştüğü yerlerdir.⁵⁵ Kemik iliği hücrelerinin osteojenik rolünün ileri seviyede araştırılması ve tanımlanması, çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda kırık iyileşmesinin hızlandırılması için kullanılan genetiği değiştirilmiş mezenşimal kök hücrelere ve farklılaştırılmış oseoblastlara neden olmuştur.^{56, 57}

Kemiğin kırılmasından hemen sonra haversian kanallardaki ilik, periosteum, endosteum ve kapillerdeki hasar gören kan damarlarında kanama gerçekleşir. İyileşmenin ilk aşamalarında kırık bölgesinde kan pıhtısı gelişir ve infrazyondan sonraki birkaç saat boyunca hemostatik bir tıpa görevi görür. Bölgedeki yumuşak dokular vazodilatasyonlu akut inflamasyonun olağan değişikliklerini ve enflamatuar hücrelerle plazma bakımından zengin eksudasyonunu gösterir. Daha sonra pıhtılı trombositler degranüle olur ve PDGF, TGF- α ve TGF- β büyüme faktörleri salar.⁵⁸ PDGF çoğalmak için ilik kök hücrelerinin ve endosteal osteoblastların mitojenezini uyarır. Endotelial hücre çoğalmasını tetikleyerek anjiyogenez de uyarır. TGF- α , çoğalmak ve farklılaşmak için ilk olarak fibroblastları, kondroblastları ve osteoblastları harekete geçirir. Devam eden TGF- α salınımı sonuçta osteoblastların osteoid salınımını başlatmasını tetikleyecektir.

Bu erken sürecin birincil besin ve oksijen tedariki kırık bölgesinde hasara maruz kalan süngerimsi kemik ve kas tarafından sağlandığından, zarar gören dokunun mikro çevresi hipoksik ($pO_2 = 5-10$ mm Hg) ve asidotiktir ($pH = 4-6$).⁵⁸ Pıhtı yeniden yapılanmaya başladığında polimorflar, histiositler ve mast hücreleri kısa süre sonra degradasyon sürecini başlatır. Bu; granülasyon dokusunun oluşmasına, vasküler dokunun içe büyümesine ve mezenşimal hücrelerin taşınımına neden olur. Üçüncü gün itibarıyla, kapillerin grefte girdiği ve granülasyon dokusunun kırık segmentleri arasındaki boşluğu kapatmaya başladığı görülebilir. Kırıktan sonra erkenden hâkim olan, anaerobik koşulların vasküler olarak bir nebze feda edilmesi osseousten daha kartilajinöz hale gelen bir kallusun evrimi için uygun bir mikro çevre sağlıyor gibi görünmektedir.⁵¹

Reparatif aşamada, fibroblastlar vasküler içi büyümenin desteklenmesine yardımcı olan bir stroma bırakmaya başlar. 14 ila 17. günler arasında tam kapiller geçirgenlik görülür. Vasküler içe büyüme ilerledikçe, zamanla bir kollajen matrisi bırakılır. Kondroblastlar ve osteoblastlar da sırasıyla kıkırdak ve osteoid bırakmaya başlarlar. Bu, stabilizasyon amacıyla kırık segmentlerinin etrafında yumuşak bir kallus oluşumuna neden olur. Yumuşak kallus, iç destek sağlar ve kırık bölgesinde fibro kartilojen bir birliğe ulaşılmasına yardımcı olur. Kallus, ilik kavitesi boyunca harici olarak oluşur ve zarar gören bölgedeki hareketi sınırlayabilir. İmmobilizasyon yeniden zarar görmesinin önlenmesine yardımcı olur ve yeni oluşan kan damarlarının bozulmasını ve granülasyonunu önler. Bununla birlikte, harekete direnç bakımından bu kallus iyileşme sürecinin ilk dört haftası boyunca çok zayıftır ve iç fiksasyonun desteklenmesi bakımından yeterli korumaya ihtiyaç duyar. Dört haftadan sonra hücre çoğalması durur. Yumuşak kallusta kondrositler apoptoz ve hücre nekrozu geçirmeye başlar. Son olarak yumuşak kallus endokondral kemikleşme yoluyla kemikleşir ve kırık bölümleri arasında örülmüş bir kemik köprüsü oluşturur. Örülen kemikle katı birleşme yaklaşık altı hafta itibarıyla gerçekleşir.⁵¹ Alternatif olarak, uygun immobilizasyon kullanılmazsa kallusun kemikleşmesi gerçekleşebilir ve stabil olmayan fibröz bir birlik ortaya çıkabilir.⁵⁹ Kırık iyileşmesi, iyileşen kemiğin eski şeklini, yapısını ve mekanik sağlamlığını geri kazandığı yeniden oluşum süreciyle sona erer. Kemiğin yeniden oluşumu dört hafta sonra başlar ve aylar ile yıllar arasında değişen bir süre boyunca yavaşça gelişir. Karşılıklı osteoblastik ve osteoklastik aktivite yavaş yavaş örülen kemiğin yerine katmanlı kemiği getirir. Süreç; aktivasyon-rezorpsiyon-oluşum (ARF) aşamalarından oluşur. Kemik üzerindeki mekanik gerginlikler yeniden oluşum sürecini kolaylaştırır. Kırık bölgesi aksiyal bir yükleme kuvvetine maruz bırakıldıkça kemik genellikle gereken yerde oluşur ve gerekmeyen

yerden emilir. İkincil kemik iyileşmesi sırasında yeterli sağlamlığa 3 ila 6 ay arasında ulaşılır.²¹

2.7 Kemik Defektleri

Kemik defektleri hastalıklara bağlı, cerrahi işlemler sırasında veya en önemlisi de travmalara bağlı gelişebilmektedir. Travmalara bağlı olarak ABD de her yıl 7,9 milyon kişide kemik kırıkları geliştiği kaydedilmiştir.⁶⁰ Hastaların yaklaşık %5-10'ununda iyileşme sırasında istenmeyen komplikasyonlar gelişmektedir.^{61, 62} Yıllık yaklaşık olarak 1,5 milyon kişiye kemik grefti operasyonu yapılmaktadır. Bu yüzden kemik defekti alanına uygun doğal kemik dokusunu şekillendirebilecek, kemik regenerasyonunu artırmaya yönelik greftler ihtiyaç duyulmaktadır.

2.8. Kritik Büyüklükte Kemik Defekti

‘Kritik büyüklükteki kemik defekti’ni ilk kez Schmitz and Hollinger tanımlamışlardır.⁶³ Buna göre kritik büyüklükteki kemik defekti ‘organizmanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki kemik içi defekt’ olarak tanımlanmıştır. Bu tip defektler, yeni kemik oluşumu yerine fibröz bir bağ dokusu ile dolar.⁵ Sıçanlarda kritik büyüklükteki kraniyal kemik defekti “8 mm çapındaki bir dairesel kemik defekti” olarak tanımlanmıştır.^{63, 64} Sıçanlarda kritik büyüklükteki kraniyal kemik defektinin primer fibröz kallus dokusu ile dolduğu ancak üç aylık periyotta minimal bir kemikleşmenin olduğu tespit edilmiştir.^{63, 65}

2.9. İyileşmeyi Etkileyen Faktörler

Kalsifikasyon, osteoblast benzeri hücrelerin çeşitli etkenler tarafından tetiklenmesi sonucu kemik formasyonuna dönüşmesi ile oluşur. İn vitro çalışmalarda osteoblastların hidroksiapatit mineralleri etkisi ile kemik oluşumunu meydana getirdiği bilinmektedir.⁶⁶ Osteoblastlar BMP, RANKL ve inflamatuvar mediatörler gibi çeşitli faktörler ile kemik oluşumu teşvik etmektedir⁶⁷

Bunular arasında yer alan OPN, kalsiyum ve hidroksiapatitin bağlandığı kemik matriksinde bulunan ve hücre dışında biriken bir glikoproteindir ayrıca secreted phosphoprotein 1 (SPP1), 44 kDa kemik fosfoprotein olarak da bilinmektedir.⁶⁸ Osteopontin integrin bağlayıcı bir protein olarak çalışmaktadır. Fizyolojik olarak osteoblastların farklılaşması ve kemik şekillenmesi gibi önemli görevlerde rol almaktadır.⁶⁹ Osteopontin, osteoblast ve osteoklast hücrelerinin farklılaşmasını ve adhezyonunu da teşvik etmektedir ⁷⁰ bu yüzden osteopontin kemik minerilizasyonunu inhibe eden önemli proteinlerden biridir.^{71, 72} Yapılan çalışmalarda Osteopontinin hidroksiapatite bağlanması ile minerilizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir.⁷²

Osteokalsin osteoblastlar tarafından salınan ve kemik şekillenmesinin belirleyicilerinden biri olan minerilizasyonu teşvik eden ve 49 aminoasitlik kollejen olmayan bir proteindir.⁷³ Kemik metabolizmasının düzenlenmesi için biyokimyasal aktiviteye sahiptir.⁷⁴

Kemik metabolizmasını kontrol eden faktörler arasında BMP (bone morphogenetic peptide) de yer almaktadır. TGF- β süper ailesinin çok fonksiyonlu büyüme faktörlerinin bir üyesidir. Bu faktörler doğum sonrası iskeletin embriyonik gelişimde kemik oluşumunu da düzenlemektedirler. BMP hücre içi sinyal yollarını harekete geçirerek Runx2 molekülü ile etkileşime girerek kemik oluşumunu da teşvik etmektedirler.⁷⁵

Hücrenin çekirdeğine bağlanan faktör alfa (CBFA1) ve osteoblast spesifik faktör (OSF2) olarakta bilinen⁷⁶ Runx2, kemik gelişiminde rol alan önemli bir transkript faktörüdür. Osteoblastik hücrelerden köken alan yapılardan sentezlenmektedir. ⁷⁷ İn vitro ve in vivo çalışmalarda osteoblast farklılaşmasında ve dolayısı ile kemik oluşumu sırasında ve de minerilizasyonunda Runx2'nin gerekli bir transkript faktörü olduğu

gösterilmiştir.⁷⁷ Runx2, kollajen tip I, osteopontin, osteokalsin (OC) dahil olmak üzere birçok osteoblastik genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir.⁷⁸

Osteoprogenitör hücreler farklılaşarak osteoblastik fenotipi birkaç aşamada gerçekleştirirler. İlk aşamada hiç veya çok düşük kemik alkalin fosfataz aktivitesi göstermekle beraber minerilizasyon aktivitesi göstermezler. İkinci aşamada ise kemik ekstraselüler matriksin olgunlaşması ile kemik ALP ve kollojen tip 1 gibi genler aktif hale gelirler. Böylelikle yüksek kemik ALP aktivitesi oluşur ancak kemik minerilizasyonu düşük olur. Üçüncü aşama ise farklılaşma aşaması olmakta ve ekstraselüler matriks minerilizasyonu artmaktadır. Osteoblastlarda kemik ALP aktivitesi orta seviyededir ve minerilizasyon ve matriks proteinleri ise yüksek aktivite gösterir.⁷⁹⁻⁸¹

Kemik dokunun bir tamamlayıcısı olan kollojen kemik matriks proteinlerinin yaklaşık % 80'ini kapsamaktadır.⁸² Bu açıdan kollojen miktar değişikliği kemik mineral artışı ve kemiğin kırılabilirliğini etkileyebilir. Kollojeni oluşturan genetik yapıların mutasyonu kişilerde kemik kırılabilirliğini ve de dolayısı ile kemik yeniden oluşumunu etkileyebilmektedir.⁸² Tip 10 kollojen (COL10A1) özellikle hipertrofik kondrositlerde ekspresyon edilmektedir. Kemikleşmenin gerekli olduğu yerlerde tip 10 kollojen ekspresyonu olarak uygun ortamın oluşmasını sağlar.⁸³ Kemik ile ilgili hastalıklarda veya iskelet sisteminin gelişimi aşamasında kollojen 10'un klinik öneminin olduğu gösterilmiştir.

2.10.Kemik Defektinde Otogreft Yerine Kullanılan Malzemeler

Otolog kemik grefti altın standart olsa da mevcut kemik bozukluklarını normalleştirmek için çeşitli malzemeler kullanıldığı görülmektedir.⁸⁴ Kemik yerine kullanılan malzemeler polimerler ve seramikler olarak iki kategoriye ayrılabilir; bunların her biri de kendi arasında biyobozunur ve biyobozunmaz olarak iki alt kategoriye ayrılır. Mevcut seçenekler arasında allogreftler, ksenogreftler ve sentetik aşılama malzemeleri

bulunmaktadır. Gelecekteki aşılama malzemeleri büyük ihtimalle tamamen sentetik olacak ve hiçbir hastalık bulaşma şansına yer bırakmayacaktır. Teknolojideki gelişmelere bakılmaksızın, aşılama malzemeleri doğal kemik iyileşmesi sürecini izlemelidir. İdeal bir kemik grefti malzemesinin sahip olması gereken üç özellik şunlardır: (i) osteokondüksiyon (Alıcı kemikten vasküler ve perivasküler yapıların grefte ilerlemesi için greftin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesidir) (ii) osteoindüksiyon (Plüripotent hücrelerin çevre dokuda osteoblastik fenotipe dönmelerini uyarabilmektir) ve (iii) osteojenez (Graft materyali içindeki hücrelerin elemanların, transplantasyon sonrası hayatta kalarak, nakledilen alanda yeni kemik oluşturabilmesidir). Osteointegrasyon veya kemik yüzeyine arada fibröz bir doku olmaksızın bağlanabilme becerisi bazı kişiler tarafından dördüncü ideal özellik olarak gösterilmiştir.⁸⁵ Yalnızca otojen kemik bütün gereklilikleri yerine getirmektedir. Sentetik kemik greftinde şu anda yalnızca osteointegratif (Graftın arada fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde alıcı kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunabilmesidir) ve osteokondüktif özellikler bulunmaktadır. Sentetik bir greft malzemesi aynı zamanda ilk kanama veya enflamatuar faz tarafından yerinin değiştirilmesine karşı da dayanıklı olmalıdır. Aynı zamanda konakçı vasküler dokunun ve müteakip lökosit aksiyonunun penetrasyonuna da izin vermelidir. Bu aksiyon, osteoklastlarla osteoblastların zamanında yeniden vaskülarizasyonuna ve indüksiyonuna neden olup nihai olarak osteointegrasyona imkan tanır. Kemik yerine kullanılan malzeme konusunun kapsamı geniştir. Bu bölümde kemik yerine kullanılan allogreft ve sentetik malzemelerin genel olarak gözden geçirilecek ve kemik bozukluklarını normalleştirme konusundaki rollerine odaklanılacaktır.

2.10.1. Allojenik Bioimplantlar

Allogreftler (aynı türden fakat genetik olarak farklı iki birey arasında yapılan doku transferi), osteojenik hücreler dışında otogreftlerle aynı özellikleri sağlayan alternatif kemik greftleridir.⁸⁶ ABD’deki mevcut kemik greftlerinin yaklaşık üçte biri allogrefttir.⁸⁷ Allogreftler osteointegratif ve osteokondüktiftir ve osteoindüktif potansiyel sergileyebilir ancak hücresel hiçbir bileşen içermediklerinden osteojenik değildir. Allogreftler taze, donmuş, dondurularak kurutulmuş, mineralize ve demineralize olarak hazırlanabilir ve her bir preparat kortikal kemik, süngerimsi kemik, ya da kortikokanselöz kemik bloku veya partikülü formunda kullanılabilir. Her bir allogreftin özellikleri malzemenin işlenmesi ile bağlantılıdır. Allogreftlerle ilgili komplikasyonlar arasında kırık, kaynaşmama ve enfeksiyon bulunmaktadır.⁸⁶ Allogreft kırık oranlarının yaklaşık %19’u ortopedik alanlarda bildirilmiştir.⁸⁸ Klinik, radyolojik ve histolojik kaynaşma arasında farklılıklar bulunduğundan allogreft kaynaşmasının klinik olarak değerlendirilmesi zordur. Radyolojik kaynaşmama, ortopedik vakaların yaklaşık %17’sinde beklenebilir.⁸⁶ Bakteriyel enfeksiyon greft büyüklüğünün artmasıyla daha sık görülür ve büyük allogreftlerin %10’undan fazlasında görülebilir. Amerikan Doku Bankaları Birliği’nin kabul ettiği katı yönetmelikler son yıllardaki virüs bulaşma oranlarını en aza indirmiştir. Kan naklindeki 450,000’de 1’lik riskle karşılaştırıldığında HIV’e yakalanma riskinin 1.6 milyonda 1 olduğu tahmin edilmektedir.^{89,90} Nakledilecek greftler alındıktan sonra debridman, ultrasonik yıkama, etilen oksitten geçirme, antibiyotik yıkama ve sporların giderilmesi için gama ışınlaması dahil bir dizi yöntemle işlemden geçer.⁸⁴ Bununla birlikte, ekstra işlemden geçirmeye greftin biyolojik ve mekanik özellikleri azalmaktadır. Bu adımların amacı, greftin biyolojik özelliklerini korurken antijen bileşenleri gidermek ve konakçı immün yanıtlarını azaltmaktır.⁹⁰ Taze veya donmuş allogreftler en yüksek osteoindüktif ve osteokondüktif potansiyele sahip olsa da,

yüksek konakçı immün yanıtı ve hastalık bulaştırma riski nedeniyle nadiren kullanılmaktadır.⁹¹ Dondurulup kurutulmuş kemik greftleri en az immunojen olanlardır ancak taze veya donmuş allogreftlerle karşılaştırıldığında daha düşük osteokondüktif özellikler, mekanik özellikler ve sağlamlık taşırlar. Greftin kimyasal bütünlüğü korunarak allogreftin hücresel fazı giderilerek dondurup kurutma süreci boyunca konakçı immün yanıtı ve enfeksiyon riskleri azaltılmaktadır.⁹²

2.10.2. Dondurulup Kurutulmuş Kemik Allogreftleri (Mineralize ve Demineralize)

Mineralize greftlerde osteokondüktif özellikler bulunmakta ancak osteokondüktif beceriler bulunmamaktadır. Konakçı kemikle greft birleşmesi, aşıl原因 malzemenin yapı iskelesine doğru vasküler içe büyüme yoluyla başlatılır. 150 ila 500 pikometre (pm) arasında değişen gözenek büyüklükleri, greft birleşmesi için optimum büyüklüklerdir.⁹³ Dokuda tutulan mineral yalnızca çerçeve desteği sağlamakla kalmaz aynı zamanda konakçı hücre yanıtını da etkiler. Piattelli ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma dondurulup kurutulmuş kemik allogreftinin (FDBA) demineralize dondurulup kurutulmuş (DFDBA) kemik allogreftinden daha iyi işlev gösterdiğini ortaya koymuştur.⁹⁴ Araştırmalarında, FDBA greftlerinde osteositler ve bozulmamış haversian sistemler bulunurken, DFDBA'deki osteositik boşlukların çoğunlukla boş kaldığı bildirilmiştir. Aynı zamanda, konakçı-greft arayüzünden en uzakta olan FDBA partikülleri yeni kemikte gömülüyken konakçı-greft arayüzünden en uzakta olan DFDBA partiküllerinin bağlayıcı doku ile çevrili olduğunu da bildirmişlerdir. DFDBA maksiller sinüs augmentasyonlarında otolog kemikle karşılaştırıldığında, %40'lık otolog kemik oranıyla karşılaştırıldığında DFDBA %29 yeni kemik oluşumu göstermiştir.⁹⁵ Yine, halihazırda bulunan kemiğe yakın konumdaki DFDBA partiküllerinin yeni kemikle

çevrelendiği ancak greftin merkezine yakın partiküllerin hiçbir yeniden mineralleşme veya yeni kemik oluşumu sinyali vermediği bildirilmiştir.⁹⁵

2.10.2.1. Demineralize Kemik Matrisi

Demineralize kemik matrisi (DBM) kortikal kemiğin dekalsifikasyonu yoluyla oluşturulmaktadır. Standart mineralize allogreftten daha osteokondüktiftir ve mineral fazının ortadan kalkmasıyla kemik büyüme faktörlerinin çoğunu korur. Yeterli osteoindüktif özelliklerin bulunması için mineral içeriğinin en az %40'ı çıkarılmalıdır.⁹⁰

Demineralize greftin kalsiyum içeriğinin ağırlıkça %2'den az olması durumunda greftlerin osteoindüktif özelliklerinin ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir.⁹⁶ DBM kullanmanın avantajı istenen herhangi bir bozukluğa uyacak şekilde şekillendirilebilmesidir. Bir dezavantajıysa düşük viskoziteyle bağlantılı teknik zorluktur. Malzemenin yeri değişebilir ve stabilizasyon membranı olmadan yerleştirildikten sonra aşılama prosedürüne fayda sağlamayabilir. Taşıma özelliklerini iyileştirmek için DBM'e yardımcı maddeler ya da taşıma araçları eklenmiştir. Daha iyi taşıma ve uyum sağlamak için vücut sıcaklığına getirildiğinde yapışkan bir jel olan Poloxamer 407 bir ters faz ko-polimer örneğidir. Bu ko-polimer aynı zamanda, BMP'ler gibi aktif bileşenlerin yavaş salınımı için bir rezervuar görevi de görebilir. Diğer ko-polimerler arasında poliglikolik/polilaktik asit bulunmaktadır ancak daha yavaş emilim gerçekleştirip iyileşme bölgesinde boşluklar bırakmaktadır, bu da fibröz doku iyileşmesine neden olmaktadır.⁹³

