T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

ERİTROPOETİNİN MANDİBULAR DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZİSİ ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Ahmet MİHMANLI

Danışman

Doç Dr. Doğan DOLANMAZ

KONYA – 2006

İ Ç İ N D E K İ L E R

1. GİRİŞ ….....**1-3**

2. LİTERATÜR BİLGİ ….....**4-36**

2.1. Distraksiyon Osteogenezisinin Tanımı ……..4

2.2. Distraksiyon Osteogenezisinin Gelişimi……...…….4

2.3. Başlangıç Distraksiyon Teknikleri ……..……...4

2.4. İllizarov Etkileri……...…….....6

2.5. Distraksiyon Osteogenezisi Teknikleri.....7

2.5.1 Kallotazis….....7

2.5.2. Fiziyal distraksiyon 7

2.5.2.1. Distraksiyon epifiziyalis……...……7

2.5.2.2. Kondradiatazis…….……..8

2.6. Distraksiyon Osteogenezisi Yöntemi ile Kemik Transportu…….…....8

2.6.1. Monofokal osteosentez…….……8

2.6.2. Bifokal osteosentez ……..8

2.6.3. Trifokal osteosentez …….....9

2.7. Mandibular Distraksiyon Osteogenezisi …….....,,9

2.8. Maksiller Distraksiyon Osteogenezisi…….....11

2.9. Alveoler Distraksiyon.…….……..12

2.10. Distraksiyon Osteogenezisi ile Hızlı Ortodontik Diş Hareketi…….....15

2.11. Mandibular distraksiyon aygıtları…….…….....16

2.12. Distraksiyon Osteogenezisinin Biyolojik Temelleri…….....17

2.13. Distraksiyon Osteogenezisinde Yeni Kemik Oluşması..…….18

2.14. Distraksiyon Osteogenezisinin Dönemleri.……18

2.14.1. Osteotomi ……19

2.14.2. Latent dönem.....20

2.14.3. Distraksiyon dönemi.....21

2.14.4. Pekiştirme dönemi……...…….24

2.14.5. Yeniden şekillenme dönemi.……24

2.15. Distraksiyon Osteogenezisinde Hayvan Deneylerinin Avantajları…….25

2.16. Yeni Kemiğin Oluşumunu Hızlandırmak İçin Yapılan Deneysel Çalışmalar……26

2.17. Eritropoetin (EPO)……..31

2.17.1. Rekombinant insan eritropoetininin farmokolojik olarak kullanımı……....34

3. GEREÇ ve YÖNTEM…..….....37-45

3.1. Distraksiyon Aygıtı ….....37

3.2. Cerrahi Teknik.....…….....39

3.3. Ameliyat Sonrası Bakım ve Latent dönem... ……42

3.4. Distraksiyon ve Pekiştirme Dönemi…..……..43

3.5. Yeni Oluşan Kemik Bölgesinin Histomorfometrik Olarak İncelenmesi..……43

3.6. İstatistiksel Yöntem..…….45

4. BULGULAR ….....46-58

4.1. Deney ve Kontrol Grubunda Yeni Oluşan Kemik Dokusunun Histomorfometrik Analiz Bulguları……..…….49

4.1.1. Yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoblast sayısı.…….....49

4.1.2. Yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoklast sayısı…….51

4.1.3. Yeni oluşan kemik bölgesindeki damar sayısı…….……..52

4.1.4. Yeni oluşan kemik bölgesindeki fibroblast sayısı……..54

4.1.5. Yeni oluşan kemik bölgesindeki trabeküler kemik alanı…….……..55

4.1.6. Yeni oluşan kemik bölgesindeki kollajen lif sayısı……..…..56

5. TARTIŞMA ve SONUÇ ……..59-76

6. ÖZET …….77-78

7. SUMMARY ……..79-80

8. KAYNAKLAR ……...81-103

9. ÖZGEÇMİŞ …….104

10. TEŞEKKÜR ……...105

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoblast sayıları……..50

Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoklast sayıları …….51

Tablo 4.3. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki damar sayıları.52

Tablo 4.4. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki fibroblast sayıları…….....54

Tablo 4.5. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki trabeküler kemik alanları……..……...…….56

Tablo 4.6. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki kollajen lif sayıları…….…..……...57

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 4.1. Gruplar arasında osteoblast sayısının dağılımı …….....50

Grafik 4.2. Gruplar arasında osteoklast sayısının dağılımı …….……...51

Grafik 4.3. Gruplar arasında damar sayısının dağılımı……...53

Grafik 4.4. Gruplar arasında fibroblast sayısının dağılımı……..54

Grafik 4.5. Gruplar arasında trabeküler kemik alan dağılımı……...…..56

Grafik 4.6. Gruplar arasında kollajen lif sayısının dağılımı……57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1. Distraktörün ön ve arka yüzden görüntüsü……..39

Şekil 3.2 Osteotomi hattı……..41

Şekil 3.3. Eksternal pinlerin uygulanması ve osteotominin tamamlanması…….41

Şekil 3.4. Ameliyat sonunda yerleştirilmiş olan distraktörün görünümü…….42

Şekil 3.5. Deney sırasında uygulanan rekombinant insan eritropoetini……...42

Şekil 3.6. Alan hesabı örneklemesi……..45

Şekil 4.1. Distraksiyon öncesinde normal kapanış, distraksiyon sonrasında oluşan çapraz kapanış ve laterognati ……..……46

Şekil 4.2. Distrakte edilen mandibulada pin yuvalarının ve yeni oluşan kemik dokusunun görüntüsü.....47

Şekil 4.3. Direk radyografide yeni oluşan kemik bölgesi……..……..47

Şekil 4.4. Yeni oluşan kemik bölgesinin ışık mikroskobu ile elde edilen makroskobik görüntüsü…….…….48

Şekil.4.5. Panoromik histolojik görüntülemede yeni oluşan kemik bölgesinde trabeküler kemik yapıları ve pin boşlukları …….…….……48

Şekil 4.6. Yeni oluşan kemik bölgesinin histolojik görüntüsü……49

Şekil 4.7. Yeni oluşan kemik bölgesindeki damarların görüntüsü ……....53

Şekil 4.8. Yeni oluşan kemik bölgesindeki fibroblastların görüntüsü……..…...55

Şekil 4.9. Yeni oluşan kemik sahasındaki kollajen liflerin görüntüsü…… ..……..58

KISALTMALAR

DO : Distraksiyon osteogenezisi

EPO : Eritropoetin

rHuEPO : Rekombinant insan eritropoetini

EPOR : Eritropoetin reseptörü

ED-71 : 2-beta-(3-hidroksipropoksi)-1 alfa, 25-dihidroksivitamin D_3

bFGF : Basic fibroblast growth factor

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

TGF-β1 : Transforming growth factor beta1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

rhOP-1 : Recombinant human osteogenic protein-1

FGF-2 : Fibroblast growth factor-2

BMP : Bone morphogenetic protein

HBO : Hiperbarik oksijen

1.GİRİŞ

Doğumsal veya kazanılmış kraniofasiyal deformitelerin tedavisinde güvenli bir şekilde uygulanan distraksiyon osteogenezisi (DO); planlı olarak ayrılmış kemik segmentlerine kademeli çekme kuvveti uygulanarak yeni kemiğin oluştuğu, eş zamanlı olarak kan damarları, sinirler, kaslar, deri, mukoza, fasya, ligamenler, kartilaj ve periostu içeren yumuşak doku matriksinin de genişleyip bu duruma adapte olduğu bir yöntemdir. Kemiğe uygulanan gerilim boyunca kemik rejenerasyonuna ek olarak çevre yumuşak dokulardaki bu adaptif değişiklikler nedeniyle yöntem distraksiyon histogenezisi olarak da adlandırılmaktadır (Cope ve ark 1999). DO, fraktür iyileşmesinden farklı olarak kontrollü mekanik stimülasyon altında kemik rejenerasyonunun oluştuğu endojen kemik doku mühendisliğinin bir tekniği olarak düşünülür (Warren ve ark 2001).

Endokondral kemiklerde başarı elde edilmesiyle bu uygulama kriterleri membranöz kemiklere de adapte edilmiş ve bu kemiklerin rekonstrüksiyonunda başarıyla uygulanmıştır (McCarthy ve ark. 1992). Son yıllarda yoğun ilgi gören DO, çok sayıda doğumsal ve kazanılmış kraniofasiyal iskelet anomalilerinin tedavisinde yeni bir bakış açısı getirmiştir. Literatürde, kraniofasiyal DO uygulamaları çok hızlı artmasına rağmen yaş, cerrahi teknik, ritim, oran, latent dönem ve pekiştirme dönemi gibi önemli parametreler kesin olarak belirlenmemiştir. Bu parametreler endokondral orjinli kemiklerdeki DO sonuçlarını etkilediğinden, kraniofasiyal yapıda yer alan membranöz kemiklerdeki DO sonuçlarını da etkileyebileceği beklenebilir. Bununla birlikte DO çocuklarda, gençlerde ve yetişkin hastalarda başarıyla uygulanmıştır. DO'nun en önemli kısımlarından birisi olan kemik segmentini ikiye ayırma işleminde, hem osteotomi hem de kortikotomi kullanılabilmektedir. Günümüzde çogunlukla osteotomi tercih edilip günlük birkaç turda 1mm distraksiyon oranı ve 5-7 gün latent dönem uygulanmaktadır. Mandibular uzatmalarda pekiştirme dönemi çogunlukla 6-8 hafta kullanılmasına rağmen diğer

kraniofasiyal kemiklerde bu süre daha uzun tutulmaktadır. Kraniofasiyal DO'nun ilk uygulamalarında distraksiyon apareyleri ekstraoral olmasına rağmen günümüzde hastanın gereksinimleri ve deformitenin tipi dikkate alınarak çeşitli tipte apareyler kullanılmaktadır (Swennen ve ark 2001).

DO, bir çok avantaja sahip ve biyolojik bir olay olmasına rağmen uzun tedavi süresi boyunca distraksiyon aygıtının kırılması, transmukozal pinlerin etrafında enfeksiyon, pinlerin kaybı, eklem hareketlerinde kısıtlama, kemik segmentlerinin pozisyonel değişiklikleri ve kırık oluşması gibi komplikasyonlar görülebilir (Terheyden ve ark 2003). Bu yüzden son dönem çalışmalar genellikle bu sürenin kısaltılması üzerine odaklanmıştır.

Kallusun olgunlaşma hızı; hastanın yaşı, distraksiyonun günlük oranı, aktivasyon tipi (devamlı veya tek harekette) ve distraksiyon aygıtının mekaniksel dayanıklılığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Hastanın yaşı, iyileşme kapasitesi ve ameliyat bölgesinin vaskülarizasyonu için çok önemlidir (Claes ve ark 2000). Distraksiyon aralığındaki kemik iyileşmesini ölçmede geleneksel radyografilerin ve ultrasonun güvenilir olmamasından dolayı kallusun olgunlaşmasını kesin olarak belirleyen teşhis araçları henüz bulunamamıştır (Thorey ve ark 2000).

DO esnasında, bu komplikasyonların sıklığı ve yeni oluşan kemiğin radyolojik görüntülenmesinin yetersiz olmasından dolayı distraksiyonun oran ile ritminin manipüle edilerek arttırılması ile oluşturulan yeni kemiğin adaptasyon durumunun değerlendirilememesi tedavi süresini kısaltmaya yönelik ilgiyi arttırmıştır. Hidrolik aygıtlarla devamlı distraksiyon (Kessler ve ark 2000), hiperbarik oksijen uygulaması (Clark ve ark 2006) , kemik iliği kaynaklı mezenşimal hücrelerin ve trombositten zengin plazmanın transplantasyonu (Kitoh ve ark 2004) , bifosfonatların uygulanması (Little ve ark 2001, Pampu 2005), rekombinant büyüme faktörlerinin uygulanması (Okazaki ve ark

1999) gibi deneysel çalışmalar DO esnasında kemik oluşumunu hızlandırmak ve kemik kalitesini arttırmak için yapılmıştır.

Bu çalışmanın amacı; tavşan modelinde, mandibulanın DO esnasında subkütan uygulanan glikoprotein bir hormon olan rekombinant insan eritropoetininin (rHuEPO) yeni kemiğin oluşumu ve kalitesi üzerine etkisini histomorfometrik olarak değerlendirmektir.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Distraksiyon Osteogenezisinin Tanımı

Distraksiyon Osteogenezisi (DO), planlı olarak ayrılmış kemik segmentlerinin yüzeyleri arasında kademeli uygulanan çekme kuvvetleriyle yavaş yavaş yeni kemiğin oluştuğu biyolojik bir olaydır. Özellikle, bu yeni dokunun oluşumu, ayrılan kemik segmentlerini bağlayan kallus dokusuna distraksiyon kuvvetleri uygulandığı zaman başlamakta ve bu yeni oluşan doku gerildiği sürece devam etmektedir. Bu çekme kuvveti ile oluşan gerilim distraksiyon vektörüne paralel olarak yeni kemik formasyonunu harekete geçirmektedir (Samchukov ve ark 1998a, 1998b).