Allogreftin mineral içeriği, greft bölgesindeki büyüme faktörlerinin salınımı ile doğru orantılıdır. BMP'ler kemik mineralleri tarafından kaplandığından mineralize kemik matrisi minimum osteoindüktif özelliklere sahiptir.⁹³ Büyüme faktörleri artıp mezenşimal hücreler uyarıldığından greftin mineral içeriği azaltıldığında osteoindüktif özellik artmaktadır. Bunun tersine, mineral içeriğinin azalması greftin mekanik sağlamlığını da

azaltmaktadır. Sonuçta, mineral içeren biyoimplantlar kemik üretiminden önce emilirken demineralize kemik greftleri kemik indüksiyonu sırasında rezorpsiyon geçirmemektedir.⁹⁷

2.10.3. Sentetik Malzemeler

Sentetik kemik greftleri, ideal bir kemik grefti malzemesinin üç özelliğinden yalnızca ikisine sahiptir: osteoentegrasyon ve osteokondüksiyon. İdeal olarak sentetik kemik grefti malzemeleri biyouyumlu olmalı, minimum fibrotik reaksiyon göstermeli, yeniden oluşumdan geçmeli ve yeni kemik oluşumunu desteklemelidir. Mekanik bir bakış açısından, sentetik kemik grefti malzemeleri, değiştirilen kortikal/süngerimsi kemiğe benzer sağlamlıkta, osteopeniyi önlemek için kemiğinkine benzer bir elastikiyet modülünde ve periyodik yükleme altında yorgunluğu önlemek için yeterli sertlikte olmalıdır.⁸⁶

Kemik doku mühendisliğinde sentetik veya doğal scaffoldlar genellikle çeşitli polimer, biyoaktif camlar ve seramikler ile hazırlanmıştır.⁹⁸ FDA (U.S. Food and Drug Administration) scaffoldlar arasında poli-laktit ko-glycolideasid (PLGA) kullanımını da onaylamıştır. PLGA, sentetik bir polimer materyal olup, yapılmış olan in vivo ve in vitro kemik iyileşmesi çalışmalarında biyouyumluluk ve mekaniksel bakımdan çeşitli oranlarda arzu edilen iskele yapısını oluşturduğu tespit edilmiştir.⁹⁹⁻¹⁰¹ Ancak PLGA'nın laktik ve glikolik asit oluşumu gibi yan tesirleri meydana gelebileceği gibi bununla birlikte kemik iyileşmesinde uyumluluk ve biyogüvenilirliği bakımından deneysel ve klinik çalışmalar da yapılmıştır.¹⁰²

PLGA iskelet yapısı, osteoblast veya mezenkimal kök hücre implantasyonu yapılarak kemik iyileşmesini teşvik eden önemli greft adayları arasındadır. Ayrıca PLGA scaffoldlar, uygun bir kök hücre kaynağı kullanılarak kemik iyileşme süresini kısaltmak

ve doku miktarını arttırmada kullanılabilecek önemli potansiyel greftler içerisinde yer almaktadır¹⁰³

İdeal Greft Materyalinin Özellikleri

Gerek sert doku, gerek yumuşak doku veya kombine defektlerin onarımında kullanılan greft materyallerinin esas görevi, defektlerin en kısa sürede, anatomik forma en uygun şekilde kapatılmasını ve yeni oluşacak dokulara rehberlik etmesini sağlamaktır (Tablo 2.1).^{104, 105}

Tablo 2.1. İdeal greft materyalinin özellikleri ⁹

1. Alıcı sahaya uyumlu olmalı,
2. Geniş defektler oluşturan cerrahi girişimler sonucu meydana gelen doku kayıplarını karşılayabilmeli
3. Antijenik özellik taşımamalı,
4. Yeterli destek ve stabiliteyi sağlayabilmeli,
5. Revaskülarizasyonu, osteogenezisi ve osteoindüksiyonu kolaylaştırmalı,
6. Greftleme sonrası kullanılabilirliği iyi olmalı,
7. İstenilen forma kolayca getirilebilmeli,
8. Defekt için yeterli miktarda temin edilebilir olmalı,
9. Adeziv yeteneği iyi olmalı,
10. Karsinojenik ve toksik etkileri olmamalı,
11. İkinci bir cerrahi operasyona ihtiyaç duyulmamalı,
12. Osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri olmalı,
13. Uzun süre saklanabilmeli,
14. Allerjik olmamalı,
15. Cerrahi sahadaki mekanik kuvvetlere karşı dirençli olmalı,
16. Maliyeti ucuz olmalı,
17. Kullanımları için detaylı ekipmana gereksinim duyulmamalı,
18. Uygulanımları kolay olmalı,
19. Sterilizasyonu etkili ve kolay olmalıdır.

2.11. Kemik Grefti İyileşmesi

2.11.1. Genel Greft İyileşmesi

Kemik greft modelindeki kemik iyileşme fizyolojik aşamaları uzun kemik kırıklarında meydana gelenlere benzese de bazı farklılıklar mevcuttur. Her türlü kemik grefti kemiği üç olası mekanizma yoluyla yenileyebilir: osteojenez, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon. Greftler, bu mekanizmaların değişen seviyelerdeki kombinasyonuyla kemiği geliştirebilir.⁸⁵

Kemik nakline doku tepkisi histolojik tanımları ilk olarak 1893 yılında Barth tarafından ve 1907 yılında Axhausen tarafından ortaya konulmuştur.^{106, 107} Kemik nakillerinin inert olduğu ve zamanla nekroz geçirdiği varsayımında bulunmuşlardır. Nekrotik kemiğin yerine, nakledilen kemikteki yeni ve hâlihazırda bulunan kanallar boyunca hareket eden invazif kan damarları yoluyla yeni kemik geçer. Bu süreç, Axhausen tarafından “schleichender ersatz” veya sürünen süstitüsyon olarak adlandırılmıştır.¹⁰⁷ Ham ve Gordon da, köpeklerin kas keselerine taze ve dondurulmuş otojen süngerimsi kemik naklederek kemiğin inert olmadığını göstermiştir. Yeni kemik oluşumu yalnızca yeni nakledilen greftte görülmüştür. Yeni kemiğin, greft malzemesinde hayatta kalan ve çoğalan nakledilmiş hücrelerden oluşabileceği sonucuna varmışlardır.¹⁰⁸ Gray ve Elves, çeşitli otojen greft malzemelerinin nispi katkısını sıçan modeline süngerimsi kemik yerleştirerek açıklamıştır. Osteojeneze olan katkı yüzdesi, bir veya birden fazla hücre bileşeninden mahrum olan greftlerdeki tutulum karşılaştırılarak tahmin edilmiştir. Her bir osteojenez unsurunun kemik grefti iyileşmesine olan katkısı şu şekildedir: kemik iliği stroması ile birlikte endosteal astar hücreleri %60; periosteal hücreler %30; serbest hematopoetik ilik hücreleri ve osteositlerin önemli bir katkısı olmamıştır.¹⁰⁹ Bu bulgular, daha önceden kortikal kemik greftleri için bildirilenlerle karşılaştırılmıştır. Osteojenez oranı, süngerimsi greftlerde aynı ağırlıktaki kortikal

greftlerden 2.2 kat daha yüksekken aynı hacimdeki greftler karşılaştırıldığında yalnız 1.7 kat daha yüksek bulunmuştur.¹⁰⁹ Lindholm ve Urist de endosteumun, osteojenezin temel kaynağı olduğunu ve naklin ilk haftasında ancak birkaç kan yapıcı hücrenin canlı kalabildiğini onaylamıştır.¹¹⁰ Benzer şekilde, kanalikuli boyunca besin dağılımının bir sonucu olarak osteositlerin yalnızca küçük bir bölümü canlı kalabilmektedir. Canlı kalan hücrelerin besinlere ulaşabilmesi için kemik yüzeyinden 0.3 mm'lik kritik bir uzaklık gereklidir ve bu nedenle osteositlerin çoğu, kemik grefti iyileşmesine çok az katkıda bulunmaktadır.¹¹¹

İlk kez Axhausen tarafından ortaya konulan kemik grefti iyileşmesi osteojenez için iki aşamalı bir süreç olarak tanımlanmıştır.¹⁰⁷ Birinci aşama, otojen kemik grefti içinde nakledilen hücrelerden kaynaklanan kemik yenilenmesidir. İkinci aşamada alıcı dokuların katkıları yoluyla kemik yenilemesi ve yeniden oluşumu gerçekleşir. Birinci aşama, aşılamaı takip eden birinci haftada başlar ve dördüncü ila altıncı hafta sona erer. Greftin içindeki nakledilmiş osteokompetent hücreler çoğalmaya ve osteoid oluşturmaya başlar. Bu hücreler lokal çevreye açıktır ve greft kapiller içe büyüme ile yeniden vaskülarize olana kadar oksijen ve besin dağılımı (plazmatik dolaşım) ile canlı kalır.⁸⁵ Son olarak, birinci iyileşme aşamasında oluşan yeni kemik miktarı nakledilen canlı osteokompetent hücre sayısına bağlıdır. Elde edilen örülmüş kemik son derece hücresel ve düzensizdir. Kemik yeniden oluşumunun ikinci aşaması ikinci hafta itibarıyla başlar ve dördüncü veya beşinci hafta itibarıyla tepe noktasına ulaşır. Bu aşamada oluşan kemik, alıcı yatağından çıkan ve yeni veya halihazırda mevcut kanallarla grefte taşınan osteokompetent hücrelerden meydana gelecektir. İkinci iyileşme aşamasında kemik, Haversian sistemin yeniden kurulduğu, katmanlı sıkıştırma (lamellar compaction) adı verilen bir yeniden oluşum durumundan geçecektir.²⁰ Yeni oluşan kemik sürekli olarak

yenilendiğinden bu kemik iyileşme aşaması süresiz olarak devam edecektir. İkinci aşama, greftin host yatağına düzenli bir şekilde dahil edilmesinden sorumludur.¹¹²

2.12. Bor Mineralinin Genel Özellikleri

Bor, periyodik tabloda B simgesiyle bilinen, ısıya karşı dayanıklı, sert bir elementtir. Bor elementi erime noktası 2300 °C iken, 2500 °C ‘de kaynamaktadır¹¹³ ve doğada ortalama 230 farklı bor türü bulunmaktadır. Ayrıca doğada serbest olarak değil, tuz formu şeklinde ve bazı elementlerle bileşik olarak bulunmaktadır. Dünyadaki en önemli rezervleri Rusya, ABD ve Türkiye’de bulunan bu element, askeriye, bilgisayar sistemleri, inşaat sektörü, otomobil sektörü gibi 400’den fazla alanda değerlendirilmektedir. Türkiye Bor maden kaynaklarının %72’sine sahiptir.

Bor madeninden birçok malzeme üretilmiş olup konumuzla ilgili en önemli ve en destekleyici malzeme ise nanoteknoloji ile üretilmiş Bor nitrür (BN)’dür. BN düşük yoğunlukta ve kimyasal kararlılığı olan ısıya dayanıklı kendine has özellikleri olan birçok alanda kullanıldığı gibi mekanik alanda da tercih edilmektedir¹¹³ Sanayinin pekçok kolunda, farklı amaçlarla kullanılmasının yanında, bor sağlık açısından da önemli bir mineraldir. Kalsiyum, magnezyum ve fosfor mineralleri ile Vitaminin-D’nin vücutta korunmasına ve etkili bir şekilde kullanılmasına yardımcı olarak diş ve kemik sağlığının korunmasına katkıda bulunur. ¹¹⁴ Beyin gelişimi ve fonksiyonlarında önemli role sahiptir.¹¹⁵ Özellikle kadınlar açısından, östrojen hormonunun çalışmasını destekleyici ve kemik erimesini azaltıcı etkilerinden dolayı gereklidir.¹⁰⁷

İnsanlık ve sağlık alanında elmaştan sonra en sağlam maden olan ve toksik olmayan BN’nin kalvarial defektlerde tek başına veya HA kombinasyonu, çeşitli büyüklükteki bir taşıyıcı sistem ile plaklar halinde veya toz şeklinde defekt bölgesinin içine veya dış kısmına uygulanmasıyla kırık veya defekt iyileşmesi ve kırık sonrası oluşan enfeksiyonların önlenmesinde kullanılması önem kazanmaktadır.

2.12.1. Bor Mineralinin Kemik Doku Üzerine Etkisi

Bor canlılar için eser mineraller arasında yer almaktadır.¹¹⁶ İnsanlarda ve çeşitli hayvan modellerinde de borun kemik mineral dengesini etkilediğine dair pek çok çalışma mevcuttur.^{117, 118} Ayrıca; embriyogenesis, kemik büyümesi, bağışıklık ve psikomotor becerileri gibi birçok fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynayan insan vücudunda eser elementlerden de biridir.¹⁰

Doku mühendisliğinde günümüze kadar kemik dokularının tamiri ve yeniden oluşumu için multidisipliner alanlarla yeni bir dayanıklı biyouyumlu biyometaryallerin geliştirilmesi için büyük ölçüde çalışmalar yapmışlardır.^{119, 120}

Yapılan önceki çalışmalarda bor eksikliğinin diğer stres faktörlerinden bağımsız bir şekilde kemik büyümesini azalttığı gösterilmiştir.¹²¹ Bor eksikliğinde osteoblast aktivitesinin azaldığı ve 10 veya 20 gün boyunca 3mg/gün dozunda bor diyetinin dental kemik gelişimini artırdığı gösterilmiştir.¹²²

Bor'un embriyonik dönemden itibaren büyümeyi doza bağlı olarak artırdığı gösterilmiştir.¹²³ Ratlar ve tavuklarda yapılan bir çalışmada diyetle verilen bor'un büyümeyi artırdığı gözlenmiştir. Çalışmada Vitamin-D eksikliği oluşturulan tavuklarda bor verildiğinde gözlenen büyüme bor yokluğunda gözlenmemiştir.^{10, 124}

Konumuzla ilgili olarak Lahiri D et al 2011 yılında yaptığı bir çalışmada BN ve HA'nın in-vitro ortamda osteoblastların biyokompatitesinde önemli rollerinin olduğunu göstermiştir.¹¹ Bor'un kemik büyümesindeki bu etkilerine osteoindüktif büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin salınımı artırarak katkı sağladığı gösterilmiştir.¹²⁻¹⁴ Bor'un leptin desteği ile kemik immobilizasyonunu azalttığı ve kemik oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir.¹²⁵ Yine 2015 yılında yapılan bir çalışmada osteoporotik ratlardaki femur defektinde boron içeren scaffold uygulamasının

iyileşmeye katkı sağladığı gösterilmiştir.¹⁵ 2010 yılında yapılan diğer çalışmada ise BN toksisitesinin olmadığını göstermiştir.¹¹

Ayrıca hücre kültürü çalışmaları borun kemik gelişimi için faydalı olduğunu göstermektedir. 1 ve ya 10 ng/mL bor dozlarının 0 ve 0.1 ng/mL dozlarıyla hücre kültüründe karşılaştırılması sonucu 1 ve ya 10 ng/mL dozlarında borun osteoblast (MC3T3-E1) hücrelerinde tip 1 kollajen, osteopontin, osteokalsin ve RunX mRNA ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir.¹⁶ Ayrıca bor verilmesinin BMP 4, 6 ve 7 seviyelerini artırdığı da gösterilmiştir.

Boron kemik büyümesindeki bu etkilerinin osteoindüktif büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin salınımı artırarak katkı sağladığı gösterilmiştir.¹²⁻¹⁴ Bu amaçla, kemik dokusu için biyomalzeme olarak geleneksel bor içeren iskele yapıları son on yıl içinde geliştirilmekte ve denenmekte olup çalışmamızın konusu ile ilgili olarak HA-hBN kompozitlerinin kalvarial kemik defektlerinin iyileşmesi alanında kullanıldığı bir uygulama henüz yoktur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Araştırma Laboratuvarı, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarında, Yeditepe Üniversitesi Biyomühendislik ve Genetik Anabilim Dalında, Sabancı Üniversitesi (SUNUM)'da ve de Anadolu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji Mühendisliği Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

3.2. Deney Planı

Bu çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) bünyesindeki deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen toplam 200 adet ve ağırlıkları 230-250 gram arasında değişen Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Deney süresince, sıçanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve pellet yem verildi. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde laboratuvarında normal oda sıcaklığında (22°C) barındırıldı ve beslendi. Çalışmamızın bütün aşamalarının etik kurallara uygun olduğu “Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK)” tarafından verilen 25 Temmuz 2014 tarihli ve 366389-127 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tiopental Sodyum (Pental Sodyum IV flakon) İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş. İstanbul, Türkiye: Çalışmada i.p.(intraperitoneal) olarak ötenazi için 50 mg/kg olarak verildi.

Ksilazin (Xylasinbio, İntermed eczadeposu Ltd.Şti., Ankara): Çalışmada i.p. olarak sedasyon için 10 mg/kg olarak verildi.

Ketamin (Ketalar 50mg/ml flakon): Çalışmada i.p. olarak anestezi için 80 mg/kg olarak verildi.

Metamizol Sodyum (Novalgin 1 g/2 ml IM/IV ampul) Sanofi Aventis İlaçları Ltd. ŞTİ. İstanbul, Türkiye: Cerrahi girişim sonrası ağrı kesici olarak 25 mg/kg intramüsküler olarak 3 gün verildi.

Sefazolin Sodyum (İESPOR 1 g IM Flakon) İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş. İstanbul, Türkiye: Postoperatif dönemde 25 mg/kg/gün intramüsküler 3 gün uygulandı.

%10 Povidon İodine Antiseptik Solüsyon: Cerrahi insizyon alanlarının dezenfeksiyonu ve operasyon sonrası pansuman için 3 gün kullanıldı.

Hidroksiapatit (HA) Nanotech İleri Teknoloji San. ve Tic. Ltd. Eskişehir, Türkiye

Bor Nitrür (BN) Bor Teknolojileri ve Mekatronik AŞ. Eskişehir, Türkiye

PLGA veya poly(lactic-co-glycolic acid) (50/50 lactide:glycolide, Mw 30,000-60,000): Taşıyıcı iskenin (Scaffold) yapısı olarak kullanıldı.

Cyclohexane, 1,4-dioxane, methanol, n-hexane, Gelatin, powder, parafin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS): Taşıyıcı iskenin (Scaffold) yapımında kullanıldı.

3.2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihaz	Marka/Model
TissueLyser II	QIAGEN, Hilden, Germany
QIAcube	QIAGEN, Hilden, Germany
Thermal Cycler Veriti	Applied Biosystems, CA, USA
Epoch spectrophotometer	Biotek, Highland Park, USA
Real-Time PCR	Applied Biosystems, CA, USA
Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany
pH Metre	SCHOTT Instruments Lab 850, Germany
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A, Germany
Hassas Terazi	Shimadzu ATX224, USA
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
8mm'lik Trepan Frezi	Dentimplants, Türkiye
Trepan Frez Pnömotik Motoru	Dentimplants, Türkiye
Karıştırıcı	IKA- MS 3 basic, USA
Ultra Derin Dondurucu (-86°C)	Nuaire NU-9483E, USA
Derin Dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µ)
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus
Cerrahi set	F.S.T. Germany
Otoklav Wac47	DAIHAN, Güney Kore
Dewar transport vessels	LLG, Germany
Kafes	Tecniplast, Italy

3.2.3. Scaffold İmalatı

Parafin kürelerin hazırlanması

Parafin küreler standart bir protokol ile toplam 100 mL içerisinde 20 g parafin ve % 8'lik jelatin solüsyonunda 80 °C' de (w/v) hazırlandı. Homojen olarak karıştırıldıktan sonra parafin kürelerin kısa bir süre içerisinde katılaşması için buzla soğutulmuş su içerisine döküldü.

Katı hale gelen parafin küreler iki kez distile su ile yıkandı ve vakum altında kurutuldu. Kuru parafin bloklar 212 ve 425 µm olacak şekilde standardize edilerek kesildi.

PLGA (poly-(lactide-co-glycolide) İskelesinin (Taşıyıcı) Yapımı

PLGA taşıyıcı iskeleleri daha önce Dan Li, ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada göstermiş oldukları metoda küçük modifikasyonlar yapılarak hazırlandı.¹²⁶ Kısaca, 212 ve 425 µm olacak şekilde hazırlanarak sodyum klorür (NaCl) elde edildi. %12 PLGA/ 1,4-dioksan çözeltisi gruplarda belirlenen oranlarda hazırlanan BN ve HA oranında karıştırılarak parafin küreler 1 saat boyunca 45°C' de sonikasyon yapıldı. Hazırlanan çözeltiler 1: 10 oranında tuz ile karıştırıldıktan teflon kalıplar içerisine dökülerek -20°C de 1 saat inkübe edildi.

Daha sonra örnekler 2 gün süre ile soğukta kurutulduktan sonra saf su içerisine atılarak tuzun çözünmesi sağlandı. Her 6 saatte bir suyu değiştirilen örnekler 2 gün sonra -86°C de dondurulduktan sonra 2 gün daha soğutup kurutma işlemine tabi tutuldu. Deney numuneleri -86°C' de deney gününe kadar saklandı.

Scaffold karakterizasyonu

PLGA scaffoldlar -n-n porozitesi ve interkonnektivitesi SEM (Scanning electron microscopy) mikroskobu ile belirlendi. SEM görüntüleri SEM Zeiss EVO 40 (Jena, Germany) ile elde edildi.

3.2.4.Hidroksiapatit Üretimi

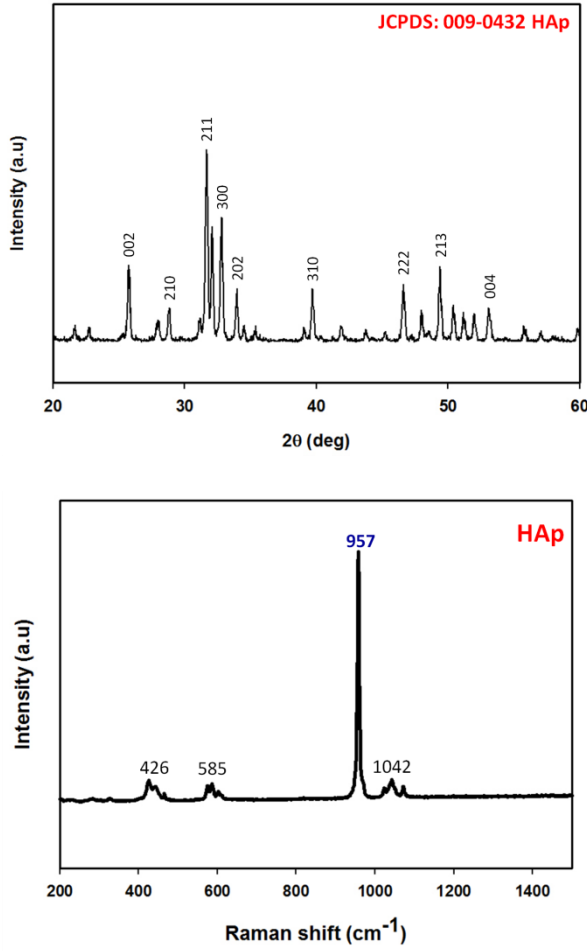
Sol-Jel Yöntemiyle HA Üretimi

Deneysel çalışmalarda kalsiyum ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Merck, %99) ve fosfor ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Sigma Aldrich, %99) öncü bileşenleri $\text{Ca/P} = 1.67$ olacak şekilde hazırlanarak her bir çözeltinin pH'sı NH_3 ile 10'a ayarlandıktan sonra kalsiyum çözeltisi fosfat çözeltisine ilave edilirken, süspansiyon bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılarak homojenlik sağlanmıştır. 48 saat yaşlandırma süresi sonunda santrifüjleme sonrası ultra saf su ile yıkama yapılmış olup süzme işlemini takiben yapılan 80°C 'de 12 saat kurutma ve 750°C 'de 3 saat sinterlem sonucu nano boyutlu HAp elde edilmiştir.

HA Üretiminde Yapıya Yönelik Karakterizasyon Analizleri

Sentezlenen HA örneklerinin yapılarını belirlemek için XRD (Bruker D8 Advance) ve Raman (Renisaw InVia Raman) analizleri yapılmıştır (Şekil 3.1).

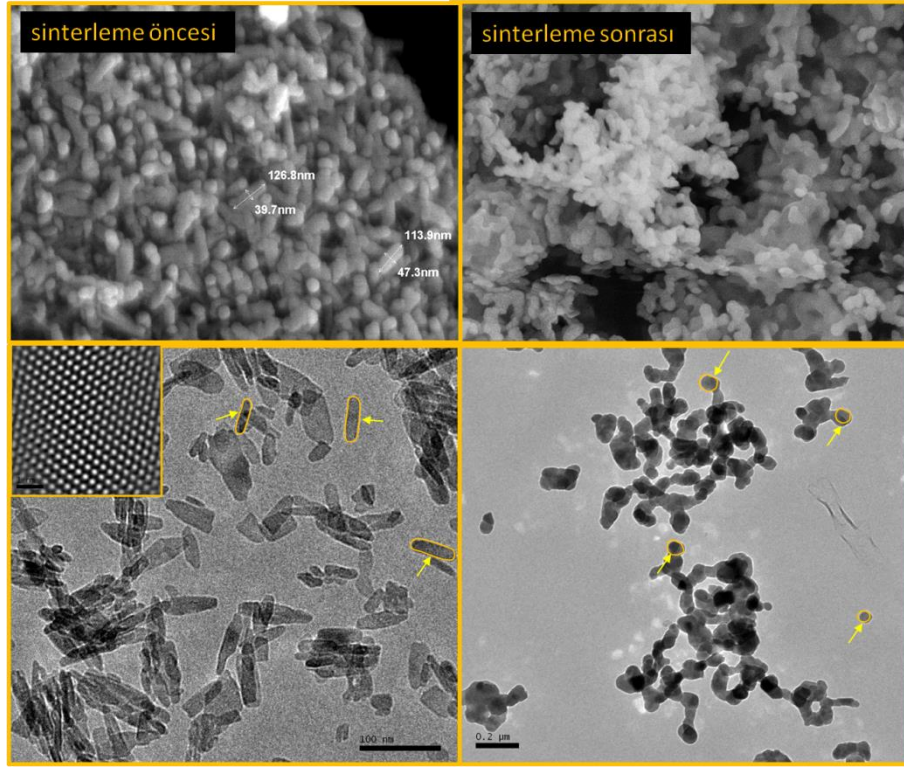
X-ışını difraksiyonu (XRD), malzemelerin kristalografik özelliklerinin ve içerdikleri fazların belirlenmesini sağlayan analiz yöntemidir. XRD analizlerinde Bruker D8 Advance XRD cihazı kullanılmış olup, ICDD referans difraktogramlarla kıyaslama yapılarak elde edilen ürün karakterize edilmiştir. Spektrumdaki bütün pikler JCPDS kart numarası 09-0432 olan HAp'ye ait pikler olup, ikinci faz bulunmamaktadır. Raman spektrumunda görülen pikler HAp'ye ait karakteristik piklerdir¹³¹⁻¹³⁵.



Şekil 3.1. 48 saat yaşlandırma süresi sonucu üretilen 750°C’de sinterlenmiş numunenin XRD ve Raman spektrumları

HA Üretiminde Morfolojiye Yönelik Karakterizasyon Analizleri

Elde edilen partiküllerin morfolojik incelenmesinde geçirimli elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elektron mikroskobu ile birlikte kullanılan X-ışını Spektrometresi (EDS). kullanılmıştır. Numunelerin yüzeyi iletken olmadığından SEM incelemeleri esnasında yüzeylerin yüklenmemesi için örnekler Pt/Pd ile kaplanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Sinterleme öncesi ve sonrası HAp örneğine ait ikincil elektron SEM (üst) ve TEM (alt) görüntüleri

3.2.5. Trikalsiyumfosfat (TcP)–Hekzagonal Bor Nitrür Kompozitlerinin Hazırlanması

Uygun bileşimdeki kompozit reçetelerinin hazırlanmasında TCP (tri kalsiyum fosfat) tozları kullanılmıştır. Yapılan çalışmada tozlar agat havanda uygun tane boyutuna getirildikten sonra plastik değirmende zirkonya bilya kullanılarak sulu ortamda karıştırılmıştır. Denemelerde porozite oluşturmak amacıyla farklı oranlarda PVA (polyvinilalkol) kullanılmıştır. Standart TCP ve TCP-hBN kompozit kompozisyonları bilyalı değirmende hazırlanmıştır. Hazırlanan çamurlar etüvde 24 saat kurutulduktan sonra halkalı değirmende 3 dakika süre ile öğütülmüştür. Tozların ısıl özellikleri DSC cihazında belirlenmiştir. Tozların şekillendirilmesinde tek eksenli el presi kullanılmıştır. Tozlar 17 mm çapa sahip çelik kalıplar kullanılarak 500 psi yük altında pelet haline

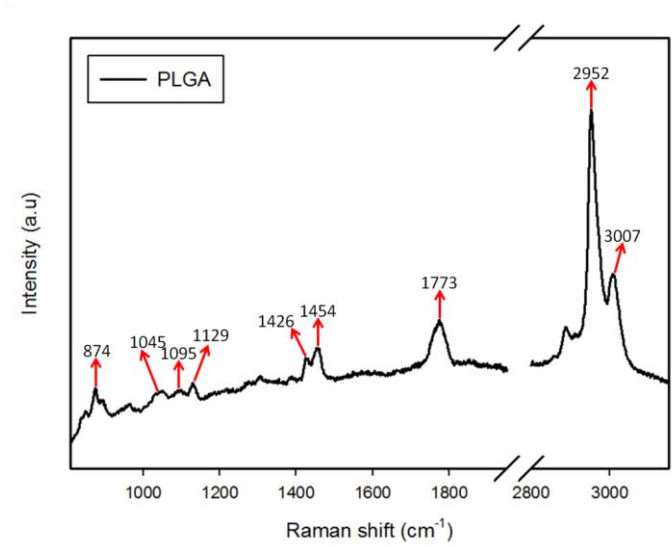
getirilmiştir. Şekillendirilen numuneler, etüvde 24 saat bekletildikten sonra 600°C’de bağlayıcı uzaklaştırma işlemine tabi tutulmuştur.

Numunelerin ısıt işlemleri 900-1000-1100-1200°C’de olmak üzere dört ayrı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Numunelerin boyut küçülmeleri hesaplanmış, yoğunlukları Archimedes prensibine göre ölçülmüş ve görünür poroziteleri hesaplanmıştır. Numunelerin görüntü analizleri SEM cihazında gerçekleştirilmiştir. XRD analizleri numuneler öğütüldükten sonra Rigaku Rint 2000 x- ışınları difraktometresinde 2°/dk hız ile 10-70° 2θ açıları arasında CuKα x-ışını ile gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin karakterizasyonu sonrasında elde edilen porozite miktarlarına ve yoğunluk değerlerine göre en uygun reçete ve ısıt işlem sıcaklıkları belirlenmiştir.

3.2.6. Bor Nitrür ve Hidroksiapatit Emdirilmiş Scaffold Malzeme Karakterizasyonu

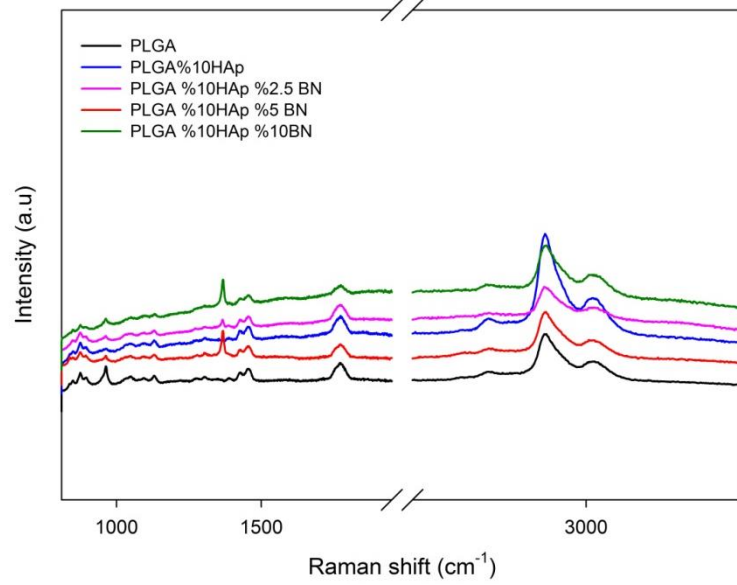
Kompozit malzemeler yapısal ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Yapısal karakterizasyonda Raman Spektroskopisi tekniği kullanılırken, morfolojik incelemede ise SEM tekniğinden yararlanılmıştır.



Şekil 3.3. PLGA örneğine ait Raman spektrumu

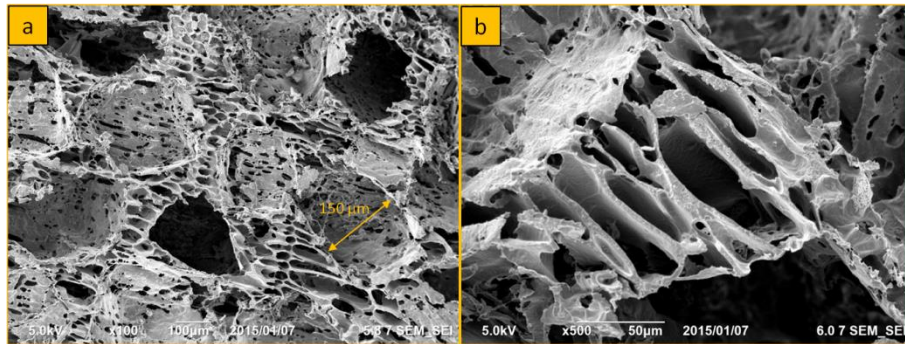
Şekil 3.3’de katkısız PLGA numunesine ait Raman spektrumu görülmektedir. Spektrumda görülen pikler glikolik asit, laktik asit ve ester grubuna aittir¹³⁶⁻¹³⁹. Şekil

3.4’de %10 HAp ve farklı oranlarda BN içeren PLGA örneklerine ait Raman spektrumları görülmektedir. Spektrumlarda PLGA karakteristik piklerine ilaveten HAp (960 cm^{-1})^{131,132} ve BN (1370 cm^{-1}) karakteristik pikleri¹⁴¹⁻¹⁴³ tespit edilmiştir.



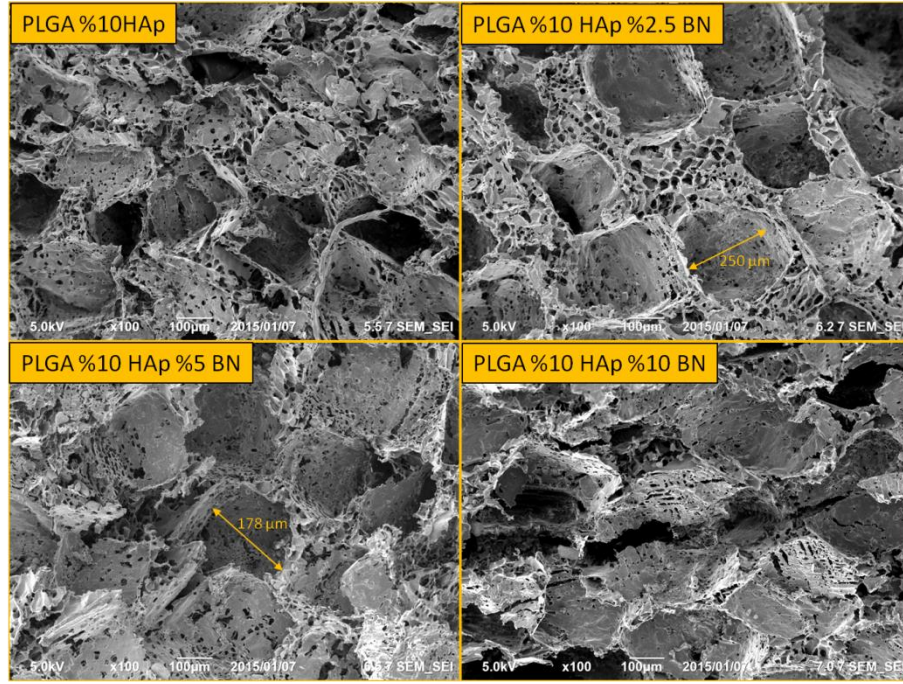
Şekil 3.4. %10 HAp ve farklı oranlarda BN içeren PLGA örneklerine ait Raman spektrumları

Şekil 3.5’deki katkısız PLGA iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntülerinden de anlaşılacağı üzere üç boyutlu ve homojen mikroporozite mevcuttur. Por çapları yaklaşık olarak büyük porlarda 100 µm, küçük porlarda ise 30 µm aralığında değişmektedir. Malzeme yüzeyi düz olmayıp pürüzlüdür.

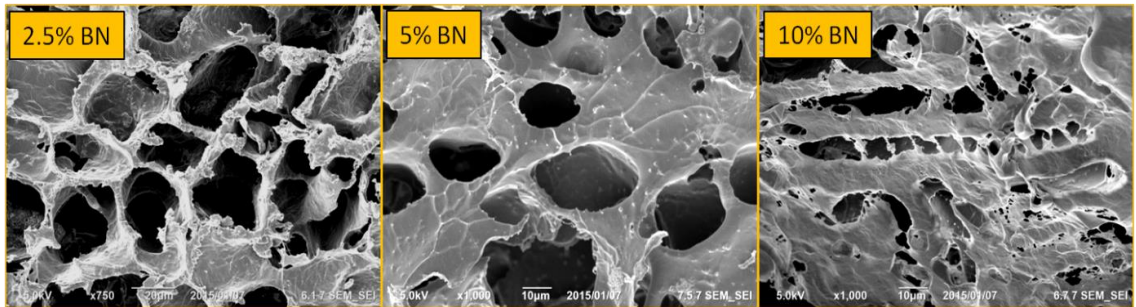


Şekil 3.5. Katkısız PLGA örneğine ait ikincil elektron (SEM) görüntüsü

Şekil 3.6’te %10 HAp ve farklı oranlarda BN içeren PLGA iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntüleri verilmektedir. Burada yine katksız örnekte olduğu gibi üç boyutlu fakat daha heterojen mikroporozite mevcuttur. Kompozit içerisinde BN miktarının artmasıyla yapıda oldukça belirgin farklılıklar meydana gelmiştir. Burada odacıklı yapının bozulduğu daha heterojen üç boyutlu porozite mevcuttur.



Şekil 3.6. %10 HAp ve farklı oranlarda BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SEM) görüntüleri



Şekil 3.7. Farklı oranlarda BN içeren %10 HAp-PLGA örneklerine ait ikincil elektron (SEM) görüntüleri

Şekil 3.7’te %10 HAp içeren PLGA örneğine farklı oranlarda BN ilavesinin morfolojiye olan etkisi mukayeseli olarak görülmektedir. Aynı büyütmeye alınan görüntülerde BN miktarının artmasıyla üç boyutlu yapının gözenekli laminar tabakalar şeklinde oluştuğu ve bu tabakalarda por çeper kalınlığının oldukça ince (yaklaşık 200 nm) olduğu görülmektedir. Malzeme yüzeyindeki dalgalanma da kompozit içerisinde BN miktarının artmasıyla azalmaktadır.

3.2.7. Kalvarial Defekt Modeli

Çalışmada, 9 deney grubu ve bir sağlıklı grup oluşturuldu. Her bir grupta 20 adet olmak üzere toplam 200 adet sıçan kullanıldı. Deney planı, Tablo 3.5.’de verilmiştir. Hayvanlar aşağıdaki gruplarda belirtilen deney protokollerine alındı: anestezi içi 10 mg/kg ksilazin ve 80mg/kg ketamin karışımı intraperitoneal olarak uygulandı. Preoperatif analjezi için Metamizol sodyum 30 mg/kg dozunda İM uygulandıktan sonra Ratların anestezi altında kafalarının parietal bölgesi tıraşlanarak batikon ile temizlendi. Daha sonra bistüri yardımı ile parietal kemiğe ulaşıldı. Parietal kemiğin merkezinden **8 mm çapında trepan frez** yardımı ile osteoektomi yapıldı(Şekil 3.8). İşlem sırasında cerrahi bölge izotonik ile sürekli olarak yıkandı. Sağlıklı gruba herhangi bir işlem uygulanmadı. Defekt kontrol grubunda defekt oluşturulup herhangi bir implant yerleştirilmedi. Diğer gruplara ise Tablo 3.4’deki PLGA/HA/BN karışımı içeren scaffoldlar yerleştirildi. Daha sonra implantlar yerleştirilerek sütür atıldı. Post-Op analjezi ve enfeksiyonu önlemek için; **Metamizol sodyum 30 mg/kg/gün ve Sefazolin 20 mg/kg/gün dozunda 3 gün** boyunca İ.M. uygulandı. Ratlar **2 ay** boyunca iyileşmeye bırakıldı. Deney süresince ratların 2., 4. ve 8. haftalarda kalvarial bölgelerinden BT görüntüleri alındı. Tüm gruplardaki ratların yarısı her grup için 10 rat 4. haftada; ve geriye kalan ratlar ise 8 haftada yüksek doz tiopental (50 mg/kg) ile ötanazi uygulanarak deney sonlandırıldı. Tüm gruplardaki hayvanların kalvarial kemikleri implant ile beraber dikkatlice çıkarıldı ve kan

örnekleri alındı. Alınan örneklerin bir kısmı moleküler analiz için ayrıldı ve -80°C de saklandı (herbir grup için n=5). Histolojik çalışma için % 10'luk nötral formaldehit çözeltisine konularak tespit edildi (herbir grup için n=5). Toplanan kanlar santrifüj edilerek serumları elde edildi ve serumlar -80°C dondurucuda muhafaza edildi.