Kemiğe uygulanan distraksiyon kuvvetleri aynı zamanda çevre yumuşak dokularda da gerilime sebep olmakta ve distraksiyon histogenezisi olarak da adlandırılan adaptif değişiklikler başlatmaktadır. Kademeli distraksiyon kuvvetleri tarafından üretilen gerilim streslerinin etkisi altında gingiva, deri, fasya, kas, kartilaj, kan damarları, ve periferal sinirleri içeren komşu dokularda aktif histogenezis oluşmaktadır. Yumuşak dokulardaki bu adaptif değişiklikler akut ortopedik düzeltmelerde görülen potansiyel relapsı azaltarak büyük iskeletsel hareketlere izin vermektedir (Anino ve ark 1994, Labbe ve ark 1997).

2.2. Distraksiyon Osteogenezisinin Gelişimi

Kraniofasiyal DO tekniği, dentofasiyal çekme kuvveti, kraniofasiyal osteotomi ve iskeletsel fiksasyon metodlarını temel almaktadır. Sonra bu teknik, bu metodların modifikasyonları ve uzun kemiklerdeki DO ile ilgili tecrübeler sayesinde gelişmiştir (Cope ve ark 1999).

2.3. Başlangıç Distraksiyon Teknikleri

Codivilla (1905), deformiteden dolayı kısalan bacakların uzatılması için bir metod tarif etmiştir. Araştırmacı, femura bir osteotomi uygulayıp ardından 25–75 kg'lık kuvvetler uygulamıştır. Bu kuvveti osteotomize bacağa uygulayabilmek için topuğa büyük bir çivi

yerleştirmiştir. Bu tekniği 22 vakada kullanıp vakaların bacak uzunluğunun 3–8 mm arasında arttığını gözlemiştir.

Abbott (1927), kemik uçlarını stabilize eden bir aygıt geliştirerek bu tekniği modifiye etmiş ve osteotomize kemik sahasına doğrudan çekme kuvveti uygulamıştır. Bu tekniğin başlangıç dönemlerinde lokal ödem, deri nekrozu, pinlerin olduğu bölgede enfeksiyon ve genişleyen kemik alanlarında istenmeyen kemikleşme sahaları gibi komplikasyonlar görülmüştür.

Wassmund (1935)' a göre, Rosenthal 1927 yılında, bir aylık bir dönem boyunca kademeli olarak aktive edilen intraoral diş destekli bir aygıt kullanarak ilk mandibular osteodistraksiyon sürecini başlatmıştır.

Kazanjian (1941), akut ilerletme yerine kademeli, azdan çoğa doğru artan çekme kuvveti kullanarak mandibular osteodistraksiyon gerçekleştirmiştir. Mandibular korpusa modifiye L şeklinde bir osteotomiden sonra, simfize bilateral tel çengel uygulayıp postoperatif üç gün sonra mandibular anterior segmenti kademeli ilerletebilmek için yüz üzerine bir aygıt yerleştirmiştir. Bu aygıttan simfizdeki çengellere elastikleri bağlayıp aktive etmiştir. Onyedi gün sonra, elastik kuvvetler kaldırıldıktan sonra okluzal splint ve rijid barla fiksasyon sağlamıştır. Bunlar çenede 11 hafta pekiştirmeyi tamamlamak için bırakılmıştır.

İlk DO yöntemleri kemik segmentlere ve etrafındaki yumuşak dokulara kademeli çekme kuvveti uygulamasına rağmen ideal sonuçlar alınamamıştır. Kemik segmentlerin manipülasyonunu kontrol etmedeki zorluk, distraksiyon aygıtlarının yetersizliği ve kemik fiksasyonunun stabil olmamasından dolayı bu teknikler gerekli ilgiyi kazanamamıştır. Bu tekniklerin yerine, özellikle Trauner ve Obwegeser (1957) tarafından sagital split osteotomisinin tanımlanmasından sonra mandibular deformitelerin düzeltilmesinde osteotomiler ilk tedavi seçeneği olarak düşünülmüştür.

İskeletsel fiksasyon tekniklerine ek olarak bacak uzatmadaki distraksiyon protokolünün öğretilmesi ile mandibular osteodistraksiyona ilgi artmıştır. Bu dönemde çok popüler tekniklerden birisi 1963 yılında Wagner tarafından tanıtılmıştır. Üç aşamadan oluşan bu teknikte, önce femur veya tibiaya açık osteotomi yapıldıktan sonra akut 5 mm uzatmalı monolateral eksternal fiksatör yerleştirilmiştir. Distraksiyon cerrahiden bir gün sonra başlatılıp istenilen uzunluk elde edilinceye kadar günde 1-1.5 mm olarak devam ettirilmiştir. İkinci aşamada distraksiyon aralığına yeterince kansellöz kemik yerleştirildikten sonra eksternal fiksatör çıkartılıp internal plak uygulanmıştır. Son olarak da kemik iyileşmesi tamamlandıktan sonra internal plak çıkartılmıştır (Wagner 1971,1978).

Rus ortopedik cerrah İlizarov, uzun kemiklerde uyguladığı DO tekniğinin prensiplerini ilk olarak 1989 yılında yayınlamıştır. Bu tekniğe, periost ve endosteum mümkün olduğu kadar korunup, kortikotomi olarak adlandırılan cerrahi kemik bölünmesiyle başlanmıştır. Özellikle, İlizarov kemik korteksinin 2/3' ünü böldükten sonra iki yanından küçük bir osteotomla rotasyonal hareketlerle kemik ayırmasını tamamlamıştır. İlizarov, bu düşük enerji subperiostal kortikotomi tekniğinin, osteojenik dokuları ve kan desteğini maksimum koruduğunu belirtmiştir. Araştırmacının distraksiyon protokolü 5-7 gün latent dönemle başlatılıp kemik segmentleri dört eşit tur olmak üzere günde toplam 1mm oranda genişletilmiştir. Distraksiyonun tamamlanmasından sonra pekiştirme dönemi başlatılıp, bu dönem distraksiyon aralığında yeni oluşmuş kemik dokusu şekillenene kadar devam ettirilmiştir (Ilizarov 1989a, 1989b).

2.4. İlizarov Etkileri

İlizarov, klinik tecrübelerine dayanarak, 'illizarov etkileri' olarak bilinen DO'nun iki biyolojik prensibini bildirmiştir. Bunlar:

1.Dokuların büyüme ve gelişimi üzerine gerilim stres etkisi

2.Kemiklerin ve eklemlerin şekli üzerine kan desteğinin ve yüklemenin etkisi.

İllizarov'un birinci prensibine göre; kademeli çekme kuvveti yaşam dokularının rejenerasyonunu uyaran ve koruyan bir strese neden olur. Yeni oluşan kemik önceki kemiğin doğal yapısına kendini hızlıca uydurup yeniden şekillenir.

İllizarov'un ikinci prensibine göre; eklem ile kemiklerin şekli ve kütlesi, mekanik yükleme ile kan desteği arasındaki bir etkileşime bağlıdır. Eğer normal veya artmış mekanik yüklemeyi desteklemek için kan desteği yetersiz ise, sonradan bu kemikte atrofik veya dejeneratif değişiklikler oluşmaya başlar. Eğer artmış mekanik yüklemeyi desteklemek için kan desteği yeterli ise kemik dengeleyici hipertrofik değişiklikler gösterebilir.

2.5. Distraksiyon Osteogenezisi Teknikleri

Çekme kuvvetlerinin uyardığı yere bağlı olarak DO teknikleri, kallotazis ve fiziyal distraksiyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.5.1. Kallotazis

Fraktür kallusların distraksiyonudur. Osteotomi veya kırık ile devamlılığı bozulmuş kemik segmentlerinin etrafında oluşan tamir kallusunun kademeli gerilmesiyle oluşur. Klinik olarak kallotazis; latent dönem, distraksiyon dönemi ve pekiştirme dönemi olmak üzere 3 ardışık dönemden oluşur.

2.5.2. Fiziyal distraksiyon

Kemik büyüme plaklarının distraksiyonudur. Bu teknik temel olarak büyüme plakları arasındaki distraksiyon oranına göre distraksiyon epifiziyolizis ve kondrodiatazis olmak üzere ikiye ayrılmıştır.

2.5.2.1. Distraksiyon epifiziyolizis

Büyüme bölgelerinde günde 1-1.5 mm arasında değişen distraksiyon oranlarında yapılan hızlı bir fiziyal distraksiyon tekniğidir. Hızlı artan gerilim, büyüme plaklarında bir

fraktür meydana getirir. Ardından epifizin metafizden ayrılması ile arada oluşan trabeküler kemik büyüme plaklarının yer değiştirmesine yol açmaktadır (Aldegheri ve ark 1989).

2.5.2.2. Kondrodiatazis

Fraktür olmadan büyüme plaklarının günde yaklaşık 0.5 mm olacak şekilde yavaş gerilmesiyle oluşur. Bu gerilim kıkırdak hücrelerinin biyosentetik aktivitesini arttırmakta ve sonuçta hızlanmış bir osteogenezis oluşmasına neden olmaktadır (Aldegheri ve ark 1989).

2.6. Distraksiyon Osteogenezisi Yöntemi ile Kemik Transportu

Kemik transportu onkolojik rezeksiyon, travma ve doğumsal deformitelerle oluşan uzun kemik defektlerinin tedavisi için ilk kez İlizarov tarafından öğretilen bir DO tekniğidir (Annino ve ark 1994, Ilizarov 1988). Günümüze kadar birkaç kemik transfer tekniği gelişmiştir. Bu teknikler, İlizarov'un distraksiyon–kompresyon osteosentez sınıflamasını kapsamakta ve DO metodlarıyla da ilgisi bulunmaktadır. İlizarov'a göre, kemik transportu distraksiyon–kompresyon bölgelerinin sayısına göre üçe ayrılır: monofokal, bifokal ve trifokal.

2.6.1. Monofokal osteosentez

Başlangıçta bir sıkıştırma dönemini takiben kemik segmentlerinin kademeli olarak ayrılması esnasında oluşan DO tekniğidir.

2.6.2. Bifokal osteosentez

Kalan kemik segmentinden ayrılan bir vaskülarize kemik segmentinin veya transport diskin defekte doğru kademeli olarak hareketidir. Yeni kemik, transport diskin hareketi esnasında oluşur ve taşınan kemik segmenti kemik defekt bölgesini kapatır. Sonra kapatılan bölgede sıkıştırma osteosentezi oluşur. Transport diskin defekte ilerlerken transport diske rehberlik eden kenar, fibrokartilaj doku ile çevrili olabilir. Bu dokunun çıkartılması kapatılan bölgedeki osseöz birleşmeyi kolaylaştırır.

2.6.3. Trifokal osteosentez

Büyük kemik defektli vakalarda iki transport disk oluşturulur ve eş zamanlı olarak birbirine temas sağlayana kadar hareket eder. Bu DO tekniği, aynı zamanda farklı bölgelerde iki yeni kemik oluşum alanıyla karakterizedir. Ardından kapatılan bölgede bir sıkıştırma oluşur.

2.7. Mandibular Distraksiyon Osteogenezisi

Snyder ve ark (1973), mandibulaya İlizarov'un prensiplerini uygulayan ilk raporu yayınlamışlardır. Bir mandibular deformite oluşturmak ve dental çapraz kapanış meydana getirmek için bir köpek mandibulasından unilateral olarak 15 mm kemik segment rezeke etmişlerdir. On hafta sonra kısalmış mandibula osteotomize edilip eksternal distraksiyon aygıtı yerleştirilmiştir. Latent dönemde 7 gün beklenildikten sonra aygıt 14 gün boyunca günde 1 mm aktive edilip oklüzyon restore edilmiştir. Mandibular korteksin yeniden oluşumunun ve distraksiyon aralığına medullar kanalın geçişinin fiksasyondan 6 hafta sonra oluştuğu gözlenmiştir.

Birkaç yıl sonra Michieli ve Miotti (1977), benzer bir distraksiyon prokolünü mandibulada intraoral olarak uygulamışlardır. İki adet köpekte, dişe yapışan bir distraksiyon aygıtı kullanarak bir köpeğin mandibulasını 5 mm diğer köpeğin mandibulasını 15 mm uzatmışlardır. Histolojik muayene sonucunda, sonradan lameller kemiğe dönüşecek olan paralel dizilimli kollajen fibrillerden kaynak alan yeni kemiğin oluştuğunu görmüşlerdir.