Tablo 3.5. Deney Planı

Gruplar	Hayvan sayısı	Tedavi	Doz	Sakrifikasyon	
				Periyodları	
				4.Hafta	8.Hafta
I	20	Sağlıklı	-	10	10
II	20	Defekt kontrol	-	10	10
III	20	PLGA	-	10	10
IV	20	PLGA/HA	%10 HA	10	10
V	20	PLGA/HA/ <u>BN</u>	%10 HA+%2,5 BN	10	10
VI	20	PLGA/HA/ <u>BN</u>	%10 HA+%5 BN	10	10
VII	20	PLGA/HA/ <u>BN</u>	%10 HA+%10 BN	10	10
VIII	20	PLGA/ <u>BN</u>	%2,5 BN	10	10
IX	20	PLGA/ <u>BN</u>	%5 BN	10	10
X	20	PLGA/ <u>BN</u>	%10 BN	10	10



Şekil 3.8. Deneyin Yapılışı

3.2.8. Radyolojik Çalışmalar

3.2.8.1. BT (Bilgisayarlı Tomografi) Analizi

Tüm sıçanların kalvaria bölgeleri 2., 4. ve 8. Haftalarda 50 mg/kg ksilazin ve 70mg/kg ketamine anestezisi altında 256-kesitli helikal BT analizi yapıldı (SOMATOM Definition Flash CT, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany). Kalvarialarda hem defekt hemde defekt olmayan bölgelerden Region Of Interest (ROI) ölçümleri Hounsfield Unit (HU) olarak belirlendi. ROI ölçüm alanı 0.469- 0.760 mm² olarak kullanıldı. Defekt olmayan alan, defektli alana bölünmesi ile normalleştirilmesi gerçekleştirildi. Defekt çapları milimetrik olarak ölçüldü. Buna ek olarak, 3-D (VRT volumetric rendering techniques) görüntüler rekonstrüksiyon tekniği kullanılarak resimlendirildi.

3.2.9.Moleküler Analizler

3.2.9.1.Real Time-PCR Analizi

Çalışmamızda TNF- α , BMP-2, OPN, ALP ve RUNX2 mRNA ekspresyon düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

Sıçan kalvaria dokusundan RNA ekstraksiyonu:

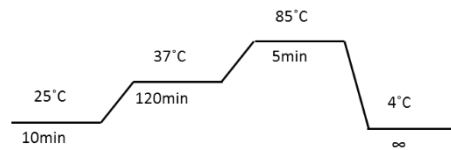
Kalvaria örnekleri tek tek tartılarak RNAlater RNA Stabilization Reagent ile (Qiagen) 4 haftaya kadar +4 C° de muhafaza edildi. Dokular Tissue Lyser II (Qiagen) homojenize edilip QIAcube de RNA ekstraksiyonu yapıldı. Doku örnekleri tek tek tartılarak RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak Qiacube RNA izolasyon cihazında (Qiagen) total RNA izolasyonu aşamaları üreticinin tavsiye ettiği şekilde sürdürüldü. Total mRNA miktarı nano drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile 260nm’de ölçüldü.

Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi:

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enzimi kullanımı ile total RNA’dan cDNA sentezi yapıldı. Her reaksiyon 10µl RNA ile gerçekleştirilerek cDNA sentezi aşağıdaki sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem) ile sağlandı. cDNA miktarı nano drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüm belirlendi ve -20°C’de saklandı.

cDNA sentez reaksiyonu:

total RNA	10 µl
10 X RT Buffer	2 µl
25 X dNTPs mix	0.8 µl
10 X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
DEPC-H2O	4.2 µl



Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

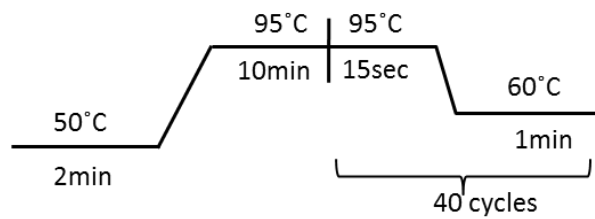
Taq Man Gene Expression Master Mix kiti kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) cihazında yapıldı. 100ng cDNA için tablo halinde aşağıda verilen TaqMan® Gene Expression Assays'ler yie aşağıda gösterildiği gibi pipetlendi ve 40 siklus ile yürütüldü. Ct değerleri cihazda otomatik olarak delta delta Ct'ye çevrilecek ve çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak IBM SPSS 20.00 paket programında değerlendirildi.

Gen	In vivo
TNF- α :	Primer Design rat
OPN:	Primer Design rat
BMP-2:	Primer Design rat
ALP:	Primer Design rat
RUNX2:	Primer Design rat
B-actin:	Primer Design rat

Pipetleme:

cDNA (100ng)	X μ l
TaqMan Master Mix	10 μ l
Assay	1 μ l

RNase free H₂O ile 20 μ l'e tamamlandı.



3.2.10. Histopatolojik Analizler

3.2.10.1. Rutin Histolojik ve Hematoksilen Eozin Prosedürü

Fiksatif içinde bulunan sert doku örnekleri %10'luk nitrik asit içerisine atıldı. Her gün solüsyon değiştirilerek, iğne yardımıyla doku yumuşaması takip edildi. 1 günlük süre boyunca dokularda dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra bir gece boyunca yıkamaya alınan dokulara devamında artan alkol serilerinde dehidratasyon, ksilende şeffaflaştırma ve parafinde infiltrasyon işlemleri yapılarak bloklar haline getirildi.

3.2.10.2. Leica TP 1050 Cihazı Takip Basamakları

%10' luk tamponlanmış formalin (1 saat 15 dakika), %70' lik alkol (1 saat), %80'lik alkol (1 saat), %90'lık alkol (1 saat), saf alkol (1 saat), saf alkol (1 saat), saf alkol (1 saat 15 dakika), ksilol (1 saat), ksilol (1 saat), ksilol (1 saat 15 dakika), parafin (1 saat), parafin (1 saat), parafin (1 saat 15 dakika) şeklindedir.

Cihaz, formalin, alkol, ksilen basamaklarında 40°C, parafin basamağında 65°C'de çalışmaktadır. Takip sonrası elde edilen dokular, Leica EG1160 bloklama cihazında 67°C sıcaklıkta eriyik parafin ile bloklandı. Bloklanan dokular -4°C'de soğutuldu. Leica RM 2145 mikrotom cihazı ile her bir bloktan 5'er mikron kalınlığında 2'şer kesit su banyosuna alındı. Bu 2 kesitin 1 tanesi HE için normal lama alındı. Rutin histopatolojik inceleme için lam üzerine alınan kesitler, 30 dakika, 70°C sıcaklıkta, EN 055 Etüvde deparafinize edildikten sonra; 10 dakika ksilolde bekletildi.

Leica Autostainer XL otomatik boyama ve kapama cihazında HE boyaması otomatik prosedür ile yapıldı. Prosedür; ksilol (2 basamak) - absölü etil alkol (3 basamak) basamakları ardından yıkama safhasını takip ederek hematoksilen ile 5 dakika yıkama ve ardından asit alkole daldırıp çıkarma, tekrar yıkama, amonyak yıkama basamakları ardından eozin ve yıkama solüsyonuna daldırılıp çıkarma işlemi ve absölü etil alkol (3 basamak), ksilol (2 basamak) şeklindedir.

Otomatik boyama ve kapama cihazında son basamak entellan damlatılarak kapatılması olup preparatlar incelemeye hazır hale getirildi.

3.2.11. İstatiksel Analizler

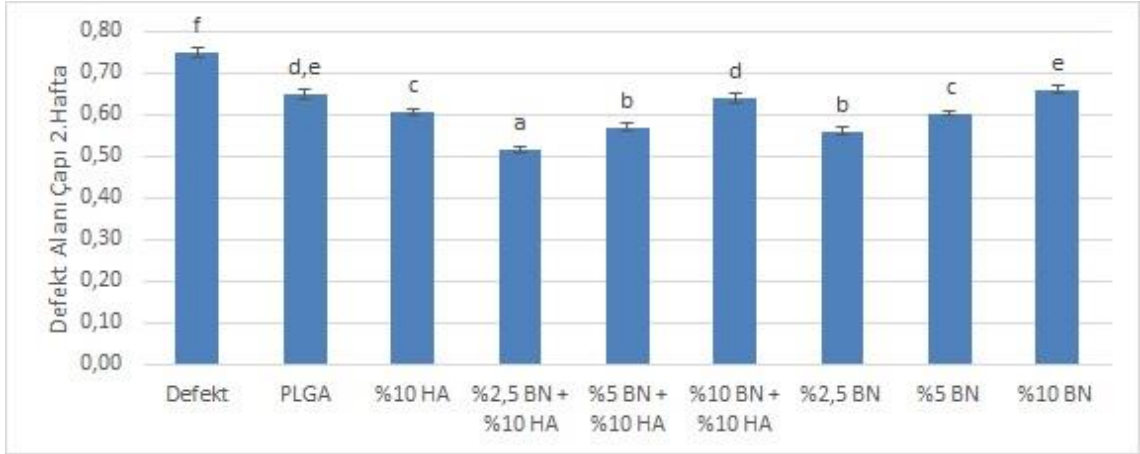
Çalışmamızın verilerini IBM 20.00 SPSS paket programı ile istatiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılık için One Way Anova çoklu karşılaştırma testinden Duncan testine göre yapıldı. $P < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

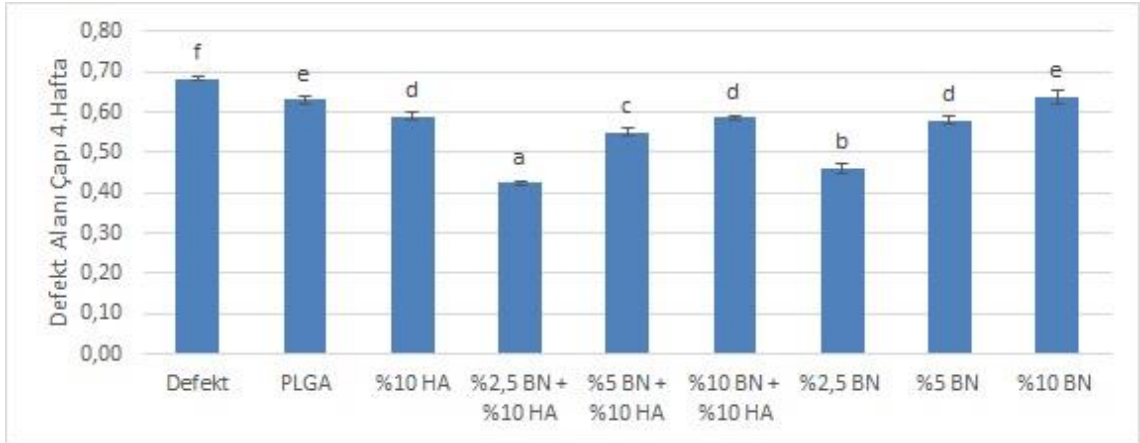
4.1. BT (Bilgisayarlı Tomografi) Bulguları

Deney hayvanları defekt operasyonundan sonraki 2. 4. ve 8. haftalarda her gruptan 5 rat olacak şekilde kalvrial defekt BT görüntüleri Radyoloji Anabilim Dalı'nda görüntülendi ve değerlendirildi.

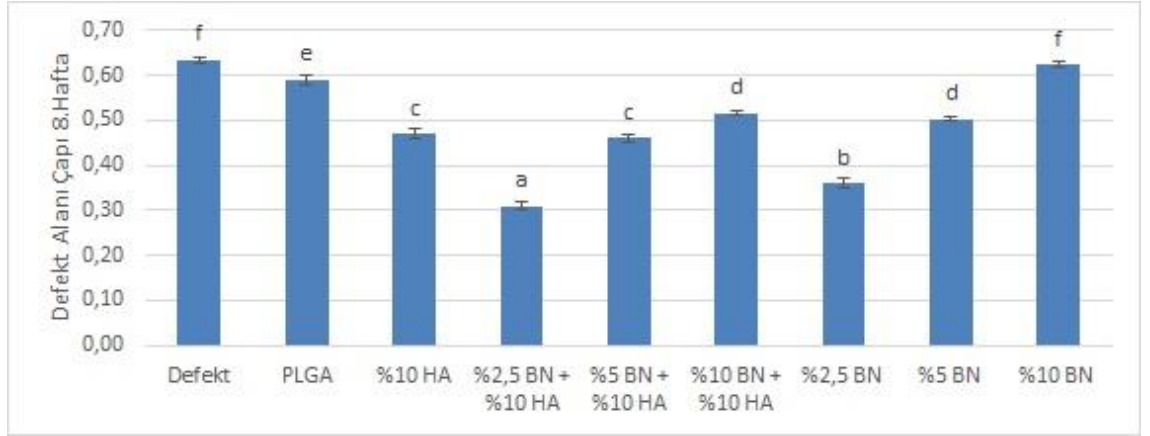
Defekt Çaplarının BT analiz Bulguları



Şekil 4.1. Grupların 2. Hafta BT defekt çap ölçümleri ($p<0.05$ oranında anlamlı kabul edildi).



Şekil 4.2. Grupların 4. Hafta BT defekt çap ölçümleri ($p<0.05$ oranında anlamlı kabul edildi).

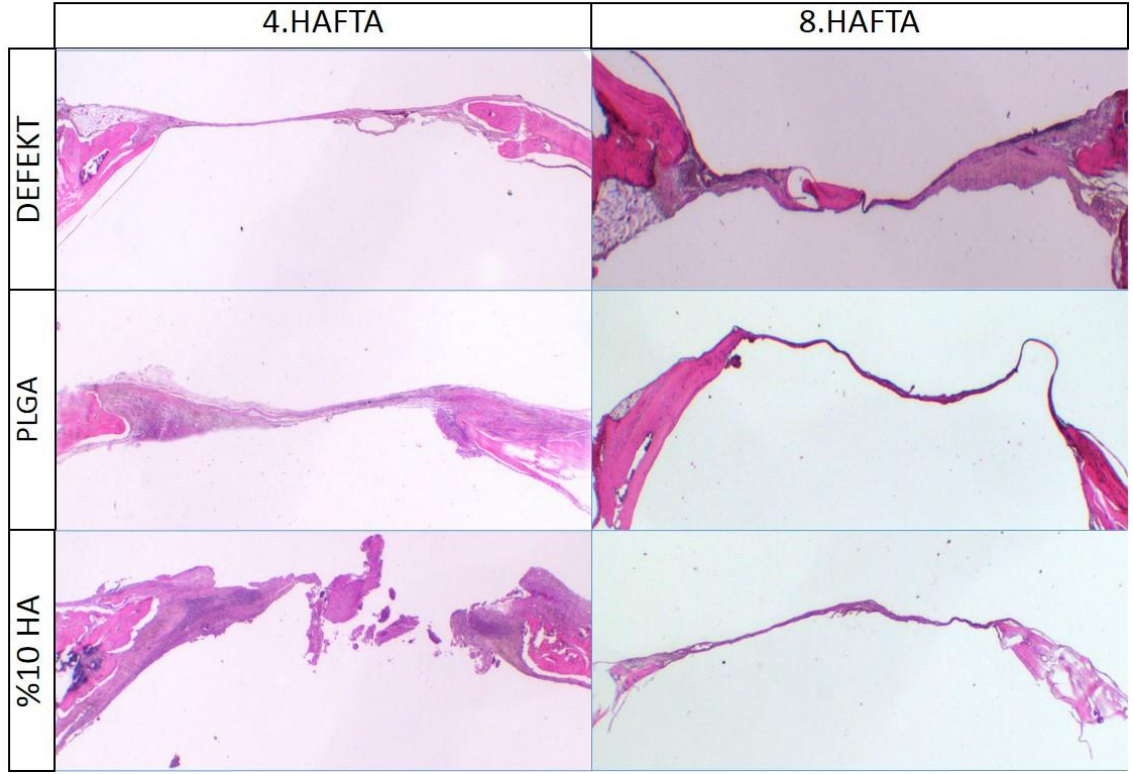


Şekil 4.3. Grupların 8. Hafta BT defekt çap ölçümleri ($p < 0.05$ oranında anlamlı kabul edildi).

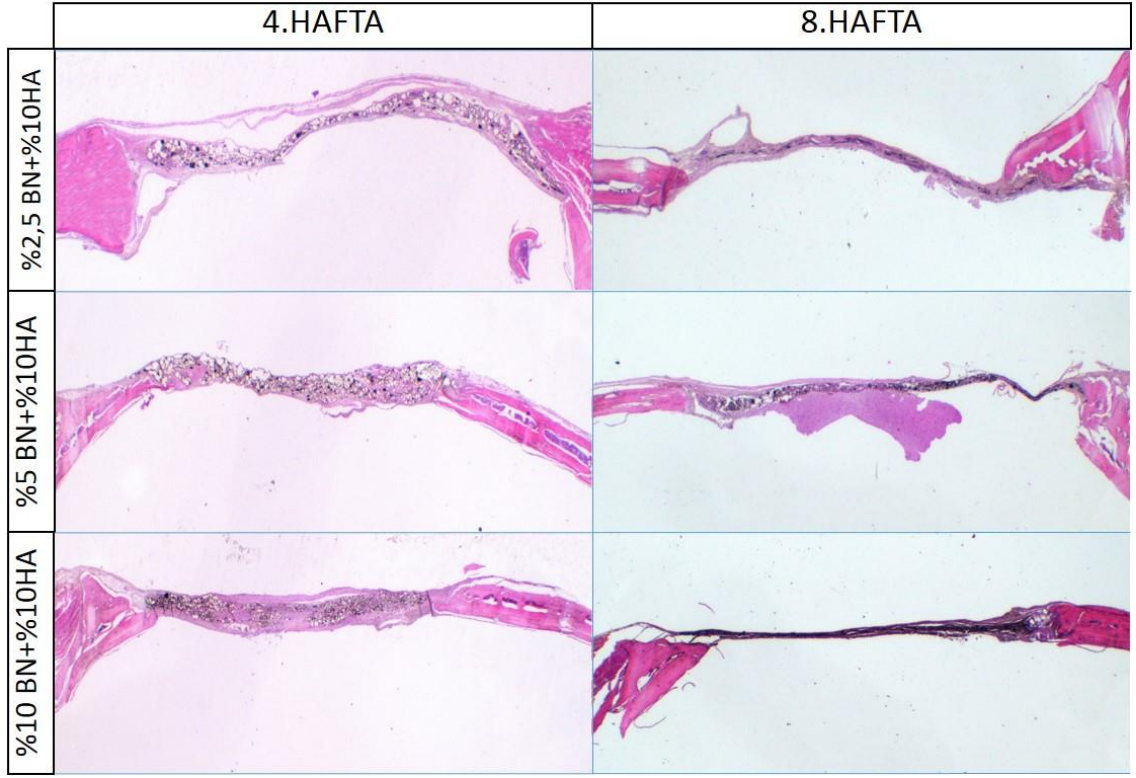
Defekt alanındaki kemik rejenerasyonunu değerlendirmek için defekt alanının çapı BT yardımı ile ölçüldü (Şekil 4.1-3). İyileşme sürecinin izlendiği defekt cerrahi presedürü uygulamasından sonraki 2., 4. ve 8. haftalarda defekt çap oranlarına göre karşılaştırdığımızda kontrol defekt grubuna göre ölçtüğümüz haftalarda %2.5 BN+ %10 HA, % 2.5 BN, % 5 BN+%10 HA ve %10 HA gruplarında sırası ile anlamlı olarak defekt çaplarında küçülme gözlenmiştir ($p < 0.05$). Çalışmamızda çap oranları ile kıyasladığımızda en iyi primer kemik oluşumu %2.5 BN+ %10 HA ve % 2.5 BN gruplarında gözlenmiştir.

4.2. Histopatolojik Bulgular

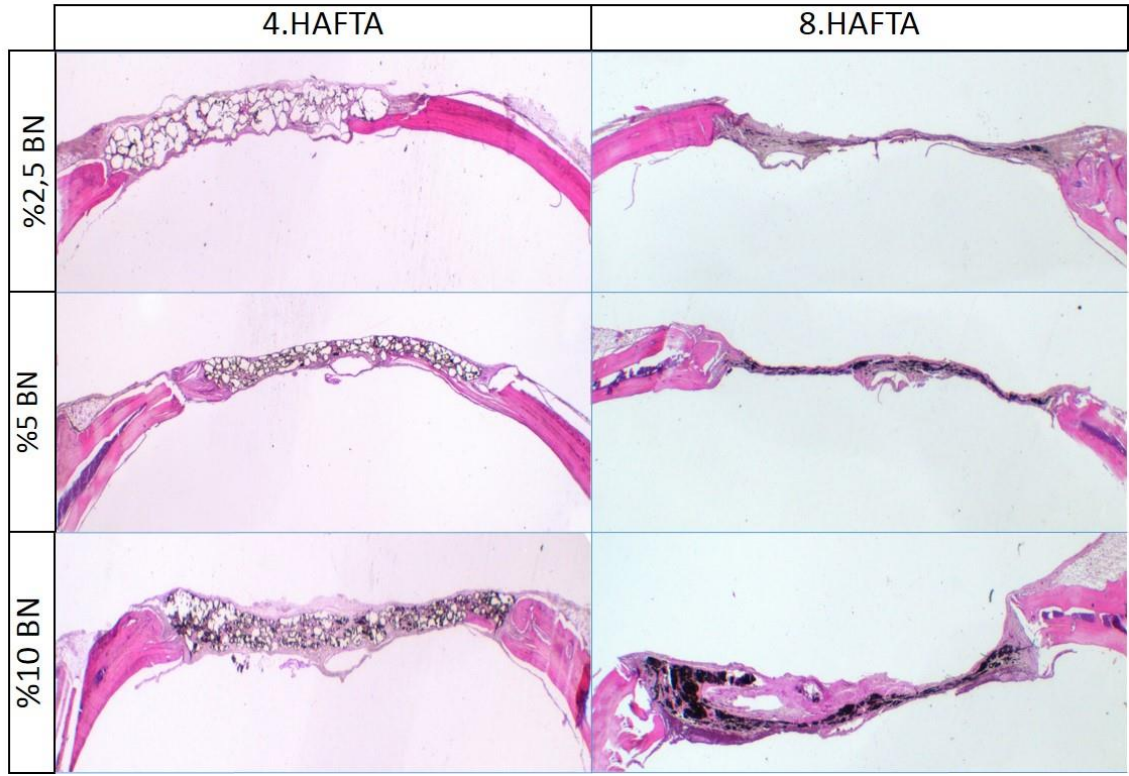
Bu çalışmada BN/HA karışımlarının farklı yüzde oranlarıyla emdirilmiş PLGA doku iskelesinin kritik kalvarial kemik defekti üzerine olan etkilerini histopatolojik olarak incelendi.