Panikarovsky ve ark (1982), 41 köpekte mandibular DO esnasında oluşan yeni kemiğin ilk ciddi histolojik incelemesini yapmışlardır. Bu çalışma, yeni kemik oluşumunun histomorfolojik dinamizmi üzerine odaklanmıştır. Kollajen fibrilli distraksiyon aralığının orta bölgesinde fibröz bir ara bölge gözlenmiştir. Kapiller damarların distraksiyon yönüne paralel yerleştiği gözlenmiştir. Uzunlamasına yerleşmiş trabeküllerin içindeki yeni oluşan

kemiğin mandibular segmentlerden kaynak alıp fibröz alana doğru ilerlediğini ve kademeli mandibular distraksiyon esnasında oluşan yeni kemiğin mekanizmasının uzun kemiklerdekine benzer olduğunu belirtmişlerdir.

Karp ve ark (1990,1992), yeni oluşan kemiğin farklı aşamalarını ayrıntılarıyla inceleyen benzer bir deneysel çalışma daha yapmışlardır. Periostun korunmasıyla yapılan kortikotomiden 10 gün sonra, 20 gün boyunca günde 1 mm tek taraflı mandibular distraksiyon uygulamışlardır. Histomorfolojik olarak, distraksiyon aralığı dört bölge olarak ifade edilmiştir. Bu bölgeleri merkezde fibröz alan, kemik oluşum alanı, kemiğin yeniden şekillendiği bir alan ve olgun kemik alanı olarak tanımlamışlardır. Ayrıca bu yeni kemik alanının opere edilmeyen tarafla kıyaslandığında daha geniş vasküler kanallı olduğunu belirtmişlerdir.

Genel olarak bu çalışmalar, kraniofasiyal bölgede uygulanan DO tekniklerinin klinik adaptasyonu için bilimsel bir temel sağlamıştır. Bu çalışmalardan sonra kademeli mandibular uzatma ve genişletme için DO yöntemi klinik olarak büyük dikkat çekmiştir.

McCarthy ve ark (1992), konjenital kraniofasiyal anomalili dört çocuğun vaka raporlarını sunarak DO tekniğinin ilk klinik uygulamasını göstermişlerdir. Araştırmacılar distraksiyon sahasında 4 ayrı bölge tanımlamışlardır. Bu bölgeler; başlangıçta fibröz dokudan oluşan merkezi bölge, gerginleşen kemik formasyonu boyunca kemik dokusu, osteoblast ve osteoklastlar tarafından oluşturulan kemik tabakalarının olduğu yerde yeniden şekillenme sahası ve bir yıl veya daha fazla sürede yeniden şekillenen olgun kemik sahası .

Alkan ve ark (2006), DO ile mandibular genişletmeyi takiben, ısırma kuvvetlerindeki ve oklüzal temas yüzeylerindeki değişiklikleri inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Yatay yönde mandibular yetmezliği olan onbeş hastaya ortalama 8 mm distraksiyon uygulamışlardır. Isırma kuvveti ile oklüzal tamas

yüzey ölçümlerini ameliyattan hemen önce, ameliyattan bir hafta sonra, bir ay sonra, 3 ay sonra, 6 ay sonra ve 1 yıl sonra yapmışlardır. Araştırmacılar ameliyattan bir ay sonra ısırma kuvvetlerinin ve oklüzal temas yüzeylerinin en az olduğunu, ameliyattan 6 ay sonra ameliyattan önceki değerlere ulaştığını ve ameliyattan 12 ay sonra ameliyattan önceki değerlerden biraz yüksek olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonunda, yatay yönde mandibular yetmezliği olan hastalarda mandibular simfiz distraksiyon osteogenezisinin ısırma kuvvetlerini ve oklüzal temas yüzeylerini istatistiksel olarak önemli olmasa da arttırdığını belirtmişlerdir.

2.8. Maksiller Distraksiyon Osteogenezisi

Block ve Blister (1994), 3 köpek üzerinde yaptıkları bir hayvan çalışmasında, maksiller anterior bölgeyi distrakte ederek yumuşak doku reaksiyonları görülmeden ilerleme meydana geldiğini görmüşlerdir. Distraksiyon aralığının her iki tarafındaki diş tüberkülleri arasındaki mesafenin operasyondan önceki mesafeden 10 mm daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Altıncı haftada anterior maksillanın posterior maksillayla tamamen birleşmiş olduğu ve 12. haftada yapılan histolojik incelemede damak ve krestal alveoler kemikteki distraksiyon aralığında bazı bölgelerde lameller kemik bazı bölgelerde örgülü kemik oluştuğu izlenmiştir.

Insanlarda bu yaklaşım sınırlı olmasına rağmen, Polley ve Figueroa (1997) tarafından bir teknik tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada, sabit intraoral splinte bağlanan eksternal, ayarlanabilen ve rijit bir distraksiyon aygıtı kullanmışlardır. Yüksek bir transvers lefort I ostetomi yapılıp aktif distraksiyon ameliyatın 3. ve 4. gününde başlatılmıştır. Istenilen miktarda maksiller hareket sağlanıncaya kadar günde 1 mm distraksiyon devam ettirilmiştir.

Gaggl ve ark (2005), tamamen dişsiz maksiller retrognatizme sahip altı hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada, hastaların anterior maksillasını öne alacak şekilde distrakte edip bununla birlikte posterior maksiller bölgeye sinüs yükseltme işlemi yapmışlardır. Sinüs yükseltme işlemiyle beraber posterior bölgeye implantlar yerleştirilmiştir. Maksillanın anterior bölgesine segmental split osteotomi yapıldıktan sonra iki adet miniplak distraktör yerleştirilerek DO işlemi gerçekleştirilmiştir. Pekiştirme süresinden 12 hafta sonra distraksiyon aygıtı çıkarılarak bu bölgeye implantlar yerleştirilmiştir. Araştırmacılar çalışma sonunda bütün implantlara sabit protez yapıldığını ve hiçbir implantın kaybedilmediğini belirtmişlerdir.

Bu araştırmaların dışında maksiller bölgede, dudak, damak ve alveol yarıklarında rijit eksternal distraksiyon aygıtının kullanıldığı (Harada ve ark 2004), maksiller hipoplazili hastalarda eksternal ve internal aygıtların kıyaslandığı (Kuroda ve ark 2005) ve intraoral aygıtlar kullanılarak maksiller yetmezliklerin tedavisinin uzun dönem sonuçlarının kıyaslandığı (Rachmiel ve ark 2005) bazı çalışmalar yapılmıştır.

2.9. Alveoler Distraksiyon

Alveoler deformiteler ve defektler, damak yarığı ve konjenital diş eksikliği gibi gelişimsel anomaliler, maksillofasiyal travmalar ve periodontal hastalık gibi çeşitli patolojik durumlarla ilişkili olarak meydana gelebilirler.

Bu deformiteler farklı gerft tipleri kullanılarak yapılan ogmentasyon ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu gibi çeşitli cerrahi tekniklerle tedavi edilebilir.

Bu tedavi seçeneklerinin her biri sınırlı olup otojen kemik grefti normal kemik ile komşu dişlerde rezorbsiyon ve üzerini örten yumuşak dokularda açıklık gibi komplikasyonlara yol açabilir. Hidroksiapatit gibi materyalleri kullanarak alloplastik rekonstrüksiyon, implant yerleştirilmesinde zorluğa neden olabilir. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda üretilen kemiğin miktarı da sınırlıdır. Alveoler yapıların

osteodistraksiyonu alternatif olarak bu defektlerin rekonstrüksiyonunu başarıyla gerçekleştirir (Chin ve Toth 1997).

Chin ve Toth (1996), 17 yaşında bir kıza vertikal mandibular alveoler distraksiyonun ilk uygulamasını rapor etmişlerdir. Bu hasta da travmanın sebep olduğu alveol kemik defekti, DO ile yeni kemik elde edilerek başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir. Alveol segment osteotomize edilip, 5 günlük latent dönemden sonra günde 1 mm toplam 9 gün vertikal olarak distrakte edilmiş ve bu bölge 6 hafta sonra yeniden açılıp rekonstrükte alveolün içine osteoentegre implantlar yerleştirilmiştir.

Alveoler kret ogmentasyonu için DO'nun etkinliği dört köpek üzerinde deneyle çalışılmıştır (Block ve ark 1996). Alveol kret segmental osteotomiyi takiben 7 günlük latent dönemden sonra 10 gün boyunca günde iki kez 0.5 mm olmak üzere vertikal olarak distrakte edilmiş ve distraksiyon aygıtı 10 hafta sabit tutulmuştur. Vertikal yükseltme oranının ortalama 8.85 mm olduğu belirtilmiştir. Yeni oluşan kemiğin histolojik muayenesinde, distraksiyonun vertikal vektörüne paralel beslenme kanalları görülmüş ve kemik depolamasının aktif oluşumunun endosteal kemik yüzeylerinde uzanan çok sayıda osteoblastlar tarafından indükte edildiği gözlenmiştir.

Uçkan ve ark (2002a), alveoler distraksiyonun intraoperatif ve postoperatif komplikasyonları ile birlikte sonuçlarını değerlendiren bir çalışma yapmışlardır. Alveoler kret yetersizliği olan 10 hastaya kemik destekli distraksiyon aygıtları kullanarak alveoler DO uygulamışlardır. Hastaların tümünde ortalama 8.7 mm distraksiyon miktarı elde etmişlerdir. Bu çalışmada distrakte segmentin linguale ve palatinale deplasmanı, çok ince alveol kemiğinde distrakte segmentin kırılması ve kanama gibi intraoperatif ve postoperatif komplikasyonlar ortaya çıkmış olup, bu komplikasyonların çoğunun küçük olduğu ve basitçe üstesinden gelinebileceği belirtilmiştir. Ayrıca distrakte edilen alveol kemiğindeki implant başarı oranının %85 olduğu görülmüştür.

Dolanmaz ve ark (2003), tek taraflı ve çift taraflı alveol yarığı olan beş hastaya alveoler DO uygulamışlardır. Ortalama 8 mm distraksiyon miktarı elde edilmiş olup alveol yarığın burun yönündeki kemik defekti tamamen kapatılamamıştır. Araştırmacılar bu çalışma sonunda, diş destekli distraksiyon aygıtı kullanıldığında kemik grefti kullanmadan alveol yarığının onarılmasının mümkün olmadığını belirtmişlerdir.

Alkan ve ark (2005), bir vakanın kemik grefti ile onardıkları mandibulasına uyguladıkları DO işlemini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar santral dev hücreli granulomayı çıkarttıktan sonra mandibulada oluşan aşırı kemik kaybını iliak kemik grefti ile onarmışlardır. Dört yıl sonra, yeterli mandibular kret yüksekliği elde etmek için grefte edilen mandibulaya vertikal yönde yaklaşık 13 mm DO uygulamışlardır. Araştırmacılar bu çalışma sonunda, mandibula kemik yüksekliğini arttırmak için tedavi gören hastalarda tatmin etmeyen sonuçların alındığı durumlarda ikinci tedavi olarak DO'nun uygun ve güvenli olduğunu belirtmişlerdir.

Chiapasco ve ark (2006), dişsiz mandibular kretlerdeki vertikal yöndeki yetersizliğin düzeltilmesinde alveoler distraksiyonun klinik sonuçlarını, distrakte bölgeye yerleştirilen dental implantların klinik sonuçlarını ve distrakte alandaki yeni oluşan kemiğin kalitesi ile miktarını değerlendiren bir araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada dişsiz mandibulalarında yetersiz alveol kemiğine sahip 7 hasta intraoral alveoler distraksiyon aygıtı ile tedavi edilmiştir. Pekiştirme süresinden yaklaşık üç ay sonra distrakte bölgelere 20 adet implant yerleştirilmiştir. İmplantların yerleştirilmesi esnasında, histolojik ve histomorfometrik analiz için kemik biyopsileri alınmıştır. Distraksiyon sonrasında ortalama kazanılan kemik miktarının 7 mm olduğu görülmüştür. İmplantların başarı oranının %100 olduğu buna karşın protez yüklemesinden yaklaşık iki yıl sonra implantların toplam başarı oranının %95 olduğu tespit edilmiştir. Histolojik incelemede

distrakte bölgenin, kemik iliği alanları ve paralel fibrilli kemikten oluşan örgülü kemikten meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca distrakte bölgedeki yeni oluşan kemik alanlarının distraksiyon sahasının %21.6 ile %57.8 arasında olduğu gözlenmiştir.

2.10. Distraksiyon Osteogenezisi ile Hızlı Ortodontik Diş Hareketi

DO'daki yeni biyolojik gelişmeler, deformite tedavisinden başka diğer alanlarda da osteodistraksiyonun kullanımının olabileceğini göstermiştir. Liou ve Huang (1998), DO'ya ilgi uyandıracak yeni bir tedavi yöntemini tanıtmışlardır. Premolar diş çekimini takiben interdental septumun çıkartılmasıyla, kanin dişi ve onla ilgili periodontal ligamenti distale doğru yaklaşık 1 haftada distrakte etmişlerdir. Bu yöntemle dental retraksiyon için gerekli zamanın önemli miktarda azaldığını ve yeni kemiğin hemen oluştuğunu belirtmişlerdir.