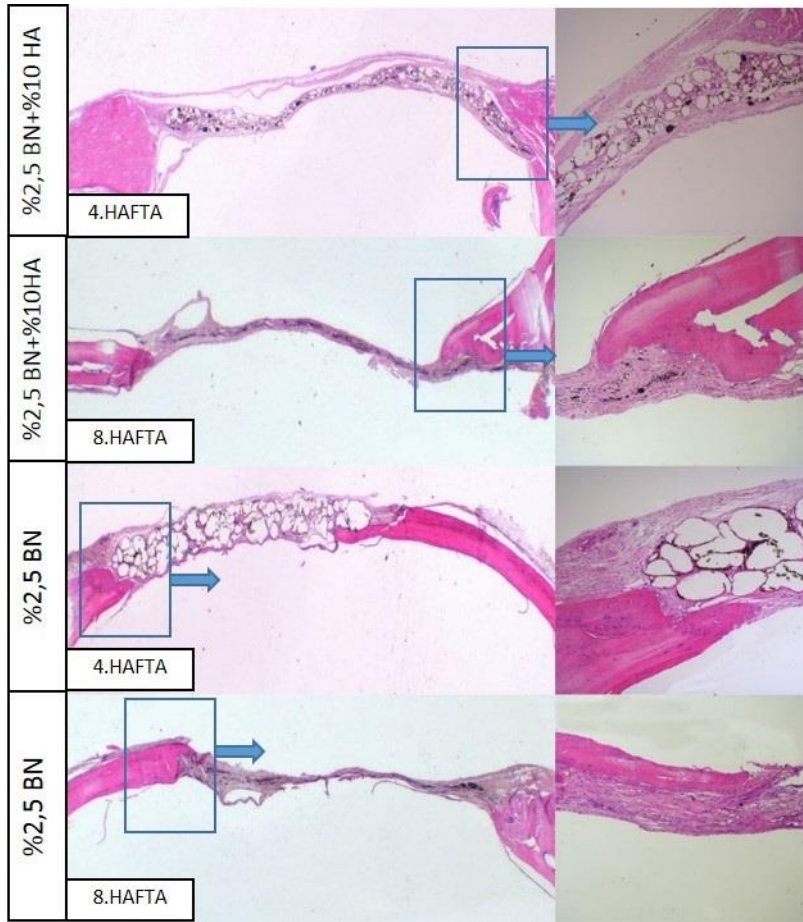
Şekil 4.4. Defekt, PLGA, %10HA grubunun 4. ve 8. hafta kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama.



Şekil 4.5. %2,5BN+HA, %5BN+HA, %10BN+HA grubunun 4. ve 8. hafta kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama.

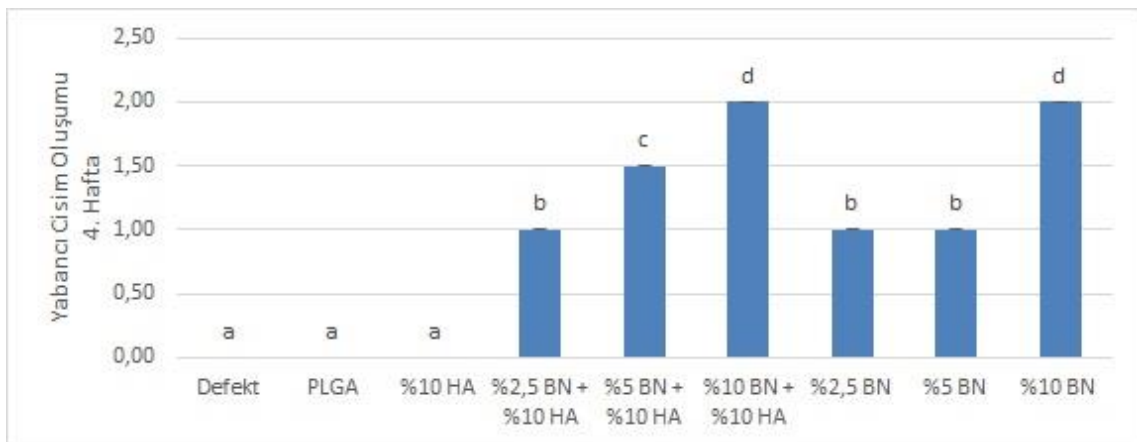


Şekil 4.6. %2,5BN, %5BN, %10BN grubunun 4. ve 8. hafta kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama.

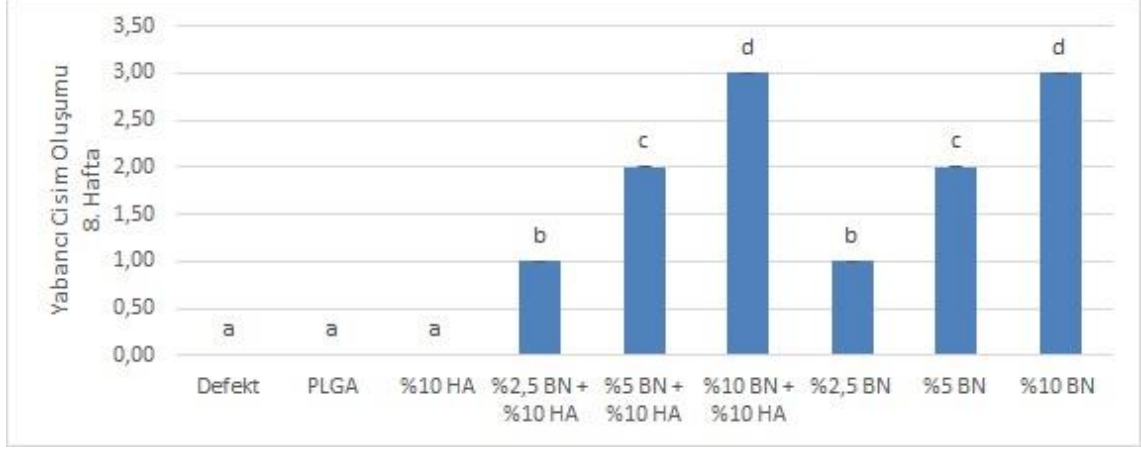


Şekil 4.7. %2,5BN+%10HA ve %2,5BN grubunun 4. ve 8. hafta yakınlaştırılmış kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama.

Hematoxylin ve Eosin (H&E), boyama yapılan gruplar arasında 4. ve 8. haftalarda fibrozis, yabancı cisim ve primer kemik oluşumu histopatolojik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4-7). Tüm bu parametreler modifiye edilen O'Driscoll ve arkadaşlarının skorlama yöntemine göre skorlanmış ve istatistiği yapılmıştır.¹²⁷

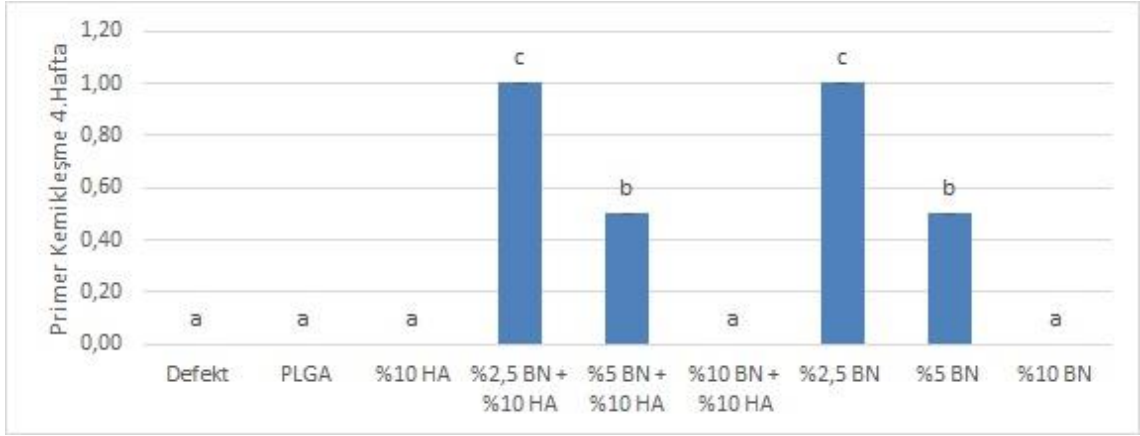


Şekil 4.8. Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta Yabancı Cisim Bulguları

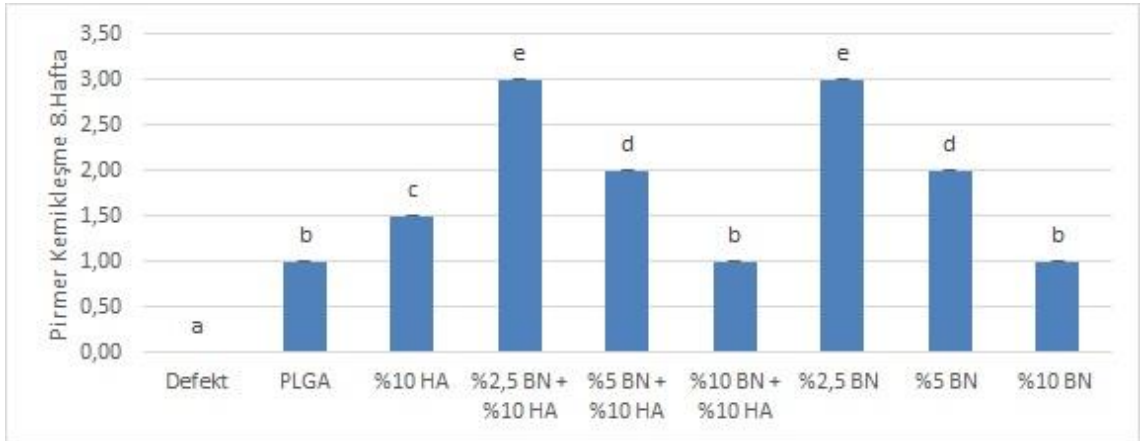


Şekil 4.9. Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta yabancı cisim bulguları

Yabancı cisim parametresini incelediğimiz zaman 4. Haftada çok az bir yabancı cisim reaksiyonunun görüldüğü ve %2,5 BN+%10 HA, %5 BN+%10 HA, %10 BN+%10 HA ve yalnız BN içeren gruplarda doza bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.8) ($P<0.05$). 8. hafta rat kalvarial defekt alanları yabancı cisim parametresi üzerinden değerlendirildiğinde ise %2,5 BN+%10 HA ve %2,5 BN gruplarında diğer gruplara göre yabancı cisim reaksiyonlarının oldukça az olduğu görülmektedir (Şekil 4.9). %5 BN+%10 HA ve %5BN gruplarında ise %2,5 BN gruplarından daha fazla yalnız %10 BN gruplarından ise daha az bir yabancı cisim reaksiyonunun olduğu görülmektedir. 8.haftada %10BN gruplarında yabancı cisim reaksiyonu 4.hafta ile benzer bir şekilde çok yüksek bulunmuştur. ($P<0.05$).



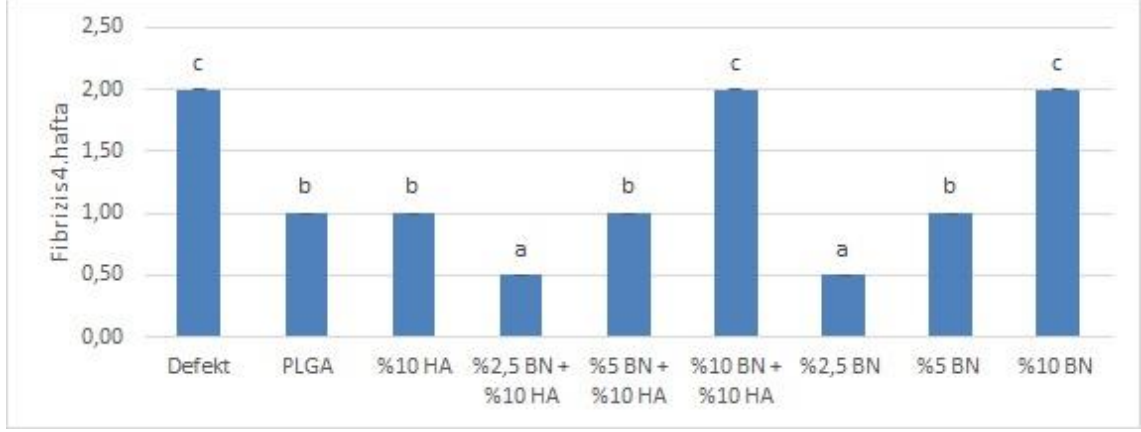
Şekil 4.10. Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta primer kemik oluşum bulguları



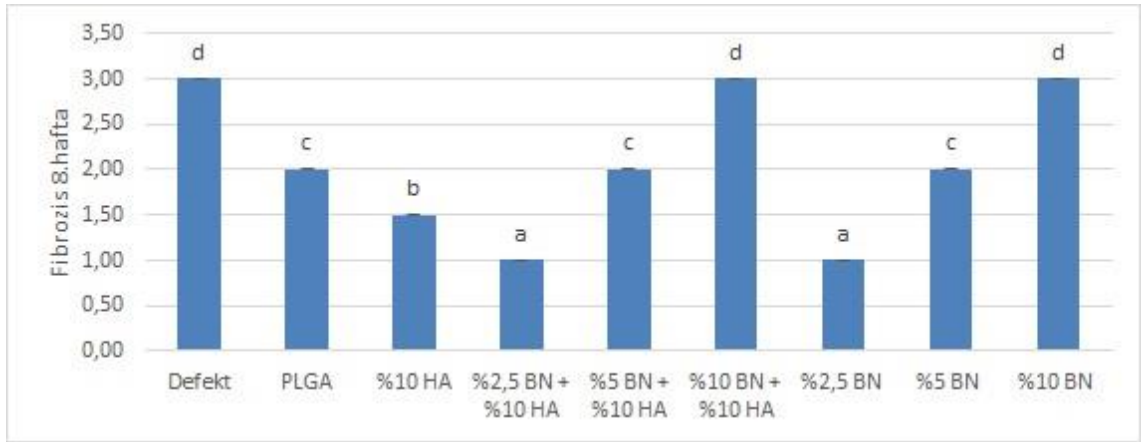
Şekil 4.11. Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta primer kemik oluşum bulguları

Histopatolojik bulgularımızda 4. haftada primer kemik oluşumunu incelediğimizde ise %2,5BN +%10HA, %2,5BN daha fazla olmakla beraber, %5BN %10HA ve %5BN gruplarında primer kemik oluşumu hafif derecede başlamış ancak diğer gruplarda histopatolojik kesitlerimizde primer kemik oluşumuna rastlanmamıştır (Şekil 4.10). 8. Hafta sonunda ise primer kemik oluşumu açısından histopatolojik bulgularda defekt grubu hariç tüm gruplarda primer kemik oluşumu görülmektedir. Yalnız %2,5BN %10HA ve %2,5BN gruplarında diğer gruplardan çok daha anlamlı primer

kemik oluşumu görülmüştür (Şekil 4.11) ($P<0.05$). %2,5 BN gruplarından farklı olarak %5 BN gruplarında da primer kemik oluşumu artmıştır.



Şekil 4.12. Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta fibrozis bulguları



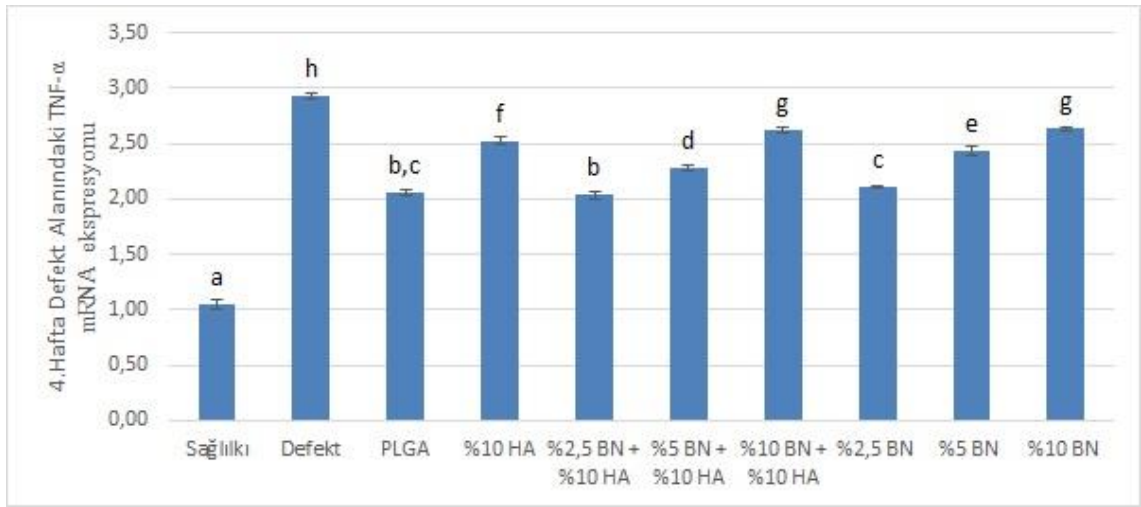
Şekil 4.13. Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta fibrozis bulguları

Histopatolojik çalışmamızın son parametresi olan fibrozis kemik iyileşmesinde son derece önemlidir (Şekil 4.12-13). 4. haftada tüm gruplarda fibrozis görülürken %2,5BN + %10HA ve %2,5BN gruplarında defekt ve diğer gruplara göre minimal düzeyde fibrozis olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). 8. haftaya baktığımızda ise

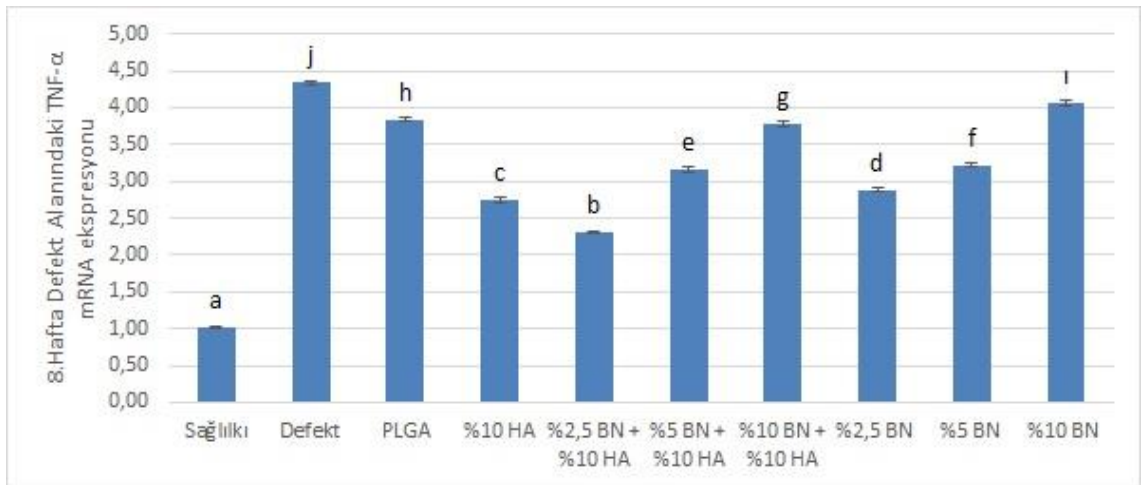
%2,5BN+%10HA ve %2.5BN gruplarında fibrozis defekt ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür ($P<0.05$). Yalnız %10BN gruplarında fibrozis oldukça yüksek görülmektedir.

4.3. Moleküler Bulgular

Çalışmamızın ilk moleküler bulgularından biri olan TNF- α rat kalvarial defekt alanında 4. ve 8. haftalarda RT-PCR analizi ile gen ekspresyon düzeyinde incelenmiştir (Şekil 4.14-15).