Kişnişci ve ark (2002), onbir hasta üzerinde dentoalveoler DO uygulayarak ortodontik tedavi süresini azaltan bir çalışma yapmışlardır. Ortodontik tedavi altındaki hastaların tümüne bilateral birinci premolar dişlerinin çekiminden sonra kanin dişlerinin etrafından bir osteotomi yapılarak bilateral kanin dişi distalizasyonu planlanmıştır. Birinci premolar dişi çekildikten sonra bu dişin bukkal kemiği dikkatlice çıkartılmıştır. Özel olarak üretilmiş distraksiyon aygıtı birinci molar dişe ve kanin dişine simante edilmiştir. Distraksiyon aynı gün başlatılıp, 12 saatte bir günde toplam 0.8 mm olacak şekilde köpek dişinin yeterli hareketi sağlanana kadar devam ettirilmiştir. Aygıt çıkartıldıktan sonra sabit ortodontik tedavi devam ettirilmiştir. Araştırmacılar hiçbir hastanın ikinci premolar diş ile birinci molar dişinde ankraj kaybı, kök rezorpsiyonu, ankiloz, vitalite kaybı belirlememişlerdir.

İşeri ve ark (2005), on hasta üzerinde, dentofasiyal yapılar üzerine dentoalveoler distraksiyonun etkisini inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Hastaların birinci premolar dişleri çekildikten sonra dentoalveoler distraksiyon cerrahi uygulaması yapılmış ve özel olarak üretilmiş intraoral diş destekli distraksiyon aygıtı yerleştirilmiştir. Hastaların köpek

dişleri günde 0.8 mm oranında 8-14 gün arasında çekim bölgesine hızlı olarak hareket ettirilmiştir. Köpek dişlerinin tam olarak distalizasyonu ortalama 10.5 (±2.01) günde sağlanmıştır. Ankraj dişler çok az ankraj kaybı ile distalizasyon kuvvetlerine dayanmıştır. Hastalarda dentoalveoler distraksiyonun sonunda, köpek dişinin ortalama eğim değişikliği 13.15º±·4.65º olup, anterior yüz yüksekliği ve mandibular plan açısı artmış bununla birlikte overjet azalmıştır. Klinik ve radyolojik olarak, kök kırığı, kök rezorpsiyonu, ankiloz, periodontal problemler, yumuşak doku yırtılması gibi komplikasyonlara rastlanılmamıştır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonunda, dentoalveoler distraksiyon tekniğinin ortodontik tedavi süresini yaklaşık %50 oranında azalttığını ve çevreleyen dokulara istenmeyen etkilerinin olmadığını belirtmişlerdir.

2.11. Mandibular Distraksiyon Aygıtları

Genelde mandibular distraksiyon aygıtları ekstraoral ve intraoral olmak üzere iki gruba ayrılır. Uzatmanın yönüne gore tek yönlü, iki yönlü ve çok yönlü olmak üzere üç tip ekstraoral distraksiyon aygıtı vardır. İntraoral distraksiyon aygıtları da kemik destekli, diş destekli ve diş-kemik destekli (hibrid) olmak üzere üç çeşittir. Bir düz intraoral distraktör ortodontik genişletme aygıtına benzemekle birlikte intraoral tutunma metoduyla kullanılır (Samchukov ve ark 1998b). İskeletsel deformitenin tipi ve hastanın ihtiyacı düşünülerek aygıtın seçilmesi çok önemlidir.

Mc Carthy 1989' da ilk defa mandibular uzatmada bir eksternal fiksasyon aygıtını klinik olarak uygulamıştır. Yaş ortalaması 6.5 olan dört hastada, 18-24 mm mandibular distraksiyon yapmış ve bu hastaları klinik olarak 18-20 ay takip etmiştir. Hiçbir komplikasyona rastlamamıştır (McCarthy ve ark 1992).

Molina ve Ortiz Monasterio ilk kez mandibulada iki yönlü osteodistraksiyon kullanmışlardır. 87 vakaya unilateral ve 19 vakaya bilateral olmak üzere toplam 106 hastayı DO ile tedavi etmişlerdir. Korpusun boyu ve ramusun yüksekliği hipoplastik olan

hastalarda biri vertikal diğeri horizontal olmak üzere iki kortikotomiyi içeren modifiye bir teknik kullanmışlardır. Pinleri iki yönlü distraksiyon sağlayacak şekilde yerleştirmişlerdir. Unilateral vakalarda 19 aylık ve bilateral vakalarda 12 aylık takiplerde nüks gözlenmemiştir (Molina ve Ortiz Monasterio 1995).

Ortodontik aygıtların modifikasyonu ve ekstraoral aygıtların küçültülmesi yönünde çalışmalarla introral mandibular distraksiyon aygıtları geliştirilmiştir. Diner ve ark (1996), ilk kez ekstraoral distraksiyon aygıtlarını küçülterek oluşturdukları intraoral distraktörleri mandibulayı uzatmak için kullanmışlardır.

Guerrero (1990), ilk kez mandibular simfiz osteodistraksiyonu için intraoral diş destekli aygıt kullanmıştır. Araştırmacı mandibular transvers bozukluğu olan 11 hastada 4-7 mm arasında intraoral mandibular genişletme yapıp bu tekniğin simfiz, alveol kemiği ve periodontal ligamentler üzerinde biyolojik etkilere sahip olduğunu belirtmiştir. Bell ve ark (1997) tarafından bu tekniğin histolojik incelemesi yapılmış ve osteotominin her iki tarafındaki alveol kemiğinin korunmasının interdental bölgedeki rejenerasyon için kritik öneme sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca alveol kemiğindeki kemik rejenerasyonunun diğer kemikler ile benzer olduğu belirtilmiştir.

2.12. Distraksiyon Osteogenezisinin Biyolojik Temelleri

DO, kemik biyolojisinde en gizemli olaylardan biri olarak kalmaya devam etmektedir. DO esnasında, düzenli aralıklarla uygulanan az şiddette çekim kuvveti ile mekanik olarak meydana gelen fonksiyonel yükler neticesinde yeni kemik oluşmaktadır. Yeni kemiğin oluşumunda gerçekleşen olaylar, normal iskelet yapılarda oluşanlardan farklıdır. DO tekniğinin başarıyla uygulanması, hem biyolojik hem de biyomekanik faktörlere bağlıdır (Waanders ve ark 1992).

Periosteal ve endosteal kan damarlarıyla beraber osteojenik dokuların maksimum korunmasıyla nazik bir osteotomi yapılması, kırık kallusun gelişmesine izin veren yeterli

bir süre (latent dönem) beklenilmesi, ideal oran ve ritimde distraksiyon yapılması ve aşırı fonksiyonel yüklemeden önce oluşan kemiğin yeniden şekillenmesi için yeterli bir zaman beklenilmesi temel biyolojik faktörlerdendir. Fiksatörle ilgili faktörler, doku ile ilgili faktörler, distraksiyon vektörünün ayarlanması ve distraksiyon aygıtının uyumlandırılması ise biyomekanik faktörlerdendir (Waanders ve ark 1992).

2.13. Distraksiyon Osteogenezisinde Yeni Kemik Oluşması

DO, nazik bir osteotomi ile ayrılan iki kemik segmentinin uçları arasında tamir edici bir kallusun gelişimiyle başlar. Kallus oluştuktan sonra, distraksiyon kuvvetleri bu kemik segmentlere uygulanmakta ve bu segmentleri çekmektedir. Kemik segmentlerinin kademeli olarak ayrılması gerilim altındaki kallusu bu bölgeye yerleştirmektedir. Bundan sonra, bu bölgede oluşan yeni doku distraksiyon vektörüne paralel olarak düzene girmektedir. İstenen kemik uzunluğu sağlandıktan sonra distraksiyon kuvvetleri sona erer. Sonra yeni oluşan kemik olgunlaşma dönemine girer ve önceki ev sahibi kemikten farksız olarak yeniden şekillenir.

2.14. Distraksiyon Osteogenezisinin Dönemleri

Klinik olarak, DO ardışık 5 dönemden oluşur:

1.Osteotomi (kemiğin iki segmente ayrıldığı dönem)

2.Latent dönem (kemiklerin ayrılması ile distraksiyon kuvvetlerinin başlamasına kadar geçen süre)

3.Distraksiyon dönemi (kademeli çekme kuvvetlerinin uygulandığı ve yeni oluşan kemiğin şekillendiği dönem)

4.Pekiştirme dönemi (çekme kuvvetlerinin bittiği ve yeni oluşan kemiğin olgunlaşması ile kortikalleşmesine izin veren dönem)

5.Yeniden şekillenme (ilk fonksiyonel yüklemenin başlaması ile yeni oluşan kemiğin tamamen şekillenmesine kadar geçen süre) (Gantous ve ark 1994, Murray ve Fitch 1996).

2.14.1. Osteotomi

Osteotomi, kırık olarak bilinen mekanik bütünlüğün ve devamlılığın kaybı ile sonuçlanan bir kemiği iki segmente bölmeye denir. İskeletsel segmentin devamlılığının bozulması kırık iyileşmesi olarak adlandırılan kemik tamirini tetikler. Bu kemik tamiri başladığı anda osteoprogenitör hücreler buraya toplanır, hücresel değişimler (osteoindüksiyon) olur ve iyileşme için bir çevre (osteokondüksiyon) meydana gelir. Sonuçta kırık kenarlarında ve kırık aralığında tamir kallus formasyonu oluşmakta ve kırık aralığındaki olgunlaşmamış dokular farklılaşarak mekanik olarak daha dirençli dokulara (lameller kemik) dönüşür. Sonuçta bu dokular katı intersellüler matriks şekliyle karakterizedir (Giulnazarova ve ark 1991, Schenk ve Gachter 1994).

Geleneksel olarak kırık iyileşmesi 6 aşamadan oluşmaktadır (Brighton 1984, Frost 1989) :

1. Etki
2. İndüksiyon
3 . İnflamasyon
4. Yumuşak kallus
5. Sert kallus
6. Yeniden şekilllenme (Remodeling).

Etki aşaması, stres anında oluşur ve enerji dağılımı tamamlanınca sona erer. Bu enerji kemik tarafından kırık oluşuncaya kadar absorbe edilir.

İndüksiyon aşamasında, tamir oluşumu için ihtiyaç duyulan hücrelerin ayarlanması sağlanır. Burada indüktör görevini muhtemelen hücre ölüm ürünleri, oksijen oranı, elektrik potansiyeli, non-kollajen proteinler görür.

2.14.2. Latent dönem

Latent dönem, kemiğin ayrılmasıyla çekme kuvvetlerinin başlayacağı zamana kadar geçen süredir. Bu dönem, tamir kallus formasyonunun oluşması için gerekli olan zamandır. Bu latent dönemde oluşan ardışık olaylar kırık iyileşmesindekine benzer. Kemiği iki segmente ayıran cerrahiyi takiben olaylar başlar (Frost 1989, Landry ve ark 1996).

Başlangıçta vasküler bölünmenin sonucunda kemik segmentlerin arasında ve etrafında hematom oluşur. Bu hematom pıhtıya dönüşür ve kırık segmentlerin uçlarında kemik nekrozları meydana gelir. Kan desteğinin sağlanması için damar oluşturucu elementler ve kapillerler içeri doğru göç eder. Aynı zamanda büyük bir hücresel proliferasyon bu alana doğru ilerler (McKibbin 1978).

Bu kırık iyileşme aşaması (inflamasyon aşaması), pıhtının inflamatuar hücreler, fibroblastlar, kollajen ve kapillerler içeren granulasyon dokusuyla yer değiştirdiği 1-3 gün sonunda biter (Brighton 1984, Hulth 1989, Andrew ve ark 1994).

Yumuşak kallus aşaması, yaklaşık 3 haftada sona erer. Bu dönem kırık kallusların içerisine kapillerlerin devamlı büyümesi ile dikkat çekicidir. Kırıktan sonraki 5. günde, büyüyen kapiller kıvrımların küçük bir ağı kırık çizgisine komşu hem proksimal hem de distal segmentlerdeki medullar kanalda oluşur (Irianov 1996a, 1996c). Az farklılaşmış serbest osteojenik hücreler yeni oluşmuş kapillerlerin uçlarında lokalize olur. Yumuşak kallus aşamasında granulasyon dokusu fibroblastlar tarafından fibröz dokuya dönüştürülür (Postacchini ve ark 1995). Aynı zamanda kartilaj da granulasyon dokusunun yerini alır. Bu merkezi bölgeden ziyade segmentler arasındaki aralığın periferine doğru daha fazla olur. Kemik segmentler arasındaki kartilaj miktarı değişebilir. Eğer kallus mevcut olan kandan

oluşursa, kartilaj düşük oksijen ihtiyacı olan ve kan desteği sağlanana kadar kırık bölgesinde geçici köprü oluşturan uygun bir materyaldir (Brighton 1984).

Kallus formasyonu, çoğunlukla yeni ayrılmış kemik segmentlerden iyileşmeyi aktive eden faktörlerin etkisi ile periosteum ve endosteumdan kaynak alan belirli osteoprogenitör hücrelerin bir cevabıdır. Kallus formasyonu kemik segmentlerin bütün yüzeyine ve kenarlarına doğru büyüyerek mekanik olarak önemli bir rol oynar. Histolojik olarak, kallus formasyonu ara bölgenin iyileşme dokularının ve apozisyonel kemik dokusunun karışımından oluşur. Kallusun tamamen oluştuğu bölgeler (kırık segmentlerin iç ve dış yüzeyleri) depolanacak yeni kemiğe zemin hazırlar (Schenk ve Hunziker 1994).

2.14.3. Distraksiyon dönemi

Distraksiyon dönemi, osteotomize kemik segmentlere çekme kuvvetlerinin uygulandığı süreç olarak adlandırılır. Kemik segmentler kademeli olarak ayrılır ve artan bu kemik aralığında yeni kemik oluşmaya başlar.

Normal kırık iyileşmesi esnasında, yumuşak kallusun fibrokartilaj dokusu osteoblastlar tarafından fiber kemikten oluşan sert kallusa dönüştürülür. Kartilaj kalsifiye olur ve osteoblastlar kalsifiye kartilaj matriksin üzerinde yeni kemiği hazırlar. Sert kallus aşaması çoğu kırık için 3-4 ayda sona erer. Fiber kemik yavaşca lameller kemiğe dönünce ve medullar kanal tekrar oluşunca yeniden şekillenme aşaması başlar. Yeniden şekillenme aşaması, medullar kanalın oluşmasını içeren kemiğin tamamen normale dönmesiyle sona erer (Brighton 1984).

DO sırasında normal kemik iyileşmesinden farklı olarak yumuşak kallusa düzenli çekim kuvveti uygulanmaktadır. Kemik segmentler arasındaki yumuşak kallus dokularına çekme kuvvetlerinin uygulanması süresince dinamik bir mikro çevre oluşmaktadır (Delloye ve ark 1990). Kademeli uzayan dokularda oluşan çekme gerilimi, hücre ve hücre altı birimleri harekete geçirir. Bu değişiklikler büyüme stimüle edici etki ve şekil forme

edici etki olarak tanımlanabilir (Kallio ve ark 1994, Holbein ve ark 1995, Mosheiff ve ark 1996, Asonova 1996).

Çekme kuvvetinin büyüme stimüle edici etkisi, segmentler arasındaki bağlayıcı dokuların biyolojik elementlerini stimüle eder. Bu etkiyle iki önemli yarar sağlar : a) artmış doku oksijenizasyonuyla anjiogenezisin olumlu yönde uzaması b) biyosentetik aktivasyonunun şiddetlenmesiyle fibroblast proliferasyonunun artması.

Çekme kuvvetinin şekil forme etme etkisi, çevresel olarak değişmiş fibroblastların sentezine sebep olur. Bu fibroblast benzeri hücreler hipertrofik görünümlü ara dönem fibroblastlar olarak tanımlanırlar. Aynı zamanda distraksiyondaki bu şekil forme etme etkisi fibroblastları iki uçta kutuplaştırır, fibroblastları uyumlar ve fibroblastların salgıladığı kollajenleri distraksiyon vektörüne paralel uyumlar.

Bu oluşan yeni çevre çekim kuvvetine paralel bir yönde yeni doku formasyonunun oluşmasına katkıda bulunur. Distraksiyon başladığında, yumuşak kallusun fibröz dokusu distraksiyon aksı boyunca uzunlamasına olarak düzenlenir. Kollajen fibriller arasında lokalize olan iğ şeklindeki fibroblast benzeri hücreler aynı zamanda distraksiyon yönü boyunca dizilirler. Bu hücreler segmentler arasındaki dokuların distal ve proksimal kenarlarında fibriller içinde gruplanan kollajen lifleri oluştururlar (Asonova 1996, Aronson ve ark 1989, Aronson 1994).

Distraksiyonun 3. ve 7. günleri arasında, vasküler ağ sadece distraksiyon aralığının merkezine doğru değil aynı zamanda her iki komşu kemik segmentinin medullar kanalından uzayarak fibröz dokular içerisine büyür. Yeni oluşmuş kapiller damarlar distraksiyon aksına ve birbirine paraleldirler (Irianov 1996a, 1996c). Çok sıklıkla yeni oluşan kemiğin içindeki yeni oluşmuş damarlar spiral şeklindedirler ve bir çok sirküler katlantı yapmaktadırlar. Burada oluşan damarlardaki büyüme oranları distraksiyon oranından çok yüksektir ve normal kırık iyileşmesine göre on kat daha hızlı büyürler.

Kapiller damarların uç kısımları aktif olarak fibröz dokulara yayılmaktadırlar ve bu bölgelere fibroblastlara, kondroblastlara ve osteoblastlara dönüşmek üzere az farklılaşmış hücreleri getirmektedirler (Irianov 1996b).

Distraksiyonun 2. haftasında, primer trabeküller şekillenmeye başlar (Maffuli 1996). Osteoid oluşturan osteoblastlar kollajen fibriller boyunca lokalize olur ve osteoid dokuları kollajen fibriller üzerine yerleştirir. Sonunda kollajen ve osteoidin dairesel birikmesiyle kemik katmanları kademeli olarak genişler (Aronson ve ark 1989). Osteogenezis önceden var olan kemik duvarlarında başlar ve distraksiyon aralığının merkezine doğru devam eder. İkinci haftanın sonunda, osteoidler mineralize olmaya başlar (Schenk ve Gachter 1994). İşte bu dönemde, distraksiyon ile oluşan yeni kemiğin bölgesel olarak kendine has bir yapısı vardır. Zayıf mineralize olmuş radyolusent fibröz ara bölge gerilim kuvvetinin etkisinin maksimum olduğu distraksiyon aralığının ortasında yer alır (Yasui ve ark 1993). Bu alanda iyi organize olmuş, uzunlamasına sıralı, paralel demetli kollajenle birlikte iğ şekilli fibroblast benzeri hücreler ve farklılaşmamış mezenşimal hücreler matriks boyunca yerleşmişlerdir. Bu ara bölge fibroblast proliferasyonu ve fibröz doku formasyonunun merkezi olarak fonksiyon görmektedir. Bu ara bölgedeki fibröz ve kartilaj doku karışımı distraksiyon sırasında kemik formasyonunun oluşmasında hem membranöz hem de endokondral kemikleşmenin rol oynadığını gösterir (Waanders ve ark 1992). Fibröz ara bölgenin periferinde longitudinal sıralanmış osteoblastlarla kaplanmış silindirik primer trabeküllü iki alan vardır ve bu alanlar birbirine doğru büyümektedirler (Schenk ve Gachter 1994, İrianov 1996b).

Gerilim vektörü boyunca kemik oluşumu distraksiyon dönemi boyunca açık kalan primer trabeküllerin büyüyen uçlarında devam etmektedir. Bu yüzden bu bölgeler, distraksiyonda yeni oluşan kemiğin büyüme alanları olarak fonksiyon görmekte ve uzama süreci boyunca aktif osteogenezisi sürdürmektedirler. Distraksiyon ile yeni oluşan kemiğin

içindeki yeni oluşmuş dokuların alan dağılımı distraksiyon döneminin sonuna kadar devam eder. Ek olarak, primer trabekülün yeniden şekillendiği iki yeni bölge, yeni oluşan kemik ile kemik segmentlerinin bağlantı yerleridir (Aronson ve ark 1990).

2.14.4. Pekiştirme dönemi

Pekiştirme dönemi çekme kuvvetlerinin bittiği ve distraksiyon aletinin çıkarıldığı zamana kadar geçen süredir. Bu dönem, distraksiyon ile oluşan yeni kemiğin tamamen mineralize olması için gerekli zamanı ifade eder. Distraksiyon bittikten sonra fibröz ara bölge düzenli olarak kemikleşir ve örgülü kemik tamamen bu aralığı doldurur. Distraksiyonla oluşan yeni kemik çoğunlukla membranöz kemikleşme olmasına rağmen, endokondral kemikleşme olabileceğini de destekleyen bazı kartilaj alanlar görülebilir. Ek olarak, mineralize matriks ile çevrili küçük kondrosit bölgeler kartilaj formunda üçüncü bir kemik oluşumunun (transkondroid) olabileceğini göstermiştir (Yasui ve ark 1997). Bu kartilaj kemik oluşumu düşük oksijen miktarından olabilir. Fakat bu geleneksel endokondral yoldan ziyade doğrudan kemikleşir. Oluşan yeni kemiğin olgunlaşması sonucu, primer trabekül alanı önemli miktarda azalır ve sonra tamamen rezorbe olur.

Kraniofasiyal kemik iyileşmesinin intramembranöz kemikleşmeyle olduğu konusunda görüş birliği vardır. Çünkü intramembranöz kemiklerde fibröz ara bölgede kartilaja rastlanmamıştır. Intramembranöz kemiklerdeki küçük kartilaj alanları, distraktörün küçük hareketlerinden veya azalmış vasküler destekten dolayı yetersiz oksijen seviyesinden kaynaklanabilir (Cope ve Samchukov 2000).

2.14.5. Yeniden şekillenme dönemi

Yeniden şekillenme dönemi, yeni oluşan kemiğin şekillenmesini tamamlamak için tam fonksiyonel yüklemelerin yapıldığı dönemdir. Bu dönemde, başlangıçta oluşmuş kemik yapısı paralel fibrilli ve lameller kemikle iyice direnç kazanır. Hem kortikal kemik hem de kemik iliği kavitesi tamamen oluşur. Havers kanallarının meydana gelmesi kortikal

kemik ve normal kemik yapısının son safhasını oluşturur (Tajana ve ark 1989, Saleh ve ark 1993). Yeni oluşan kemik dokusunun tamamen önceden var olan kemik dokusu gibi olabilmesi için 1 yıl veya daha fazla sürenin geçmesi gerekir (Tajana ve ark 1989, Saleh ve ark 1993, Schenk ve Gachter 1994).

Cope ve ark (2000), 17 adet iskeletsel olarak olgun köpeğe bilateral mandibular distraksiyon uygulayarak yeni kemiğin oluşumunu ve yeniden şekillenmesini incelemişlerdir. Distraksiyon tamamlandıktan sonra hayvanlara 0, 2, 4, 6 ve 8 hafta gibi çeşitli pekiştirme süresi uygulayarak oluşan yeni kemiği histolojik ve histomorfometrik olarak incelemişlerdir. Araştırmacılar, mineral birikmesinin aktivasyonun sonundan pekiştirmenin 4. haftasına kadar devam ettiğini, 6. haftaya kadar sabit kaldığını ve bunu takip eden 2 haftada çok az düşmüş olduğunu gözleyip bu düşüş döneminin kemiğin yeniden şekillenme dönemi olduğunu belirtmişlerdir.

2.15. Distraksiyon Osteogenezisinde Hayvan Deneylerinin Avantajları

Farklı havyan modellerinde deneysel çalışmalar, kraniomaksillofasiyal DO'nun biyolojik ile biyomekanik prensiplerini daha iyi anlamak ve insan kraniofasiyal iskeletine DO uygulamasının temellerini oluşturmak için yapılmıştır (Hu ve ark 2003, Yates ve ark 2002, Marukawa ve ark 2005).

Fare ve tavşan gibi hayvan modelleri, DO tekniğinin yapılabilmesi (distraksiyon osteogenezisi ve distraksiyon histogenezisi) ve DO'dan sonra fonksiyonel kraniofasiyal iskeletsel adaptasyonun değerlendirilmesi için uygundur. Çünkü memeli olarak insan gibi yumuşak ve sert doku cevabı verirler. Fareler ve tavşanlar filogenetik olarak yakın olmalarından dolayı bazı önemli avantajları vardır:

1) Barınma ve beslenme maliyetleri düşüktür.
2) Distraksiyonun aktif döneminde sedasyona gerek kalmadan kolay müdahale edilebilir.

Bundan dolayı, ileriki yıllarda deneysel çalışmalarda fare ve tavşan gibi hayvan modellerinin kullanılması, özellikle mandibulada kraniofasiyal DO'ya aracı olan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için çok uygundur (Swennen ve ark 2002).