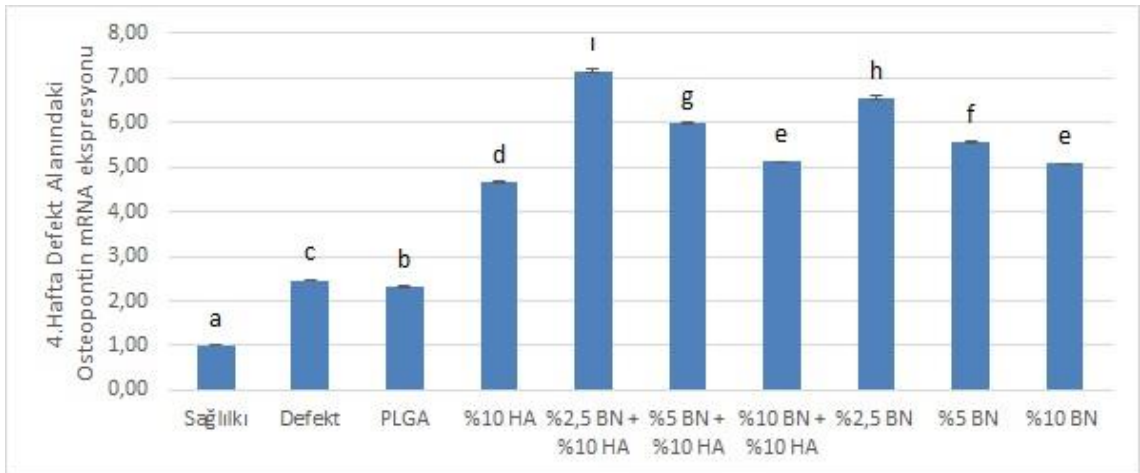
Şekil 4.14. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta TNF- α mRNA ekspresyonları



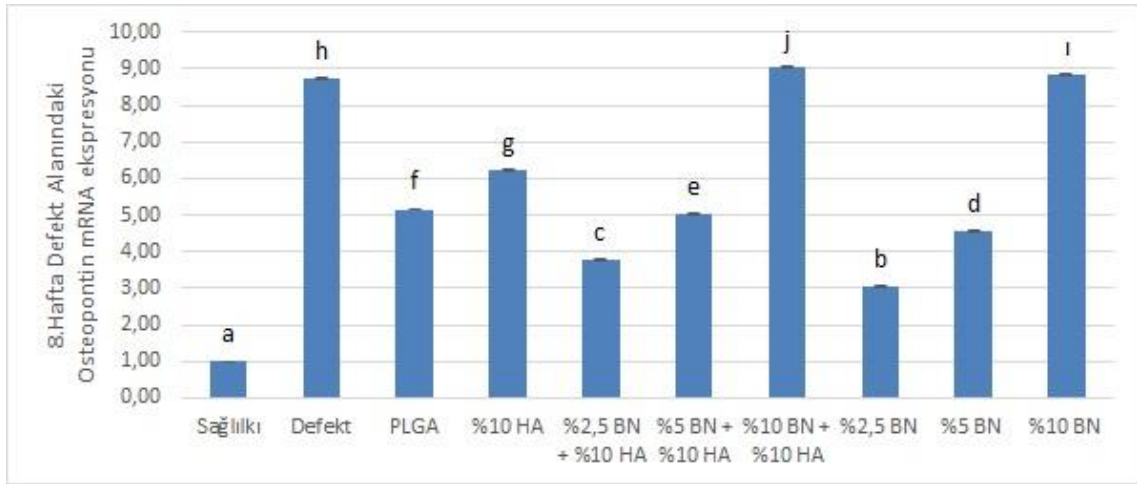
Şekil 4.15. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta TNF- α mRNA ekspresyonları

Deney gruplarımızın 4. hafta TNF- α ekspresyonlarını incelediğimizde sağlıklı gruba göre diğer tüm gruplarda TNF- α ekspresyonunun istatistiksel olarak arttığı gözlenmiştir. En düşük TNF- α düzeyleri PLGA, %2,5BN+%10HA ve %2,5BN gruplarında gözlenirken diğer gruplarda daha fazla bir TNF- α ekspresyonu gözlenmektedir($P<0.01$).

Kemik iyileşmesini takip ettiğimiz 8. haftada ise TNF- α mRNA ekspresyonları açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir($P<0.05$). Defekt grubuna göre %2.5BN %10HA, %10HA ve %2.5BN gruplarındaki TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur($P<0.001$). %10BN+%10HA ve %10BN gruplarında ise TNF- α seviyeleri tedavi gruplarına göre en yüksek olarak tespit edilmiştir.

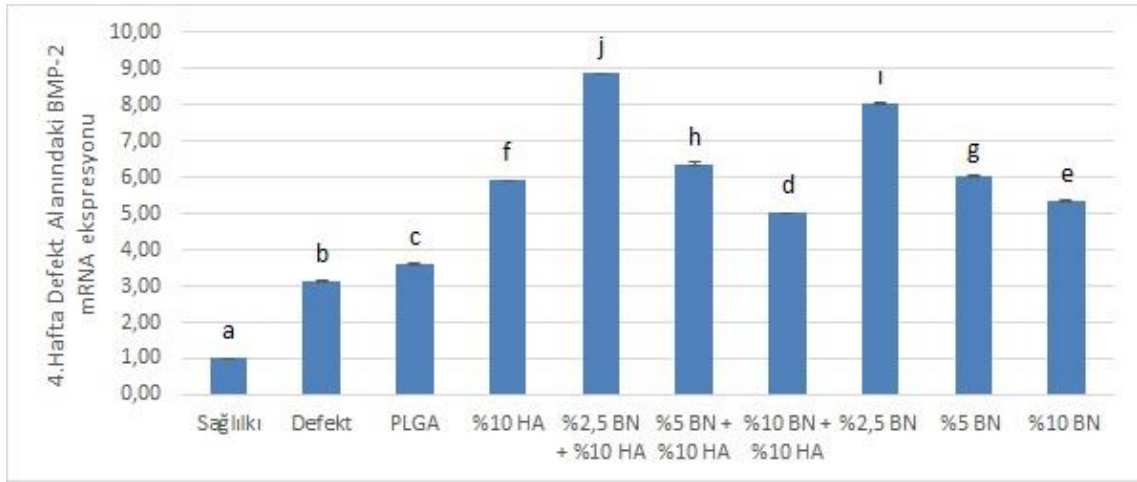


Şekil 4.16. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta Osteopontin mRNA ekspresyonları ($p<0.05$).

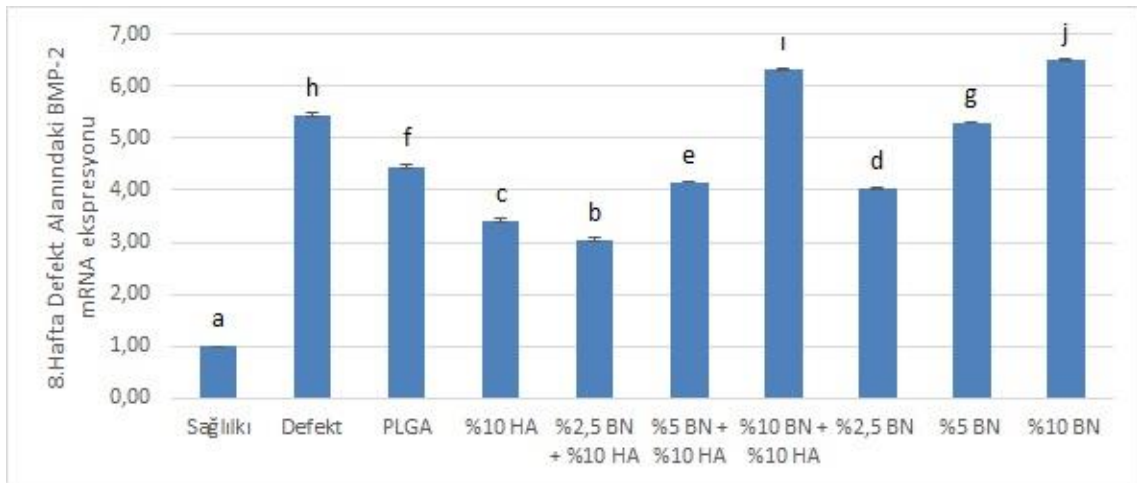


Şekil 4.17. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta Osteopontin mRNA ekspresyonları. ($p < 0.05$)

Çalışmamızın ikinci moleküler bulgusu olan Osteopontin mRNA ekspresyonları değerlerini incelediğimizde ise kemik defekti oluşturduğumuzdan sonraki 4. haftada sağlıklı gruba göre tüm gruplarda OPN mRNA ekspresyon değerlerinin yükseldiği görülmektedir (Şekil 4.16-17). Gruplar arasındaki istatistiksel olarak en fazla artışın sırası ile %2,5BN+%10HA ve %2,5BN grubunda olduğu görülmektedir. Ancak 8. haftada osteopontin seviyelerinin %2,5BN+%10HA ve %2,5BN gruplarında diğer gruplara göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Yalnız defekt, %10BN %10HA ve %10BN gruplarında OPN seviyeleri 4.haftaya göre yüksek kalmıştır. %2,5BN gruplarında OPN seviyesinin 8.haftada azalması bize osteopontinin kemiğin yeniden şekillendirilmesinde görevinin bittiğini, osteoklastik aktivitenin azaldığını ve kemik maturitesinin tamamlanmak üzere olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.18. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta BMP-2 mRNA ekspresyonları ($p<0.05$).

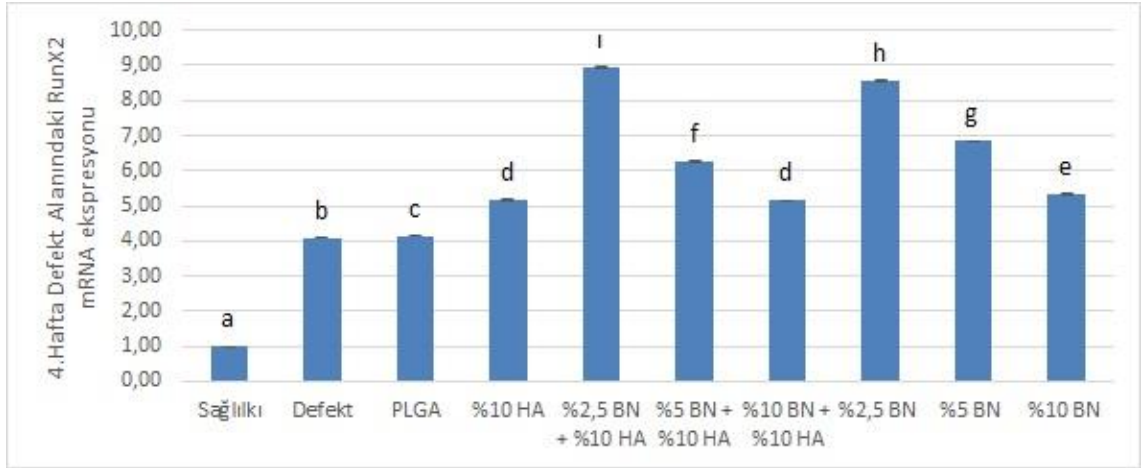


Şekil 4.19. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta BMP-2 mRNA ekspresyonları ($p<0.05$).

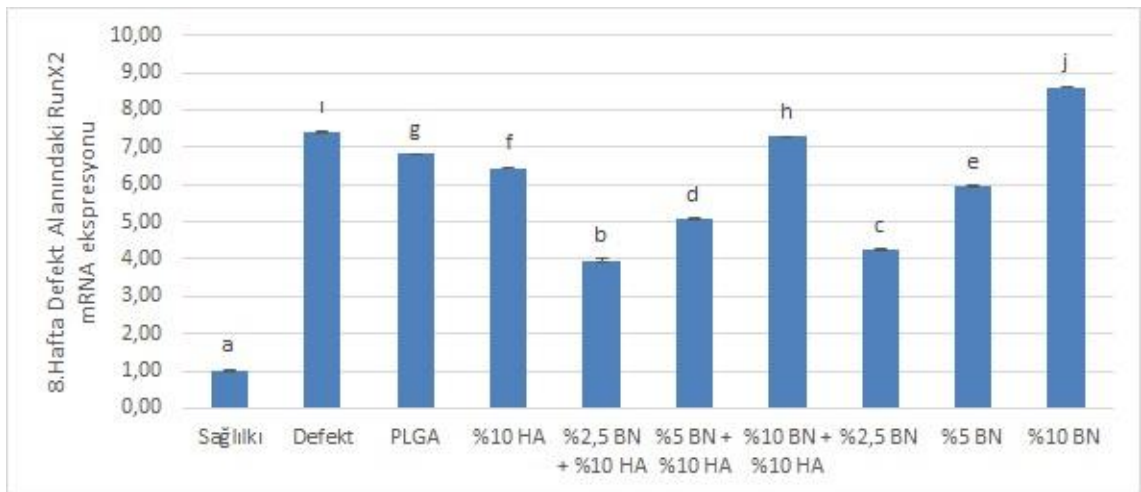
Kemik defekt iyileşme süreçlerini takip ettiğimiz kemik moleküler belirteçlerinden biride BMP-2 dir (Şekil 4.18-19).

4. hafta bulgularımıza baktığımızda sağlıklı gruba göre tüm gruplarda BMP-2 mRNA ekspresyonlarının arttığı gözlenmekle beraber; %2,5 BN+%10 HA, %2,5 BN ve %5 BN %10 HA gruplarındaki artışın diğer gruplara göre çok daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Son hafta olan iyileşmeyi takip ettiğimiz 8. haftada ise Defekt, PLGA ve %10 BN içeren gruplarda BMP-2 miktarlarındaki artış diğer tedavi gruplarına göre çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Defekt grubuna göre BMP-2 mRNA ekspresyon miktarlarının % 2.5BN %10HA, %2.5BN, % 5BN %10HA ve % 5 BN ($p<0.05$) gruplarında anlamlı derecede azalmış olduğu görülmüştür.



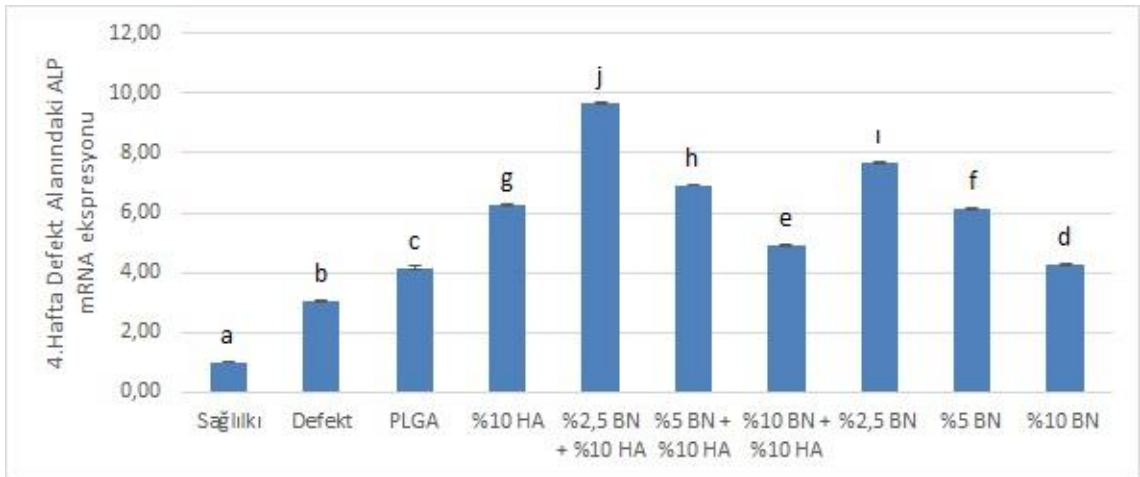
Şekil 4.20. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta Runx-2 mRNA ekspresyonları ($p<0.05$).



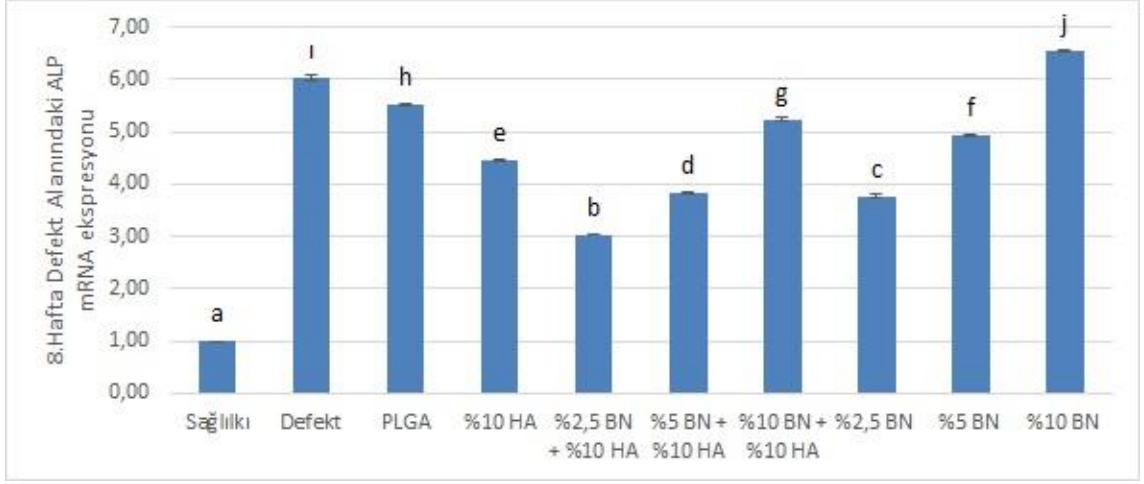
Şekil 4.21. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta Runx-2 mRNA ekspresyonları ($p<0.05$).

Çalışmamızda bir diğer kemik biyobelirteçlerinden biri olan Runx2'nin mRNA ekspresyonlarını ölçtük(Şekil 4.20-21). 4. haftada sağlıklı gruba göre Runx2 mRNA ekspresyonunda genel olarak bir artış meydana gelirken defekt grubuna göre %2.5BN+ %10HA, % 2,5BN, % 5BN ve % 5BN+%10HA gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür.

Son hafta olan iyileşmeyi takip ettiğimiz 8. haftada ise Runx2 mRNA ekspresyonu Defekt, PLGA ve %10BN içeren gruplarda anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Yalnız %2,5BN+ %10HA, %2.5BN , % 5BN %10HA ve %5BN gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 4.22. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 4. hafta ALP mRNA ekspresyonları ($p<0.05$).



Şekil 4.23. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 8. hafta ALP mRNA ekspresyonları ($p<0.05$).

Çalışmamızda son olarak ALP mRNA ekspresyon miktarlarını inceledik (Şekil 4.22-23). 4.haftada sağlıklı gruba göre tüm gruplarda ALP mRNA ekspresyonlarının yüksek olduğu bulunmuştur. En fazla artışın ise sırası ile %2,5BN+ %10HA, %2,5BN , % 5BN %10HA, %5BN ve %10HA gruplarında olduğu görülmüştür.

8. haftaya baktığımızda ise Defekt grubuna göre % 2.5BN %10 HA ve %2,5 BN ve %5BN+%10HA gruplarında ALP mRNA ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde düşmüş olduğu gözlemlenmiştir($p<0.05$).

5.TARTIŞMA

Günümüzde kroniyofasiyal alanda çok değişik kemik greftleri ve implantlar kullanılmaktadır.¹²⁸ Beyin cerrahisinde greft ve çeşitleri implantlar gibi değişik osteokondüktif ajanlara kemik yapımı veya defektin doldurulması için gereksinim duyulmaktadır. Çalışmalarda kontrol olarak seçilen defektler genellikle kendiliğinden iyileşebilmektedir.¹²⁸ Bir kemik defektindeki iyileşmenin miktarı geniş ölçüde yara büyüklüğüne bağlıdır. Bu yüzden iyileşmenin görülmek istendiği bir defekt tipi kendiliğinde iyileşebileceği boyuttan fazla olmalıdır.

Kritik boyutlu defekt, bir hayvanda herhangi bir osteoindüktif bir materyal kullanılmadan yaşam boyunca kendiliğinden kemik iyileşmesi gösteremeyen en küçük boyutlu kemik defekti olarak tanımlanmaktadır. Yapılan kalvarial defekt çalışmalarında kritik büyüklükteki defektin boyutu hakkında net bir fikir bulunmamaktadır. Araştırmacıların çoğu 8 mm'yi kabul ederken, bir kısmı da 6 mm ve hatta 4 mm'yi kritik boyut kemik defekti olarak kabul etmektedirler.^{63, 64, 129-131} Yapılan bir çalışmada ise 3, 4, 5 ve 8 mm lik defekt oluşturmuşlar ve 8 mm lik defektin ideal bir defekt olduğunu savunmuşlardır.¹³¹ Bu tip defektler kemik oluşumundan çok, fibröz bağ dokusu oluşturarak iyileşme eğilimi göstermektedirler.^{5, 64, 132} Bu şekilde gerçekleşen fibrotik iyileşmeyi önlemek, bundan kaçınmak ve kemik hücrelerinin bölgede rejenerasyonunu sağlamak amacıyla defektlerin greft materyali ile rekonstrüksiyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.¹³³

Günümüzde yapılan araştırmalarda alternatif olarak, sentetik materyallerde büyük gelişmeler yaşanmıştır. Dünya genelinde tüm greftler içinde sentetik greft kullanımı, tahmin edilemeyen rezorbsiyon süreleri, şekillendirmedeki zorluk, yabancı cisim reaksiyonu oluşturmamasından dolayı sınırlı kullanımdaydı. Sentetik greft materyalleri grubu içinde yer alan PLGA, sentetik bir polimer materyal olup, yapılmış

olan in vivo ve in vitro kemik iyileşmesi çalışmalarında biyouyumluluk ve mekaniksel bakımdan çeşitli oranlarda arzu edilen iskele yapısını oluşturduğu tesbit edilmiştir.⁹⁹⁻¹⁰¹

PLGA iskelet yapısı, ilaç, hammadde, osteoblast veya mezenkimal kök hücre implantasyonu yapılarak kemik iyileşmesini teşvik eden önemli greft adayları arasındadır. Ayrıca PLGA scaffoldlar, uygun osteoprogenitör maddelerle kemik iyileşme süresini kısaltmak ve doku miktarını arttırmada kullanılabilecek önemli potansiyel greftler içerisinde yer almaktadır.¹⁰³

Kemik dokusunun inorganik kısmını oluşturan, kalsiyum fosfat tuzu şeklinde olan hidroksiapatit (HA) bu amaçla kullanılmaktadır ve büyük kemik defektlerinde yapısal desteğe ihtiyaç duyulduğunda önem kazanmaktadır.⁹ Yalnız günümüzde yapılan bütün çalışmalara rağmen kemik iyileşmesini artıracak daha doğrusu kalvarial kemik defektini iyileştirecek herhangi bir malzeme tespit edilememiştir.