2.16. Yeni Kemiğin Oluşumunu Hızlandırmak İçin Yapılan Deneysel Çalışmalar

Yeni kemiğin oluşmasını ve olgunlaşmasını hızlandırmak ve böylece tedavi süresini kısaltmak için büyüme faktörleri (Okazaki ve ark 1999), hormonlar (Raschke ve ark 1999), bifosfonatların uygulanması (Little ve ark 2001, Pampu 2005), ultrason (Sato ve ark 1999), demineralize kemik matriksi (Hagino ve Hamada 1999), kalsiyum sülfat (Al Ruhaimi 2001b) ve elektrofizyolojik aletlerin (Danis 2001) kullanılması gibi çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar osteoblast ve endotelyal progenitör hücreler gibi kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerinin transplantasyonunun anjiogenezis ve mineralizasyonu arttırmak için kullanılabileceğini göstermiştir (Kitoh ve ark 2004).

Tsubota ve ark (1999), tavşan tibia periostundan elde ettikleri osteoblast benzeri hücreleri distraksiyon tamamlandıktan hemen sonra distrakte kallusun merkezine transplante etmişler ve distrakte kallusun olgunlaşmasının hızlandığını rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar distrakte kallusun merkezinde transaksiyal bölge oranının ve kemik mineral yoğunluğunun kontrol grubuna göre önemli miktarda yüksek olduğunu ve mekanik olarak transplante gruptaki kallusun daha dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir.

Hagino ve Hamada (1999), demineralize kemik matriks greftinin günlük 2-3 mm distraksiyon oranlarında bile kemik iyileşmesini normalden çok hızlı ve tatminkar bir biçimde arttırdığını rapor etmişlerdir. Benzer bir çalışmada, yeni distrakte kemiğe uygulanan rezorbe olabilen kalsiyum sülfat materyalinin osteogenezisi ve pekiştirmenin hızlandırdığı belirtilmiştir (Al Ruhaimi 2001b).

Pamidronat (Little ve ark 2001a) ve zoledronik asit (Williams ve ark 2001) gibi bifosfonatların uygulanması, yeni oluşan kemiğin mineral yoğunluğunu ve mineral içeriğini artırarak mekanik yapısını güçlendirmiştir. Little ve ark (2001), pamidronatın tavşanlarda yeni oluşan kemikte osteoblastik yoğunlaşma ile birlikte mineralizasyonu arttırarak belirgin şekilde pozitif etki sağladığını ve pin çevresindeki kemik oluşumunda artış ile birlikte yeni oluşan kemiğe komşu kemiklerde kortikal genişlikte bir artış meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca pamidronat eksternal fiksatör kullanıldığında uzatma ile ilgili normal sayılan osteoporozisi azaltıp yeni oluşan kemiğin yoğunluğunu ve miktarını arttırmıştır.

Pampu (2005), 18 adet tavşan üzerinde yaptığı bir çalışmada, mandibulanın DO ile uzatılması sırasında sistemik olarak uygulanan zoledronik asitin yeni oluşan kemiğin mineralizasyonu ve çevre kemikte gerilime bağlı oluşan osteoporozis üzerine etkisini densitometrik ve histomorfometrik olarak incelemiştir. Araştırmacı 0.1mg/kg tek doz intraoperatif olarak verilen zolerdonik asitin, pekiştirme süresinin sonunda, hem yeni oluşan kemikte hem de yeni oluşan kemiğin çevresindeki alanlarda mineral yoğunluğunda ve mineral içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükselmeye yol açtığını belirtmiştir. Histomorfometrik incelemede ise hem distrakte alanda hem de pin çevresi alanlarda osteoblast sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa, osteoklast sayısında ise anlamlı bir azalmaya sebep olduğu bununla birlikte distrakte alandaki kıkırdak ve kollajen miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığı belirtilmiştir. Ayrıca yeni oluşan kemik sahasında kemikleşme alanı ile damar ve fibroblast sayılarında da istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber artış olduğu belirtilmiştir.

Rekombinant homolog büyüme hormonunun (Raschke ve ark 1999) ve bir çeşit özel büyüme hormonunun (Bail ve ark 2001,2002) kallusun mikro yapısını değiştirmeden

yeni oluşan kemiğin iyileşmesi üzerine stimüle edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Raschke ve ark (1999), domuzlarda yaptıkları tibial uzatma işleminde (10 günlük dönemde günde 2 mm distraksiyon oranı ve 10 günlük pekiştirme dönemi) günlük 100 µg/kg rekombinant büyüme hormonu kullanmışlardır. Tedavi grubunda kontrol grubuna göre, yeni oluşan kemiğin en son bükülmeye dayandığı kuvvetin %131 oranında ve en son kırılmaya dayandığı kuvvetin %231 oranında daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Diğer taraftan, Yamane ve ark. (1999), tavşanlarda tibial kemiği uzatma modelinde 2-beta-(3-hidroksipropoksi)-1 alfa, 25-dihidroksivitamin D_3 (ED-71)'in etkisini araştırmışlardır. Osteotomiyi takiben, ED-71 haftada iki kez 0.05 µg/kg oranında subkütanöz olarak uygulanmıştır. Araştırmacılar, bu maddenin uzatma işleminin tamamlanmasından hemen sonraki dönemlerde kallus miktarını arttırdığını ve bununda kalın kortikal kemik oluşumuyla sonuçlandığını bulmuşlardır.

Büyüme faktörü kullanımının hızlı gelişmesine rağmen, insanlarda uygulanması hala gelişim aşamasındadır. Bir çok araştırmacı (Okazaki ve ark 1999, Hasse ve ark 2000), DO esnasında rekombinant *basic fibroblast growth factor* (bFGF) kullanarak kemik oluşumunun stimüle olup olmadığını araştırmışlardır. Okazaki ve ark. (1999), tavşanlarda DO esnasında rekombinant insan bFGF (200 µg bFBF 150 µL serum fizyolojik solüsyonunda) kullanarak bu maddenin tek doz lokal enjeksiyonunun etkilerini araştırmışlardır. Distraksiyonun son gününde distrakte kallusun ortasına bFGF enjeksiyonunun distrakte bölgede kemik iyileşmesini arttırdığı gözlenmiştir. Enjeksiyondan 2 hafta sonra erken dönemde, kallusun kemik mineral içeriğinde önemli bir etki gözlemlendiği gibi normal yeniden şekillenme döneminden 5 hafta sonra bu etki iki katına çıkmıştır. Radyasyon alan kemikteki DO'da bFGF uygulamasının yeni kemik oluşumunu arttırdığı belirtilmiştir (Hasse ve ark 2000). Benzer şekilde, eksojen verilen

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) uygulamasının DO'da osteoblastik aktivite üzerine pozitif bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Stewart ve ark (2000), IGF-1 infüzyonunun tavşan mandibulalarında hem günlük 1mm hem de 3 mm distraksiyon oranlarında osteoblastik aktiviteyi önemli miktarda arttırdığını ve hatta daha büyük distraksiyon oranlarında bile kemik birleşmesi ile sonuçlandığını rapor etmişlerdir.

IGF-1 ve bFGF' nin pozitif etkilerine karşın, lokal uygulanan *transforming growth factor beta1* (TGF-β1) yararlı etkiye sahip değildir. Rauch ve ark (2000), tavşan modelinde (latent peryot 7 gün, 3 hafta günde iki kez 0.25 mm distraksiyon oranı) distraksiyonun başlangıç aşamasında, osteotomi sahasına subkütanöz olarak yerleştirilen miniozmotik pompa yoluyla TGF- β1 (0,10,20,ve 40 ng/gün) uyguladıkları çalışmanın sonuçlarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar TGF- β1 tedavisi esnasında distraksiyon aralığında kemik mineral yoğunluğunda ve histolojik olarak kemik miktarında bir artış olmadığını sadece kallus bölgesinde fibröz doku miktarında artış olduğunu belirtmişlerdir. TGF-β1 ile tedavi edilen hayvanlarda tek taraflı gerilimde bozulma için yükleme kuvvetinin daha düşük olduğu görülmüştür. Sciadini ve ark (2000), aynı zamanda tek doz TGF-β1 uygulamasının yeni oluşan kemiğin stabilite ve bütünlüğünü geciktirdiğini gözlemişlerdir.

Gelecek yıllarda gen terapisi, istenen büyüme faktörlerinin ve ekstrasellüler matriks moleküllerinin salınımını değiştirerek fraktür iyileşmesinde olduğu gibi kemik oluşumunu arttıracak yollar sunabilir. Spector ve ark (2000), iyileşen kemik dokularda gen üretimini yönlendirmek için adenovirüsten yararlanan bir metod önermişlerdir. Bununla birlikte, normal kırık tamiri ile DO esnasında, terapötik müdahale için uygun aday genlerin aydınlatılması ve endojen salgılanan büyüme faktörlerinin çeşitlerinin tamamının araştırılması gerekir.

Birçok araştırmacı, ultrason (Sato ve ark 1999) ve elektriksel stimülasyon (Danis 2001 ve Perrien ve ark 2002) uygulamasının DO esnasında yeni kemik oluşumuna etkisini incelemişlerdir. Klinik olarak ileri dönük, gelişigüzel ve çift kör çalışmalar, düşük şiddette ultrason ışınının iyileşme zamanını önemli miktarda azaltmayla birlikte kırık iyileşme hızını uyarıcı etkisinin olduğunu göstermiştir. Kırık iyileşme modellerinde daha önceki yayınlarda gösterildiği gibi, DO esnasında da düşük şiddette ultrason ışınının pozitif etkileri rapor edilmiştir (Sato ve ark 1999, Shimazaki ve ark 2000). Shimazaki ve ark (2000), tavşanlarda DO sırasında, hatta zayıf kallotozisin olduğu durumlarda bile, ultrasonun kemik olgunlaşmasını hızlandırdığını iddia etmişlerdir. Diğer taraftan Hagiwara ve Bell (2000), tavşan mandibulalarında DO esnasında, elektriksel stimülasyonun etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, distraksiyon fazı esnasında elektrot olarak kullanılan iki vidaya direk akım elektriksel uyarı vererek distraksiyondan 10 ve 20 gün sonra yeni kemik oluşumunun kontrol grubuna göre elektriksel uyarı grubunda daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, distraksiyondan 10 ve 20 gün sonra, yeni oluşan kemiğin görüntü analizleri ile kemik mineral yoğunluğu analizleri, stimülasyon grubunda kontrol grubuna göre çok daha fazla yeni kemik oluştuğunu göstermiştir. Araştırmacılar, tavşan modelinde kademeli distraksiyon esnasında, elektriksel stimülasyonun, erken fiksasyon döneminde yeni kemik oluşumunu arttırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca, yeni kemik oluşumuna direk akımın pozitif etkileri olmasına rağmen, kapasite olarak biriktirilmiş elektriksel stimülasyonun negatif etkileri olduğu gösterilmiştir (Pepper ve ark 1996).

İskeletsel hücrelerdeki ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler DO'nun biyolojisinin anlaşılmasına yol açacaktır. Deneysel olarak yapılan ve yapılacak olan bu çalışmalar ile biodüzenleyiciler ve modülatörlerin etkileri ve verimliliğinin anlaşılmasıyla birlikte DO'nun gelişmesi, çok şiddetli iskeletsel bozuklukların tedavisini bile mümkün hale getirecektir.

2.17. Eritropoetin (EPO)

Kırmızı hücre miktarının korunması dokulara oksijen desteğini sağlamada çok önemlidir. Eritropoezisin dinamik basamakları ile eritrosit kaybı arasındaki denge çok hassas işlemekte ve eritrosit değerleri sürekli hematokrit takibi ile değerlendirilmektedir. Doku oksijen dağılımı kırmızı hücre üretimi ile ilişkili olup çok özel ve hassas bir mekanizmadır. Eritroid prekürsör hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenleyen glikoprotein bir hormon olan eritropoetin (EPO) bu olayın baş düzenleyicisidir (Kendall 2001, Jelkman ve ark 1994).

Normal eritropoezis için EPO'nun öneminin anlaşılmasından beri, EPO'nun az üretilmesinin anemi ile sonuçlanacağı açıktır. En aşikar örneği son aşamadaki böbrek yetmezliğindeki anemidir. Rekombinant insan eritropoetininin (rHuEPO) farmokolojik etkileri üzerine çok çalışılmış ve böbrek hastalığı olan hastaların yaşam kalitelerinde önemli etkiler görülmüştür (Kendall 2001).

Hipoksi ve eritropoezis arasındaki ilk ilişki 19. yy da deniz seviyesinden yüksek tepelerdeki düşük atmosfer seviyelerinde gezinti sırasında kurulmuştur. (Jourdanet 1863, Viault 1890, Muntz 1891, Meischer 1893). Bu ilişkideki biyolojik yarar anlaşılmış olup bunu kontrol eden mekanizma henüz bilinmemekteydi.

Carnot ve Deflandre (1906), hümoral eritropoezis faktörün varlığını gerçek olarak kabul etmiş ve bununla birlikte bu hipotezi destekleyen deneysel araştırmalar yapmıştır. Bu zayıf deneysel çalışmalardan yaklaşık 50 yıl sonra, Alan Erslev (1953), EPO'nun bilimsel kanıtını yayınlamıştır. Araştırmacı, deneyinde, kalp deliği olan şiddetli anemili tavşanlardan yüksek miktarda plazmayı normal tavşanlara enjekte ederek alıcı tavşanlarda doza bağımlı eritropoetik cevap oluşturmuştur.

Jacobson ve ark (1957), bilateral nefrektomi uygulanan hayvanlarda, hipoksiye karşı EPO cevabının oluşmadığını göstermişlerdir. Bir protein sentez inhibitörü olan puromisinin böbreklere uygulanmasıyla EPO üretiminin durması, böbreklerin kesin sentez alanı olduğunu göstermiştir (Erslev 1974). EPO'nun hücresel üretiminde ise tübüler hücrelerden kaynak aldığı bulunmuştur (Maxwell ve ark 1990, Mujais ve ark 1999).

EPO sirkülasyonunun yaklaşık %10'u karaciğerde üretilir (Jacobson ve ark 1959) ve bu da hepatositlerde sınırlıdır (Koury ve ark 1991). Karaciğer EPO üretimi fetal gelişim döneminde büyük öneme sahip olup insan çalışmalarında EPO üretiminin karaciğerden böbreklere yönlenmesi hamileliğin 30. haftasına rastlamaktadır (Dame ve ark 1998).

Bir molekül ağırlığı 18398 dalton olan EPO 166 aminoasit içerir. Karbonhidrat zincirleriyle birlikte 3 azot bağıyla beraber toplam molekül ağırlığı 30400 daltondur (Sytkowski 1980).

Bazan (1989), EPO'nun 3 boyutlu yapısını tarif etmekte ve molekülün 3 boyutlu yapısının büyüme hormonu gibi antiparalel dört alfa heliks zincirinden oluştuğunu belirtmektedir.

Jacob ve ark (1985) ile Lin ve ark (1985), insan EPO'sunda cDNA yı kodlayarak memeli hücrelerinde bu proteini sentezlemiştir. Fizikokimyasal ve biyolojik olarak böbrekten salgılanan EPO ile rHuEPO arasında fark olmadığı belirtilmiştir (Imai ve ark 1990).

EPO geni insanda 7. kromozomda yer almakta (Law ve ark 1986, Watkins ve ark 1986) ve memeli türlerinde yüksek oranda korunmaktadır (Shoemaker ve Mitsock 1986).

EPO üretimi DNA bağımlı mRNA sentezi ile meydana gelir. EPO üretimini kontrol eden oksijen seviyesi sistemi venözden daha çok arteryal oksijen basınç sistemine cevap verir (Kurtz ve ark 1988).

Böbrek EPO üretimi için mükemmel bir alandır. Çünkü böbrekteki glomerular filtratta sodyum rezorbsiyonu oksijen tüketir. Bu da doğrudan arteryal kan akımıyla ilgilidir (Erslev ve Caro 1986).

EPO böbreklerden boşaltılarak, karaciğerde metabolize edilerek veya eritronlara çevrilerek atılır. İdrarda var olan EPO'nun %10'u böbreklerden temizlenir (Rosse ve Waldemann 1964). Karaciğer EPO'yu hızlıca metabolize eder. Bu şekilde EPO'nun sialik asit kalıntılarının ortaya çıkarılması, EPO'nun in vitro olarak değil in vivo olarak biyolojik aktivitesini durdurur (Sytkowski 1980). Bazı çalışmalar EPO'nun temizlenmesinin eritron büyüklüğüne çevrilerek olduğunu göstermektedir. Bu EPO'nun temizlenmesi için önemli bir yol olabilir. Bu yüzden, EPO seviyesi aplastik anemili hastalarda eritroid hiperplazili hastalardan ve aynı derecedeki anemili hastalardan daha yüksektir (De Klerk ve ark 1981, Fukuda ve ark 1989, Jelkmann ve Widemann 1990).

EPO, hücre bölünmesi ile DNA replikasyonundan ziyade mRNA ve ardından protein sentezine aracı olur. EPO stimülasyonundan sonra eritrosit spesifik mRNA ve proteinlerinde hızlı artış görülür (Gross ve Goldwasser 1971).

Eritroid progenitör hücreler EPO varlığında büyüdükleri zaman daha uzun yaşarlar ve daha kısa sürede olgunlaşırlar (Koury ve Boundarant 1988). EPO yokluğunda eritroid progenitör hücreler kültüre edildiğinde, DNA kırılmasında artış ile ilişkili yıkıcı enzim üretirler (Gregoli ve Bondurant 1999). Böylece EPO, DNA replikasyonu ve mitojeni yerine mRNA transkripsiyonu boyunca eritrosit protein sentezi ile eritroid hücrelerin proliferasyonuna neden olarak antiapoptotik ajan gibi rol oynar.

Eritroid progenitör hücreler hem düşük hem de yüksek duyarlılıkta EPO reseptörüne sahiptirler. Her bir hücrede yaklaşık 1200 EPO reseptörü bildirilmiştir (D'Andrea ve Zon 1990). EPO'nun biyolojik etkileri hücre yüzeyindeki reseptör (EPOR)

ile spesifik etkileşimi ile olur. EPOR birkaç nonhematopoetik hücre tiplerine ek olarak eritroid prekürsör hücrelerde var olan tip I sitokin reseptörüdür (Jelkman ve ark 1994).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, EPO-EPOR etkileşiminin çeşitli nonhematopoetik biyolojik etkileri olduğu gösterilmiştir. Örneğin; beyin iskemisi ve beyin yaralanmasından sonra nöronal apoptozisi engellemede (Siren ve ark. 2001), ve iskemik retinal durumlarda sinirlerin korunması ve rejenerasyonunda (Meffert ve ark. 2002) EPO önemli bir rol oynar. Ayrıca normal beyin gelişmesinde hipoksi durumlarında EPO ile EPOR sentezinin artmasıyla hücrelerin proliferasyonu artmış ve hücre ölümü azalmıştır. EPO stimülasyonu nöronal progenitor hücrelerde proliferatif cevap geliştirmiştir (Yu ve ark 2002). Böbrek, kas hücreleri ve bağırsak içinde EPOR tarif edilmesi EPO' nun hücresel proliferasyonu indükte etme yeteneği olduğunu gösterir (Ogilvie ve ark.2001).

2.17.1. Rekombinant insan eritropoetininin farmokolojik olarak kullanımı

Anemiyle ilgili son dönem böbrek hastalığının tedavisinde rHuEPO'nun etkinliği ilk olarak Winearls ve ark (1986) tarafından gösterilmiştir. rHuEPO hemoglobin seviyesinde önemli bir yükselişe neden olmakta ve bir çok hastada kan transfüzyonunu azaltmaktadır (Fearon ve Weinthal 2002). rHuEPO ile tedavi edilen hastaların fiziksel durumlarında da iyileşme görülmektedir (Grutzmacher ve ark 1988). Demir eksikliği, enfeksiyon, inflamasyon ve alimünyum toksisitesi yüzünden bir çok hasta rHuEPO tedavisine iyi cevap vermeyebilir (Scigalla ve ark 1990).

Tedavi edilen hastalarda birkaç yan etkisi görülmüştür. Bunlardan en önemlisi ensefalopati ve felce neden olan hipertansiyondur (Brown ve ark 1989). Bununla birlikte düşük doz EPO tedavisi ve hedeflenen hemoglobin seviyesinin dikkatli seçimi bu fenomenin ortaya çıkmasını büyük ölçüde engeller. EPO'nun 48 saatte bir subkütan enjeksiyonunun uygulamada çok tatmin edici yol olduğu kanıtlanmıştır (Macdougall ve ark 1989, McMahon ve ark 1990).

EPO böbrek yetmezliğindeki hastalarda bir standart tedavi olmasına rağmen diğer uygulamalarda daha az yararlı olmuştur. Non-renal anemide çoğu hastaların tedavisinde EPO etkili olmasına rağmen, onun kullanımı evrensel kullanımdan uzak kalmıştır. AIDS ile ilgili anemilerde (Garnick ve ark 1991), romatoid artiritte (Birgegard ve ark 1991), erken doğumlarda (Obladen ve ark 1991), kanser (Henry ve Abels 1994), myeloma (Ludwig ve ark 1990), myelodisplastik sendrom ve aplazide (Hirashima ve ark 1991) rHuEPO'nun kullanımı ile ilgili başarılı raporlar yayınlanmıştır. Otolog kan transfüzyonu esnasında toplanan kan miktarının arttırılmasında rHuEPO kullanılabilir (Goodnough ve ark 1989). Ayrıca çocuklarda kalp transplantasyonu sonrası gelişen devamlı aneminin tedavisinde yararlı olduğu (Blackburn ve ark 1992) ve kronik böbrek yetmezliği bulunan hastalarda artmış hemoglobin konsantrasyonuyla oksijen dağıtımını arttırarak egzersiz kapasitesini arttırdığı belirtilmiştir (Mancini ve ark 2003).

Hematopoetik ve endotel hücrelerinin ortak hemanjioblast progenitörü paylaştığına dair hipotezler her ikisinin soyunun CD31 CD34 gibi hücre yüzey antijenleri sentezlediği bulgularına dayandırılmıştır. Endotel ve hematopoetik hücrelerin ortak ontogenezis hipotezi ile uyumlu olarak, hematopoetik faktör EPO'nun in vitro insan ve sığır endotel hücrelerinde (Anagnostou ve ark 1990) ve kültüre edilmiş immortalize göbek kordonu ven endotel hücrelerinde (Ribatti ve ark 1999) proliferasyon ile migrasyonu uyardığı gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalar, EPO'nun önceden var olan damarlardan yeni kan damarları üretimi olan anjiogenezisi uyarma yeteneği olduğunu gösterir (Folkman ve Shing 1992). EPO anjiogenik oluşumun ilk fazını (hücre hareketliliğinde artış, hücre matriksinin bozulması, hücresel proliferasyon) ve vasküler mağara formasyonuna götüren sonraki fazını uyarır. Farklı deneysel çalışmalarda, rekombinant EPO fare aortunda endotelyal hücre proliferasyonunu ile migrasyonunda (Carlini ve ark 1995), ve yeni doğan fare mezenterik mikrovasküler endotelyal hücrelerdeki vaskülogeneziste (Ashley ve ark 2002)

rol almıştır. Son yıllarda, EPO ile *vascular endothelial growth factor* (VEGF) arasında keşfedilen etkileşim (Arvalez ve ark 1998, Nitta ve ark 1999) ile EPO'nun antioksidanlarla olan etkileşimi (Saray ve ark.2003) ve EPO'nun endotelyal hücre mitozisi ile hareketliliğini uyarma yeteneği, yara iyileşmesinin karmaşık durumu içinde önemli olabilir (Buemi ve ark 2002). Bu deneysel çalışmalardan başka, rHuEPO'nun genetik olarak diabetik farelerde yara iyileşmesi ile anjiogenezisini (Galeano ve ark 2004) ve iskemik deri yaralarının iyileşmesi ile anjiogenezisini (Buemi ve ark 2004) uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca in vivo yara modelinde önemli bir fizyolojik rol oynadığı gösterilmiştir (Haroon ve ark 2003). Yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalara ek olarak başka bir çalışmada, EPO'nun yeni damarların olgunlaşmasını hızlandırarak ve fibroblastların sayısını arttırarak fare kolon anastomozundaki iyileşmeyi arttırdığı belirtilmiştir (Fatouros ve ark 1999). Ayrıca farmakolojik dozlarda uygulanan rHuEPO'nun kan transfüzyon ihtiyacını klinik olarak önemli miktarda azalttığı gösterilmiştir (Fearon ve Weinthal 2002).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi etik kurulundan onay alınmıştır ve hayvanlar bu merkezden temin edilmiştir. Bu çalışmada Helsinki bildirgesindeki laboratuar hayvanlarını koruma kurallarındaki tavsiye kararlarına uyulmuştur. Onaltı adet erişkin erkek beyaz Yeni Zelanda tavşanından oluşan bu çalışmadaki hayvanların ağırlıkları 2-2.5 (2.3±0.24) kg arasında değişmektedir. Her bir grupta 8 adet tavşan olacak şekilde deney ve kontrol grubu olmak üzere iki çalışma grubu oluşturulmuştur. Deney hayvanları, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde 22±2 ºC'de veteriner hekim kontrolünde standart tavşan yemi ve musluk suyu ile beslenip gerekli bakımları yapılarak muhafaza edilmiştir.

3.1. Distraksiyon Aygıtı

Bu çalışmada daha önce Pampu (2005) tarafından tavşan mandibulasında kullanılan alete benzer 1.5 mm çapında kendi kendine vidalanabilen pinlerin kullanılmasıyla kemikten desteğin alındığı eksternal özel yapım bir mandibula distraksiyon aygıtı kullanılmıştır (Şekil 3.1.A).