Çalışmamızda belirli yoğunlukta hazırlanan hidroksiapatit ve bor minerallerinin kalvarial kemik defektleri üzerine etkisi veya etkilerini araştırmayı ve bor mineralinin sağlık alanında kullanılabilir olabileceğini ortaya koymayı hedefledik.

Konumuzla ilgili olarak; bor minerali son dönemlerde sağlık alanında popülerliği artan bir maddedir. İnsanlarda ve çeşitli hayvan modellerinde de Bor'un kemik mineral dengesini etkilediğine dair pek çok çalışma mevcuttur.^{117, 118} Bor'un büyüme üzerindeki önemli etkileri henüz açık bir şekilde gösterilmemiştir. Bor eksikliğine bağlı olarak osteoblast aktivitesinin azaldığı ve 10 veya 20 gün boyunca 3mg/gün dozunda bor diyetinin dental kemik gelişimini artırdığı gösterilmiştir.¹²² Konumuzla ilgili olarak Lahiri D et al 2011 yılında yaptığı bir çalışmada BN ve HA in-vitro ortamda osteoblastların biokompatitesinde önemli rollerinin olduğunu göstermiştir.¹¹ Bor'un kemik büyümesindeki bu etkilerine osteoindüktif büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin salınımı artırarak katkı sağladığı gösterilmiştir.¹²⁻¹⁴

Yine 2015 yılında yapılan bir çalışmada osteoporotik ratlardaki femur defektinde bor içeren scaffold uygulamasının iyileşmeye katkı sağladığı gösterilmiştir.¹⁵ 2010 yılında yapılan diğer çalışmada ise BN toksisitesinin olmadığını göstermiştir.¹¹

Ayrıca hücre kültürü çalışmaları borun kemik gelişimi için faydalı olduğunu göstermektedir. 1 veya 10 ng/mL bor dozlarının 0 ve 0.1 ng/mL dozlarıyla hücre kültüründe karşılaştırılması sonucu 1 veya 10 ng/mL dozlarında borun osteoblast (MC3T3-E1) hücrelerinde Tip 1 Kollajen, osteopontin, osteokalsin ve Runx2 mRNA ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir.¹⁶ Ayrıca bu çalışmada bor verilmesinin BMP 4, 6 ve 7 seviyelerini artırdığı da gösterilmiştir.

Kemik greft modelindeki kemik iyileşmesinin fizyolojik aşamaları uzun kemik kırıklarında meydana gelenlere benzese de bazı farklılıklar mevcuttur. Her türlü kemik grefti kemiği üç olası mekanizma yoluyla yenileyebilir: osteojenez, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon. Greftler, bu mekanizmaların değişen seviyelerdeki kombinasyonuyla kemiği geliştirebilir.⁸⁵

Kemik iyileşmesini; kalsifikasyon, kemiğin yeniden şekillenmesi ve hematoma oluşması gibi birçok farklı süreçler ve faktörler etkilemektedir. Hematom oluşumu, erken vasküler invazyon, inflamatuvar yanıt ve iyileşmeyi kolaylaştıracak olan mezenşimal kök hücrelerin göçü defekt iyileşmesi ile karakterizedir.¹³⁴ Defekt iyileşmesinin bir sonraki aşaması ise greft ile karakterize olan tamir ve yeniden modelleme olarak da isimlendirilen yeniden şekillenme aşamalarıdır.¹³⁵

Çalışmamızda ilk olarak kemik iyileşmesinin primitive göstergesi olan BT sonuçlarına baktığımızda defekt sonrası 2., 4. ve 8. haftalarda Defekt grubu hariç çok az olmakla beraber tüm grupların defektif kemik bölgesinde iyileşme mevcuttu. En iyi iyileşmenin ise %2.5 BN+ %10 HA, %2.5 BN gruplarında olduğu BT analizinde izlenmektedir. TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirdiğimiz daha önceki çalışmada

PLGA iskelelerine emdirilmiş bor'un kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin olduğunu tespit etmiştik.¹⁰³ Bu veriler gözönüne alındığında bizim çalışmamızın BT analiz sonuçları da bor mineralinin kemik iyileşmesi üzerine etki/etkilerinin olduğu gözlenmiş olup önceki yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmaktadır.

Kemik iyileşmesinde değerlendirilmesinde en önemli parametrelerden biri de histolojik bulgulardır. Kemik defekti oluşturulması sırasında cerrahi işleme bağlı olarak özellikle zedelenen damar duvarından kanama meydana gelmektedir. İyileşme aşamasında zamanla kanama rezorbe olur ve yerini oraya göç eden çeşitli inflamatuvar hücrelere ve fibröz dokuya bırakır.¹³⁶ Fibroziste kastedilen kronik enflamatuvar granülasyon dokusudur. Olaya sırasıyla fibroblastik proliferasyon, kapiller angiogenezi ve enflamatuvar mononükleer hücre girişi eşlik etmektedir. İyileşme sürecindeki olması gereken önemli bir basamaktır. Buda kaybolan doku açığını kapatmaya yardımcı olmaktadır. Bu sürecin devamında ise primer kemikleşme başlamaktadır.¹³⁷ Primer kemik oluşumu ile birlikte fibrozis dokusu kaybolmaktadır.

Çalışmamızda defekt alanında Hematoksilen ve eosin (H&E) boyama yapılan gruplar arasında fibrozis, yabancı cisim ve primer kemik oluşumunu histopatolojik olarak değerlendirdik.

Çalışmamızın histopatolojik bölümünü değerlendirilmesinde ilk olarak yabancı cisim reaksiyonlarının 4. ve 8. Hafta sonuçları incelenmiştir. Defekt iyileşmesinin 4. ve 8.haftasında Defekt, PLGA ve %10 HA grupları hariç tüm gruplarda yabancı cisim reaksiyonu artarken; % 2,5 BN+ %10 HA ve % 2,5 BN gruplarında minimal düzeyde bir yabancı cisim reaksiyonu görülmektedir. Yabancı cisim reaksiyonu başlangıçta artarken ilerki haftalarda normal iyileşme safhasında azalması gerekmektedir. Bizim çalışmamızda da %10 BN gruplarında yabancı cisim reaksiyonunun BN yoğunluğu artmasından dolayı aşırı arttığı görülmekte ve iyileşmeyi azaltan bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu

da bize BN'nin yüksek oranda kullanımındansa daha düşük dozlarda yabancı cisim reaksiyonu oluşturmadığını ve bu nedenle kemik iyileşmesinde faydalı olduğunu düşündürmektedir.

Fibrozis bulgularını değerlendirdiğimizde ise çalışmamızın 4. ve 8. haftalarında Defekt, PLGA, %10BN+%10HA ve %10BN gruplarında fibrozisin arttığını, % 2,5 BN+ %10 HA ile % 2,5 BN gruplarında ise fibrozisin anlamlı derecede azaldığı gösterdik. Yukarıda yabancı cisim reaksiyonunda da bahsettiğimiz gibi yüksek oranda BN kullanımı yabancı cisim reaksiyonunu artırarak kemik iyileşmesini azaltmış ve 8. Haftada azalması gereken fibrozis dokusu azalmayarak aksine daha çok artmıştır. % 2,5 BN+ %10 HA ile % 2,5 BN gruplarında ie fibrozisin azalması primer kemik oluşumunun yüksek seviyede olduğunu göstermektedir.

Kemik iyileşmesinin olması için gereken reaksiyon ise primer kemik oluşumunun gözlenmesidir. Histopatolojik çalışmamızın son basamağı ise primer kemik oluşumunun haftalara göre incelenmesidir. 4. hafta sonuçlarımıza baktığımızda sadece % 2,5 BN+ % 10 HA, % 2,5 BN, %5BN+%10HA ve %5BN gruplarında primer kemik oluşumu görülmüştür. 8. hafta sonuçlarımızda ise defekt grubu hariç tüm gruplarda primer kemik oluşumunun devam ettiği gözlenmektedir. Yalnız % 2,5 BN+ % 10 HA, % 2,5 BN gruplarındaki primer kemik oluşumunun en yüksek olduğu bulunmuştur. Fibrozis, yabancı cisim reaksiyonu ve primer kemik oluşumunu bir arada değerlendirdiğimizde yüksek oranda BN kullanılmasının yabancı cisim reaksiyonunu artırdığını, kollajen dokusunun primer kemik dokusuna dönmediğini ve bu nedenle defektin kapanamadığını görmekteyiz. Radyografik ve histopatolojik çalışmalarımızın bulguları birbirlerini desteklemekte olup en iyi iyileşmenin % 2,5 BN ve sonra % 5 BN gruplarında olduğu gösterilmiştir. Bu bulgulardan sonra BN kalvarial kemik defektindeki iyileştirici

rollerinin mekanizmasını incelememiz gerekmektedir. Bu nedenle tezimizin 2 aşamasında moleküler gen ekspresyonu çalışması yaptık.¹³⁸⁻¹⁴¹

Kalsifikasyon, osteoblast benzeri hücrelerin çeşitli kemik büyüme proteinleri tarafından tetiklenmesi sonucu kemik formasyonuna dönüşmesi ile oluşur. İn vitro çalışmalarda osteoblastların hidroksiapatit mineralleri etkisi ile kemik oluşumunu meydana getirdiği bilinmektedir.⁶⁶ Osteoblastlar BMP, RANKL ve inflamatuvar mediatörler gibi çeşitli faktörler ile kemik oluşumunu teşvik etmektedir.⁶⁷

Kemik defekti iyileşmesinin inflamatuvar fazında, TNF- α primer olarak sentezlenen sitokinler arasındadır ve kemiğin reabsorbe olmasını uyarmaktadır.¹⁴² TNF- α kemik homeostazını kemik yıkımını uyarak ve osteoblast hücrelerinin aktivitesini önleyerek gerçekleştirmektedir.¹⁴³

Tüm bu bilgiler ışığında çalışma gruplarımızdaki 4. hafta TNF- α seviyelerine baktığımızda ise tüm gruplarda sağlıklı gruba göre TNF- α seviyelerinde artış görülmektedir. Ancak % 2,5 BN, % 2,5 BN+% 10 HA gruplarındaki TNF- α seviyeleri oldukça düşük kalmıştır. 8. hafta sonuçlarımızı incelediğimizde ise Defekt grubuna göre %2,5 BN, %2,5 BN+ %10 HA gruplarında TNF- α seviyeleri anlamlı şekilde düşmüş olup sağlıklı gruba yaklaşmıştır. TNF- α seviyelerine %2,5 BN, %2,5 BN +%10 HA gruplarında 8. haftada enflamatuvar fazın bittiği ve son faza geçtiği görülmektedir. Histopatolojik bulgularımızla karşılaştırdığımızda ise yabancı cisim reaksiyonu ile TNF- α seviyeleri arasında bir paralellik olduğu görülmektedir. Yabancı cisim reaksiyonu devam ederken TNF- α seviyelerinin de yüksek kalması beklenen bir bulgudur. Bu yüksek seviye ise kemik iyileşmesini azaltmış olabilir.

Moleküler olarak kemik gelişiminde önemli role sahip olan matris dışı proteinlerden biri de osteopontindir. Kemiğin yapısındaki osteoblast ve osteosit hücreleri bol miktarda osteopontin salgılamaktadır.¹⁴⁴ Defektle meydana gelen patolojik

sınırlardaki kemik mineral kayıpları oluşması durumunda osteopontin bu bölgelerde birikerek etki etmektedir.¹⁴⁵ Deneysel kalvarial defekt çalışmalarında osteopontin seviyesinin iyileşmeye bağlı olarak defekt alanında arttığı gösterilmiştir.¹⁴⁶

Bizim çalışmamızda da 4. haftada osteopontin seviyeleri tüm gruplarda yükselmiş olup %2,5BN+%10HA, %2,5BN ve %5BN+%10HA gruplarında daha yüksek olduğu görülmektedir. Kemik iyileşmesinde osteopontin iskelet yapının yeniden şekillendirilmesinde önemli görevleri olduğu^{147, 148} için osteopontinin kemik iyileşmesi sürecinde yüksek olması doğaldır. 8. Haftada ise osteopontin seviyelerinin bu gruplarda istatistiksel olarak düşük olduğu görülmüştür. Bu durum osteopontinin kemiğin yeniden şekillendirilmesinde görevinin sonlandığını, osteoklast hücrelerinin aktivitesinin azaldığını ve kemik olgunlaşmasının tamamlanmak üzere olduğunu göstermektedir.

Kemik iyileşmesinin belirteçlerinden biri de kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2)'dir. BMP-2, TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. Kemotaksis ve hücre büyümesi, kırık doku farklılaşması ve kemiğe dönüştürme gibi osteoindüksiyonda önemli rolleri bulunmaktadır.¹⁴⁹ BMP hücre içerisinde Smad1/5/8 fosforile ederek Smad4 ile kompleks oluşturularak osteojenik genlerin aktive veya inhibe olmasına aracılık eder.¹⁵⁰ Ayrıca BMP ailesi bir transkript faktörü olan core-binding factor a1 (Cbfa1)'in sentezini artırarak osteoblast hücrelerine özgü genlerinde aktivasyonunda görev almaktadır.¹⁵¹ Konumuzla ilgili olarak kalvarial defekt çalışmalarında BMP-2 ekspresyonlarının defekt alanlarında kemik oluşumuna paralel olarak arttığı gösterilmiştir.¹⁵²

Çalışmamızdaki BMP-2 ekspresyon seviyelerini incelediğimizde 4. Haftada BMP-2 ekspresyonunun tüm gruplarda sağlıklı gruba göre arttığını görmekteyiz. Özellikle gruplarımız içerisinde %2,5BN +%10HA, %2,5BN gruplarındaki BMP-2 ekspresyonları diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar kemik iyileşmesinin %2,5 BN içeren gruplarda daha yüksek olduğunu göstermektedir.

8. Hafta bulgularımıza baktığımızda ise %2,5BN +%10HA, %2,5BN gruplarındaki BMP-2 seviyeleri 4. Haftaya göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu sonuçlar da bize bu gruplarda defekt iyileşmesinin diğer gruplara göre oldukça fazla olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda kemik mineralizasyonunda önemli bir göreve sahip olan ve osteopontin, BMP gibi osteoprogenitör medyatörlerin ekspresyonlarını kontrol eden Runt-ilişkili transkrip faktör (Runx-2)'nin ekspresyonlarını değerlendirdik. Runx2 osteoblast farklılaşmasında önemli bir transkripsiyon faktörüdür.¹⁵³

Otto ve ark¹⁵⁴ farelerde Runx2 genini kapatarak mineralizasyonun gelişmediği kıkırdak ve iskelet yapısının gelişmediğini bulmuşlardır. Günümüzde yapılan kemik defekti çalışmalarında Runx2 ekspresyonunun iyileşmeye bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷

Çalışmamızın 4.haftasında sağlıklı gruba göre Runx2 mRNA ekspresyonunda genel olarak bir artış meydana gelirken Defekt grubuna göre % 2.5BN+%10HA, % 2.5BN gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tesbit gözlemlendi. Son hafta olan iyileşmeyi takip ettiğimiz 8. hafta ise Runx2 mRNA ekspresyonunda düşme meydana gelmiş olup DEF grubuna göre %2,5BN+%10HA ve %2.5BN gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş şeklinde görülmüştür.

Çalışmamızda son olarak bir osteoblastik farklılaşma faktörü olan kemik ALP ekspresyonlarını inceledik.¹⁵⁸ Aktif ALP matriks proteinlerini mineralizasyonunu sağlamaktadır.¹⁵⁹ ALP aktivitesinin artması kemik oluşumunda osteopontin gibi osteojenik genlerin miktarını da arttırmaktadır.¹⁶⁰

Xiaoning ve ark¹⁶¹ yapmış oldukları kalvaryal defekt çalışmasında artmış olan ALP aktivitesinin, osteoblast hücre ve matriks mineralizasyonu üzerine etkileri olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızın 4. Haftasında sağlıklı ve Defekt grubuna göre diğer grupların ALP ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır. Defekt grubu ile kıyasladığımızda en iyi artışın % 2.5BN+ % 10HA ve % 2.5BN gruplarında olduğu tespit edilmiştir. 8.haftaya baktığımızda ise Defekt grubuna göre % 2,5BN+%10 HA ve %2,5BN grubunda ALP mRNA ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde düşmüş olduğu gözlemlenmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Deneysel olarak oluşturulan kalvarial kemik defekti üzerine değişik oranlara BN ve HA' in etkilerini incelediğimiz çalışmamızın sonuçları gerçekten umut vericidir.

Sonuç olarak bu çalışmada biyomalzeme materyali olarak hakkında fazla bilgi sahibi olmadığımız BN'nin in vivo olarak 8 haftalık kalvarial kemik defekti üzerine olan etkileri farklı perspektiflerden incelenmeye çalışılmıştır. Çeşitli oranlarda PLGA taşıyıcısına emdirilmiş HA ve BN scaffold implantları in vivo olarak test edildiğinde; kemik iyileşmesine katkıda bulundukları ve biyouyumluluk özellikleri sayesinde kemik dokusu ile uyumlu oldukları için biyomalzeme olarak oldukça yüksek oranda gelecek vadetmektedir. Çalışmamızda kullandığımız tedavi grupları içerisinde % 2,5BN içeren gruplardaki kemik iyileşmesinin diğer gruplara göre en iyi derecede olduğu gösterilmiş olup gerek tomografik gerekse histolojik ve moleküler bulgular ile de desteklenmiştir. Çalışmamızda elde edilen verilerin, ileri araştırmalarla desteklenmesi durumunda, kalvarial kemik defektlerinin tedavisi için rekontstriktif cerrahide BN'ün kullanılabilecek güçlü bir ajan olabileceğini göstermesi bakımından umut verici olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Humber CC. Evaluation of an in situ formed bioresorbable membrane and hyperbaric oxygen on bone regeneration using alloplastic bone substitutes in critical sized rabbit calvarial defects. Department of Dentistry. Italy: University of Toronto, 2010.
2. Ersatz H. von Schadeldefecten durch unter der Kopfscharteverschobene oder umgeklappte Periostknochenlappen beziehungsweise Perioslappen. *Beitrage zur klinischen Chirurgie*, 1903, 37: 499-510.
3. Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Modulation of cell differentiation in bone tissue engineering constructs cultured in a bioreactor. *Advances in experimental medicine and biology*, 2006, 585: 225-241.
4. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*, 1993, 260: 920-926.
5. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of oral surgery*, 1980, 38: 176-180.
6. Dodde R, 2nd, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT. Spontaneous bone healing in the rabbit. *The Journal of craniofacial surgery*, 2000, 11: 346-349.
7. Aybar Odstcil, Territoriale E, L M. An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontol Latinoam*, 2005, 18: 63-67.
8. Kubler N, Michel C, Zoller J, Bill J, Muhling J, Reuther J. Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 1995, 23: 337-346.
9. Ağaayak KS. Rat kalvaryumunda oluşturulan kritik boyut defektlerinde mezenkimal kök hücreleri, bifazik kalsiyum fosfat seramikleri ve trombosit zengin plazmanın kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin histolojik ve

immunohistokimyasal olarak araştırılması Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diyarbakır: Dicle Üniversitesi, 2011.

10. Nielsen FH. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 2000, 16: 512-514.
11. Lahiri D, Singh V, Benaduce AP, Seal S, Kos L, Agarwal A. Boron nitride nanotube reinforced hydroxyapatite composite: mechanical and tribological performance and in-vitro biocompatibility to osteoblasts. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2011, 4: 44-56.
12. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of dental research*, 2012, 91: 736-744.
13. Gorustovich AA, Lopez JM, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow. *Biomedical materials*, 2006, 1: 100-105.
14. Wu C, Miron R, Sculean A, Kaskel S, Doert T, Schulze R, Zhang Y. Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials*, 2011, 32: 7068-7078.
15. Chen X, Zhao Y, Geng S, Miron RJ, Zhang Q, Wu C, Zhang Y. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using PIB nanogels/boron-containing mesoporous bioactive glass composite scaffold. *International journal of nanomedicine*, 2015, 10: 839-846.
16. Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 2010, 24: 243-250.

17. Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part I of IV parts: mechanisms of calcium transfer between blood and bone and their cellular basis: morphological and kinetic approaches to bone turnover. *Metabolism: clinical and experimental*, 1976, 25: 809-844.
18. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures*, 1996, 45: 371-386.
19. Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part III of IV parts; PTH and osteoblasts, the relationship between bone turnover and bone loss, and the state of the bones in primary hyperparathyroidism. *Metabolism: clinical and experimental*, 1976, 25: 1033-1069.
20. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instructional course lectures*, 1996, 45: 387-399.
21. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurgical focus*, 2001, 10: E1.
22. Kierszenbaum A. *Histology and Cell Biology*. 1st Baskı. St. Louis, Mosby Inc., 2002: 131.
23. L.C Junqueira, Carneiro J. *Basic Histology*. 10th Baskı. New York, McGraw-Hill, 2003: 144-146.
24. Bancroft JD, A. S. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Baskı. Newyork, Churchill Livingstone, 1996 309-339.

25. Recker RR. Disorders of bone and mineral metabolism. İçinde: Favus FLCMJ (Çeviri editörü). *Embryology, anatomy, and microstructure of bone.*, New York, Raven Press, 1992: 219-240.
26. Baron R. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism İçinde:(Ed.) MJF (editör). *General principles of bone biololgy*, 5th Baskı. Washington, DC, American Society for Bone and Mineral Research, 2003: 1-8.
27. P.G Robey, Boskey. AL. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. İçinde:(Ed.) JF (editör). *Extracellular matrix and biomineralization of bone*, 5th Baskı. Washington, DC, American Society for Bone and Mineral Research., 2003: 38-46.
28. Olah AJ. Quantitative relations between osteoblasts and osteoid in primary hyperparathyroidism, intestinal malabsorption ad renal osteodystrophy. *Virchows Archiv. A: Pathology. Pathologische Anatomie*, 1973, 358: 301-308.
29. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Instructional course lectures*, 1987, 36: 27-48.
30. İnci İ. Alvaryal defektlerin onariminda jelatin/hidroksiapatit esasli kriyojel doku İskelelerinin etkisi. Biyomühendislik Anabilim Dalı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2012.
31. Squier CA, Ghoneim S, Kremenak CR. Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *Journal of anatomy*, 1990, 171: 233-239.
32. Ellender G, Feik SA, Carach BJ. Periosteal Structure and Development in a Rat Caudal Vertebra. *Journal of anatomy*, 1988, 158: 173-187.
33. Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone diseases. II. PTH and

- bone cells: bone turnover and plasma calcium regulation. *Metabolism: clinical and experimental*, 1976, 25: 909-955.
34. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003, 423: 337-342.
 35. R. Dee. *Principles of orthopaedic practice* 2nd Baskı. New York, McGraw-Hill, 1997.
 36. Pritchard JJ. Biochemistry and Physiology of Bone. İçinde:(Ed.) GB (editör). *General Anatomy and Histology of Bone*, 1st Baskı. New York, Academic Press, 1956: 1-25.
 37. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering & physics*, 1998, 20: 92-102.
 38. Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part IV of IV parts: The state of the bones in uremic hyperparathyroidism--the mechanisms of skeletal resistance to PTH in renal failure and pseudohypoparathyroidism and the role of PTH in osteoporosis, osteopetrosis, and osteofluorosis. *Metabolism: clinical and experimental*, 1976, 25: 1157-1188.
 39. G.R Mundy, D. Chen, Oyajobi. BO. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. İçinde:(Ed.) MJF (editör). *Bone Remodeling*, 5th Baskı. Washington, DC, American Society for Bone and Mineral Research. , 2003: 46-57.
 40. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. *The Orthopedic clinics of North America*, 2000, 31: 375-388.
 41. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, 150: 893-899.

42. Zhou AJ, Peel SA, Clokie CM. An evaluation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate in combination with Pluronic F127 and BMP on bone repair. *The Journal of craniofacial surgery*, 2007, 18: 1264-1275.
43. Hu ZM, Peel SA, Sandor GK, Clokie CM. The osteoinductive activity of bone morphogenetic protein (BMP) purified by repeated extracts of bovine bone. *Growth factors*, 2004, 22: 29-33.
44. Clokie CM, Sandor GK. Reconstruction of 10 major mandibular defects using bioimplants containing BMP-7. *Journal*, 2008, 74: 67-72.
45. Fok TC, Jan A, Peel SA, Evans AW, Clokie CM, Sandor GK. Hyperbaric oxygen results in increased vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression in rabbit calvarial critical-sized defects. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 2008, 105: 417-422.
46. Schenk RK. Histophysiology of bone remodelling and bone repair., Perspectives on biomaterials : proceedings of the 1985 International Symposium on Biomaterials,, 1985 Taipei, Taiwan, 358.
47. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*, 2007, 38 Suppl 4: S3-6.
48. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 1978, 60-B: 150-162.
49. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, 2005, 36 Suppl 3: S5-7.
50. Wolff J. *The Law of Bone Remodelling*. Baskı. Berlin, Springer-Verlag, 1986.
51. Simmons DJ. *Fracture healing*. Baskı. Philadelphia, Lippincott, 1980: 283-330.

52. Schenk RK, Willenegger HR. [Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)]. *Unfallheilkunde*, 1977, 80: 155-160.
53. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury*, 2007, 38 Suppl 4: S1-2.
54. Gould SE, Rhee JM, Tay B-B, Otsuka NY, Bradford DS. Cellular contribution of bone graft to fusion. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2000, 18: 920-927.
55. Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 1991, 73: 832-847.
56. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*, 2007, 38 Suppl 4: S23-33.
57. Connolly JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clinical orthopaedics and related research*, 1998: S257-266.
58. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 1998, 85: 638-646.
59. S.T Rhee, L. Tong, Buchman. SR. Facial trauma. İçinde: McDonald SRTWS (Çeviri editörü). *Fracture Healing and Bone Graft Repair*, New York, Marcel Dekker, 2004: 95-136.

60. Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *International orthopaedics*, 2007, 31: 721-727.
61. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 2005, 87: 1367-1378.
62. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2006, 10: 7-19.
63. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*, 1986: 299-308.
64. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Annals of surgery*, 1982, 196: 100-109.
65. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2001, 30: 58-62.
66. Sprini D RGB, Stefano L. D, Cianferotti L. Napoli N Correlation between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2014, 11: 117-119.
67. Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, Shimizu H, Nakagami F, Koriyama H, Shimamura M, Miyake T, Rakugi H, Morishita R. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circulation research*, 2010, 107: 466-475.

68. Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *The Biochemical journal*, 1985, 232: 715-724.
69. Huan JL, Xing L, Qin XJ, Gao ZG, Pan XF, Zhao ZD. Expression and clinical significance of osteopontin in calcified breast tissue. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 2012, 13: 5219-5223.
70. Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CAG, Sodek J. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17: 1486-1497.
71. Chatakun P, Nunez-Toldra R, Lopez EJD, Gil-Recio C, Martinez-Sarra E, Hernandez-Alfaro F, Ferres-Padro E, Giner-Tarrida L, Atari M. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71: 113-142.
72. Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *Journal of bone and mineral research* 2010, 25: 695-705.
73. Chmielnicka M, Wozniacka A, Torzecka JD. The influence of corticosteroid treatment on the OPG/RANK/RANKL pathway and osteocalcin in patients with pemphigus. *Postepy dermatologii i alergologii*, 2014, 31: 281-288.
74. Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H, Tsuji H, Shide K, Kamao M, Chiba T, Inagaki N, Okano T, Kido S. High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2009, 20: 935-942.

75. Zofkova I. Bone tissue as a systemic endocrine regulator. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2014.
76. Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 2013, 19: 254-263.
77. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 89: 747-754.
78. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, Reinert CM, Tjia JS, Pierce WA, Wozney JM, Li XJ. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 1998, 13: 1483-1490.
79. Boufker HI, Lagneaux L, Najar M, Piccart M, Ghanem G, Body JJ, Journe F. The Src inhibitor dasatinib accelerates the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into osteoblasts. *Bmc Cancer*, 2010, 10.
80. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and tissue research*, 2011, 343: 289-302.
81. Postiglione L, Domenico GD, Montagnani S, Spigna GD, Salzano S, Castaldo C, Ramaglia L, Sbordone L, Rossi G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces the osteoblastic differentiation of the human osteosarcoma cell line SaOS-2. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72: 85-97.
82. Wallace JM, Orr BG, Marini JC, Holl MMB. Nanoscale morphology of Type I collagen is altered in the Brl mouse model of Osteogenesis Imperfecta. *J Struct Biol*, 2011, 173: 146-152.
83. Grskovic I, Kutsch A, Frie C, Groma G, Stermann J, Schlotzer-Schrehardt U, Niehoff A, Moss SE, Rosenbaum S, Poschl E, Chmielewski M, Rappl G, Abken

- H, Bateman JF, Cheah KS, Paulsson M, Brachvogel B. Depletion of annexin A5, annexin A6, and collagen X causes no gross changes in matrix vesicle-mediated mineralization, but lack of collagen X affects hematopoiesis and the Th1/Th2 response. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2012, 27: 2399-2412.
84. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, 2007, 19: 513-521, vi.
 85. Marx RE. Bone and bone graft healing. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, 2007, 19: 455-466, v.
 86. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ journal of surgery*, 2001, 71: 354-361.
 87. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*, 2005, 36 Suppl 3: S20-27.
 88. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clinical orthopaedics and related research*, 1996: 86-97.
 89. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *The New England journal of medicine*, 1992, 326: 726-732.
 90. Khan SN, Cammisa FP, Jr., Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2005, 13: 77-86.
 91. Strong DM, Friedlaender GE, Tomford WW, Springfield DS, Shives TC, Burchardt H, Enneking WF, Mankin HJ. Immunologic responses in human recipients of

- osseous and osteochondral allografts. *Clinical orthopaedics and related research*, 1996: 107-114.
92. Mellonig JT. Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery. *Dental clinics of North America*, 1991, 35: 505-520.
 93. Moghadam HG, Sandor GK, Holmes HH, Clokie CM. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2004, 62: 202-213.
 94. Piattelli A, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials*, 1996, 17: 1127-1131.
 95. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant dentistry*, 2006, 15: 197-207.
 96. Zhang M, Powers RM, Jr., Wolfenbarger L, Jr. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *Journal of periodontology*, 1997, 68: 1085-1092.
 97. Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcified tissue international*, 1981, 33: 71-76.
 98. Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*, 2010, 3: 3867-3910.

99. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27: 1399-1409.
100. Lao L, Wang Y, Zhu Y, Zhang Y, Gao C. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 2011, 22: 1873-1884.
101. Ngiam M, Liao S, Patil AJ, Cheng Z, Chan CK, Ramakrishna S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, 2009, 45: 4-16.
102. Penk A, Forster Y, Scheidt HA, Nimptsch A, Hacker MC, Schulz-Siegmund M, Ahnert P, Schiller J, Rammelt S, Huster D. The pore size of PLGA bone implants determines the de novo formation of bone tissue in tibial head defects in rats. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 2013, 70: 925-935.
103. Dogan A, Demirci S, Bayir Y, Halici Z, Karakus E, Aydin A, Cadirci E, Albayrak A, Demirci E, Karaman A, Ayan AK, Gundogdu C, Sahin F. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2014, 44: 246-253.
104. L.J Peterson, A.T Indresano, R.D Marciani, Rose. SM. *Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*. Baskı. J.B.Lippincott Company, 1992
105. R.J Fonseca, Walker RV. *Oral and Maxillofacial Trauma*. Baskı. W B Saunders Company, 1991: 183.

106. Barth A. Ueber histologische befunde nach knochenimplantationen. *Arch Klin Chir*, 1893, 46: 409-412.
107. Axhausen G. Histologische untersuch ungen uber knochentransplantation am menschen. *KDeutsche Ztschr F chir Leipz*, 1907, 93: 388-392.
108. Ham A, Gordon S. The origin of bone that forms in association with cancellous chips transplanted into muscle. *British journal of plastic surgery*, 1952, 5: 154-160.
109. Gray JC, Elves MW. Donor cells' contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. *Clinical orthopaedics and related research*, 1982: 261-271.
110. Lindholm TS, Urist MR. A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix. *Clinical orthopaedics and related research*, 1980: 288-300.
111. Heslop BF, Zeiss IM, Nisbet NW. Studies on transference of bone. I. A comparison of autologous and homologous bone implants with reference to osteocyte survival, osteogenesis and host reaction. *British journal of experimental pathology*, 1960, 41: 269-287.
112. Marx RE. Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clinics in plastic surgery*, 1994, 21: 377-392.
113. Goncu Y. Hekzagonal Bor Nitrur Urun Ozelliklerine Ogutmenin Etkisi. Fen Bilimleir Enstitüsü. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, 2012.
114. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anatomical record*, 2008, 291: 441-447.

115. Nielsen FHM, SL. Growing Evidence for Human Health Benefits of Boron. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2011, 16: 169-180.
116. Lee S, Aronoff S. Boron in plants: a biochemical role. *Science*, 1967, 158: 798-799.
117. Sheng MH, Taper LJ, Veit H, Qian H, Ritchey SJ, Lau KH. Dietary boron supplementation enhanced the action of estrogen, but not that of parathyroid hormone, to improve trabecular bone quality in ovariectomized rats. *Biological trace element research*, 2001, 82: 109-123.
118. Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1987, 1: 394-397.
119. Li X, Shi J, Dong X, Zhang L, Zeng H. A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2008, 84: 84-91.
120. Mondrinos MJ, Dembzyński R, Lu L, Byrapogu VK, Wootton DM, Lelkes PI, Zhou J. Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27: 4399-4408.
121. Hunt CD, Herbel JL, Idso JP. Dietary boron modifies the effects of vitamin D3 nutrition on indices of energy substrate utilization and mineral metabolism in the chick. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 1994, 9: 171-182.
122. Uysal T, Ustidal A, Sonmez MF, Ozturk F. Stimulation of bone formation by dietary boron in an orthopedically expanded suture in rabbits. *The Angle orthodontist*, 2009, 79: 984-990.

123. Eckhert CD. Boron stimulates embryonic trout growth. *The Journal of nutrition*, 1998, 128: 2488-2493.
124. Bai YS, Hunt CD. Dietary boron enhances efficacy of cholecalciferol in broiler chicks. *J Trace Elem Exp Med*, 1996, 9: 117-132.
125. Bajoria R, Sooranna SR, Chatterjee R. Leptin and bone turnover in monochorionic twins complicated by twin-twin transfusion syndrome. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2007, 18: 193-200.
126. Li D, Ye C, Zhu Y, Qi YY, Gou ZR, Gao CY. Fabrication of poly(lactide-co-glycolide) scaffold embedded spatially with hydroxyapatite particles on pore walls for bone tissue engineering. *Polym Advan Technol*, 2012, 23: 1446-1453.
127. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 1986, 68: 1017-1035.
128. Develioğlu H. Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2003 6
129. Pryor ME, Susin C, Wikesjo UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *Journal of clinical periodontology*, 2006, 33: 455-460.
130. Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound repair and*

regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 2004, 12: 252-259.

131. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta anatomica*, 1990, 138: 185-192.
132. Rowe NL. Nonunion of the mandible and maxilla. *Journal of oral surgery*, 1969, 27: 520-529.
133. Mundell RD, Mooney MP, Siegel MI, Losken A. Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 1993, 51: 1004-1012.
134. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 2008, 14: 179-186.
135. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in cell & developmental biology*, 2008, 19: 459-466.
136. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*, 2011, 42: 551-555.
137. E.F Eriksen, D.W Axelrod, F. M. *Bone histomorphometry*. Baski. New York, Raven, 1994.
138. Li Q, Reed DA, Min L, Gopinathan G, Li S, Dangaria SJ, Li L, Geng Y, Galang MT, Gajendrareddy P, Zhou Y, Luan X, Diekwisch TG. Lyophilized platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. *International journal of molecular sciences*, 2014, 15: 8509-8525.

139. Suliman S, Xing Z, Wu X, Xue Y, Pedersen TO, Sun Y, Doskeland AP, Nickel J, Waag T, Lygre H, Finne-Wistrand A, Steinmuller-Nethl D, Krueger A, Mustafa K. Release and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 are affected by scaffold binding techniques in vitro and in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2015, 197: 148-157.
140. Wang X, Li Y, Han R, He C, Wang G, Wang J, Zheng J, Pei M, Wei L. Demineralized bone matrix combined bone marrow mesenchymal stem cells, bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta3 gene promoted pig cartilage defect repair. *PloS one*, 2014, 9: e116061.
141. Zhang D, Huang D, Huang Y, Liu Y, Lin B, Yu C, Mou Y, Wu W, Zhang H, Lin H. Efficacy of combined therapy of periosteum and bone allograft in a critical-sized defect model in New Zealand white rabbits. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 2014, 20: 2394-2403.
142. Wahl EC, Aronson J, Liu L, Skinner RA, Miller MJ, Cockrell GE, Fowlkes JL, Thrailkill KM, Bunn RC, Ronis MJ, Lumpkin CK, Jr. Direct bone formation during distraction osteogenesis does not require TNFalpha receptors and elevated serum TNFalpha fails to inhibit bone formation in TNFR1 deficient mice. *Bone*, 2010, 46: 410-417.
143. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and Paradoxical Effects of TNF-alpha on Bone Homeostasis. *Frontiers in immunology*, 2014, 5: 48.
144. Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *Journal of cellular physiology*, 1997, 170: 88-100.

145. Jahnen-Dechent W, Schafer C, Ketteler M, McKee MD. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *Journal of molecular medicine*, 2008, 86: 379-389.
146. Zhang X, Ting K, Bessette CM, Culiati CT, Sung SJ, Lee H, Chen F, Shen J, Wang JJ, Kuroda S, Soo C. Nell-1, a key functional mediator of Runx2, partially rescues calvarial defects in Runx2(+/-) mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2011, 26: 777-791.
147. Chabas D. [Osteopontin, a multi-faceted molecule]. *Medecine sciences : M/S*, 2005, 21: 832-838.
148. Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin Promotes Vascular Cell-Adhesion and Spreading and Is Chemotactic for Smooth-Muscle Cells in-Vitro. *Circulation research*, 1994, 74: 214-224.
149. Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clinical orthopaedics and related research*, 1998: S66-72.
150. Rosen V. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine & growth factor reviews*, 2009, 20: 475-480.
151. Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 2000, 219: 461-471.
152. Lim SS, Kook SH, Bhattarai G, Cho ES, Seo YK, Lee JC. Local delivery of COMP-angiopoietin 1 accelerates new bone formation in rat calvarial defects. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2015.
153. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S,

- Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997, 89: 755-764.
154. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 1997, 89: 765-771.
155. Byers BA, Guldberg RE, Hutmacher DW, Garcia AJ. Effects of Runx2 genetic engineering and in vitro maturation of tissue-engineered constructs on the repair of critical size bone defects. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2006, 76: 646-655.
156. Zheng H, Guo Z, Ma Q, Jia H, Dang G. Cbfa1/osf2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int*, 2004, 74: 194-203.
157. Zhao Z, Wang Z, Ge C, Krebsbach P, Franceschi RT. Healing cranial defects with AdRunx2-transduced marrow stromal cells. *Journal of dental research*, 2007, 86: 1207-1211.
158. Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European journal of pharmacology*, 2011, 662: 78-84.
159. Wang W, Olson D, Liang G, Franceschi RT, Li C, Wang B, Wang SS, Yang S. Collagen XXIV (Col24alpha1) promotes osteoblastic differentiation and mineralization through TGF-beta/Smads signaling pathway. *International journal of biological sciences*, 2012, 8: 1310-1322.

160. Singh RK, Patel KD, Lee JH, Lee EJ, Kim JH, Kim TH, Kim HW. Potential of magnetic nanofiber scaffolds with mechanical and biological properties applicable for bone regeneration. *PloS one*, 2014, 9: e91584.
161. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. *PloS one*, 2014, 9: e104061.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Muhammed YAYLA Doğum tarihi: 01.01.1991 Doğum yeri: Konya Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 236 88 84 Faks: 0449 236 88 84 E-mail: muhammed.yayla@gmailcom
Eğitim
Lise: Rize Lisesi (2006) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi (2006-2010) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı (2010-20012) Doktora: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı (20012-2015)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: İyi derecede (ÜDS 63.75, Ekim 2012) Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Türk Farmakoloji Derneği
İlgi Alanları ve Hobiler
Bilgisayar Programları, Tasarım

EK-2. ETİK KURUL ONAYI FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-131

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

31.07.2014

ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 18.07.2014 tarih ve 42190979-01-02/3338 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Zekai HALICI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Laboratuvarında yürütülecek olan **"Ratlarda Kalvarial Defekt Modelinde Bornitrür ve/veya Hidroksiapatitli Scaffold Uygulamasının Kemik Regenerasyonuna Etkileri"** başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.07.2014 tarih ve 5 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 107 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
İmza : 3186
07.08.2014

Toplantı Tarihi : 25.07.2014

Toplantı Sayısı : 5

KARAR NO : 107- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Zekai HALICI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Laboratuvarında yürütülecek olan **"Ratlarda Kalvarial Defekt Modelinde Bornitrür ve/veya Hidroksiapatitli Scaffold Uygulamasının Kemik Regenerasyonuna Etkileri"** başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 18.07.2014 tarih ve 42190979-01-02/3338 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM

Telefon : 0-442-231 47 30

Fax : 0-442-231 55 63

e-mail: hadyek@atauni.edu.tr

Prof. Dr. S. Selçuk ATAMANALP
Dekan

08 Ağustos 2014