Distraksiyon aygıtının ana parçası titanyumdan (Ticari saf titanyum grade-II), distraksiyon vidaları ve kirschner pinleri ise krom-nikel (SM316) alaşımdan yapılmıştır. Distraksiyon aygıtının ağırlığı 16g, toplam uzunluğu 33 mm, yüksekliği 19.5 mm ve derinliği 6.5 mm'dir.

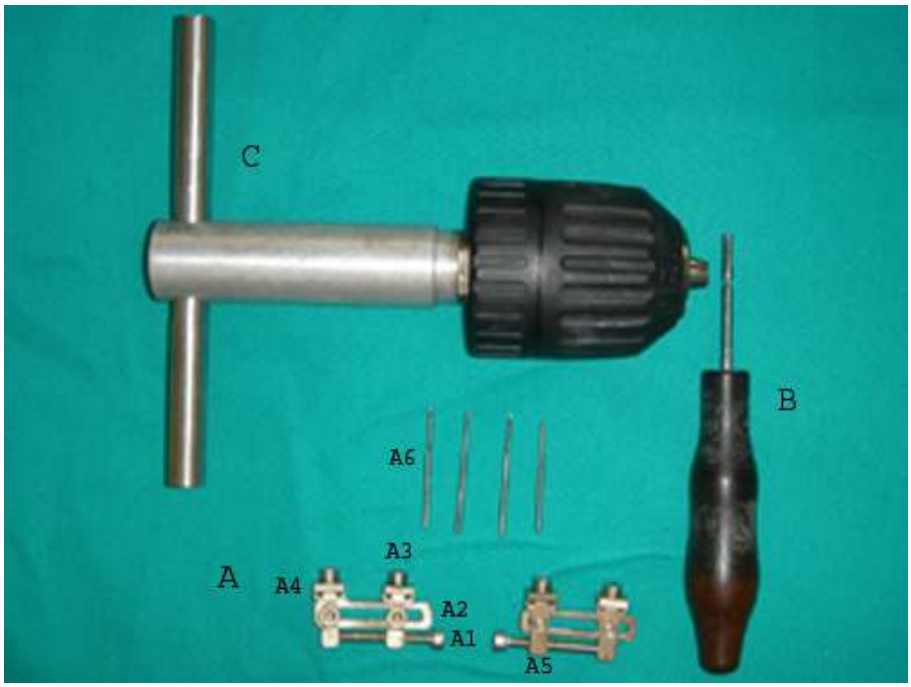
Distraksiyon aygıtı, üzerlerine 5 mm aralıkla iki adet kirschner pini yerleştirilebilecek şekilde olukları bulunan biri hareketli diğeri sabit taşıyıcı blok, bir tane taşıyıcı ray ve 32 mm uzunluğundaki ray üzerinde hareketi sağlayan sabit bloğa bağlı özel bir tornavidayla döndürülebilen allen başlı M3 vidadan oluşuyordu. Ucu sabit bloğa bağlanmış olan distraksiyon vidası hareketli bloğa ray

üzerinde ileri geri hareket imkanı vermektedir. Distraksiyon vidasının çevrilmesiyle hareket eden distraksiyon bloğu distraksiyon tamamlandıktan sonra rayın üzerindeki vidalar sıkılarak sabitlenmektedir. Böylece distraktör fiksasyon görevi görmektedir.

Aygıtın üst kısmında 1.5 mm çapında 3 cm uzunluğunda ikişer adet kirschner pininin 5 mm aralıkla oturacağı iki adet oluk yer almaktadır. Bu pinleri bu oluklarda sabit tutan pullar bu olukların üzerine yerleşir ve vidalar ile sabitlenir. Sabitleme için kullanılan vidalar allen ve dişi altıgen başlıdır. Bu vidaları sıkıp gevşetmek için özel bir tornavida kullanılır (Şekil 3.1.B).

Distraksiyon sırasında yükün tamamını taşıyan ray, sabit olan bloğa 3 mm'lik vida ile tespit edilmiştir. Bu ray sayesinde hareketli tutucular sabitlenebilmektedir. Distraksiyon hareketi 32 mm'lik distraksiyon vidasının özel tornavidayla saat yönünde çevrilmesi ile gerçekleşmektedir. Distraksiyon vidasının bir tur çevrilmesiyle 0.5 mm'lik hareket sağlandığından iki tur çevrilmesiyle 1 mm'lik uzatma sağlanmaktadır.

Kirschner pinleri 1.5 cm çapında ve 30 mm uzunluğundadır. Bu pinleri osteotomi sahasına yerleştirmek için özel bir aygıt vardır (Şekil 3.1.C). Bu pinler bu aygıtın uç kısmına yerleştirilip sonra aygıtın orta kısmı çevrilerek pin anahtar içinde sıkıştırılmaktadır. Sonra da aygıt tümüyle döndürülerek bu pinler osteotomi sahasına yerleştirilmektedir.



Şekil 3.1. A) Distraktörün ön ve arka yüzden görüntüsü A1. distraksiyon vidası, A2. taşıyıcı ray, A3. pin fiksasyon vidası, A4. pin sabitleyici pul. A5. taşıyıcı blok A6. eksternal pinler, **B)** Distraksiyon tornavidası **C)** Pinlerin uygulanmasında kullanılan aygıt.

3.2. Cerrahi Teknik

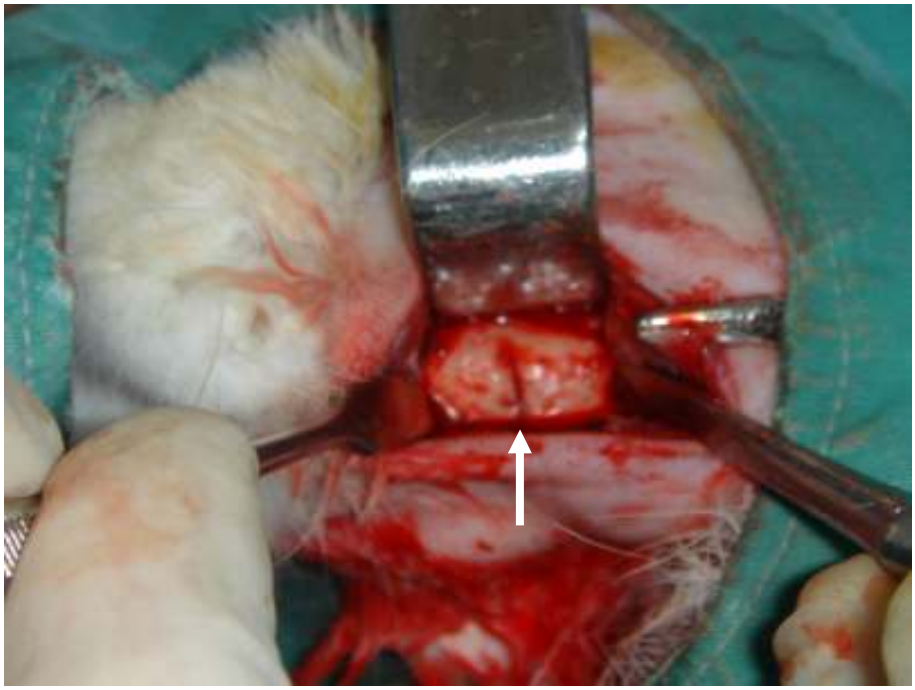
Deney hayvanlarına, 35 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı) ve 5 mg/kg xylazine (Ronpun. Bayer) intramüsküler enjeksiyon ile uygulanarak genel anestezi sağlandı. Tavşanlar supine pozisyonundaydı. Distraksiyon işlemi sadece sol mandibulaya yapılırken sağ mandibulaya hiçbir işlem yapılmadı. Sol mandibular bölgedeki cilt traş edildi ve bu bölgeye %10'luk povidon-iyot solusyonu ile cilt antiseptiği uygulandı. Ameliyat bölgesi steril örtü ile örtüldü. İnsizyon bölgesine 1/100000 epinefrin içeren %2' lik lidokain enjekte edildi. Mandibulanın alt sınırı boyunca mandibular en son molar dişten kanin diş bölgesine kadar yaklaşık 2.5 cm deri insizyonu yapıldı. Derialtı dokular ve kas tabakası künt diseksiyon ile geçildikten sonra periost kaldırılıp sol mandibular kemik açığa çıkarıldı. Fasiyal arteri zedelememek için özen gösterildi. Mental foramenin hemen distali anterior cerrahi sınırı, angulus mandibula ise posterior cerrahi sınırı oluşturuyordu. Mental

sinir operasyon boyunca korundu. Mandibular birinci premolar dişin distalinden cerrahi testere ile steril serum fizyolojik soğutması altında monokortikal vertikal bir kemik kesisi yapıldı (Şekil 3.2). Bu kesi dişlerin köklerini ve lingualdeki periostu zedelememek için sadece dış korteksi içerecek şekildeydi. Kortikotomi hattının hem distal hem de mesial tarafına birbirinden 0.5 cm uzaklıkta ikişer adet olmak üzere toplam 4 adet bikortikal delik, 1.25 mm çapında fissür frez ile açıldı. Bu hazırlanan deliklere 4 adet kirschner pini mümkün olduğu kadar birbirine paralel olacak şekilde özel bir aparey ile yerleştirildikten sonra nervus alveolaris inferior korunarak ince bir osteotom ile lingualdeki kortikal kemik kesisi yapıldı (Şekil 3.3). Lingualdeki periostun sağlam kalmasına dikkat edildi. Distraktör pinlere yerleştirildikten sonra distraksiyon vidası ters yönde çevrilerek distraksiyon aygıtının yerleştirilmesi esnasında oluşabilecek kemik fragmanların arasındaki aralık kapatıldı. Distraktör aygıtındaki taşıyıcı rayın üzerindeki vidalar sıkılarak distraktör sabitlenerek kemik fragmanların hareketi önlendi. Böylece distraktör mandibulanın alt kenarına paralel yerleştirilmiş oldu (Şekil 3.4). Bölgenin serum fizyolojik ile yıkanması ve kanamanın kontrolünden sonra ameliyat alanı tabakalar halinde 4.0 vikril ile dikildi. Ameliyattan sonra hayvanlar uyanıncaya kadar gözlem altında tutuldu.

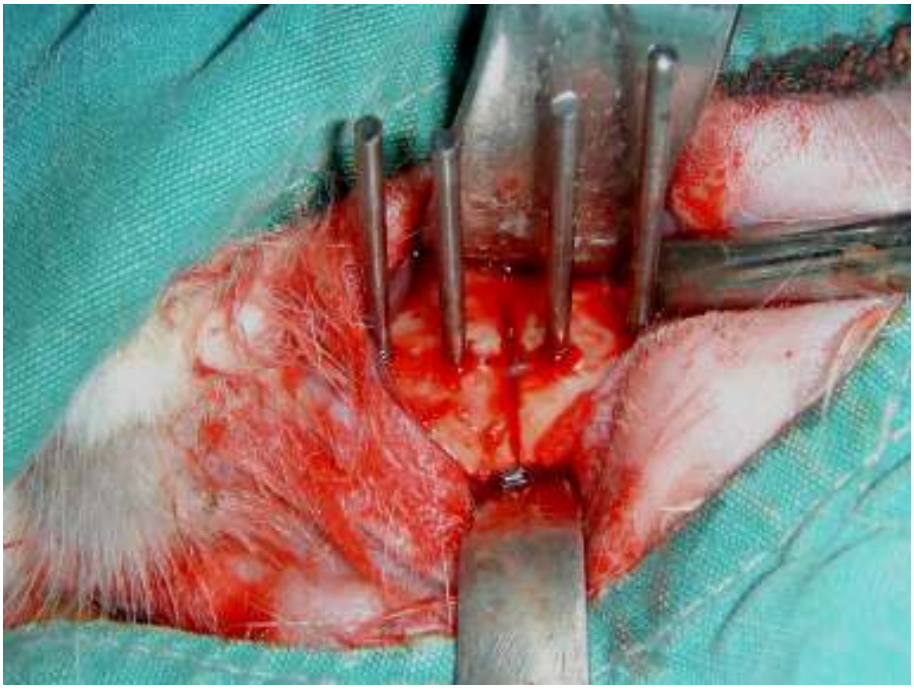
Deney grubundaki hayvanlara ilk doz ameliyattan hemen sonra olmak üzere 48 saat ara ile toplam dört doz 150 IU/kg Rekombinant Human Eritropoetin (Eprex® 2000,4000,10000 IU/0.5 ml, Epoetin alfa, Janssen-Cilag) deri altından verildi (Şekil 3.5). Kontrol grubuna ise 0.5 ml % 0.9'luk NaCl deri altından deney grubundaki protokolle aynı olmak üzere uygulandı.

En son doz rHuEPO verildikten hemen sonra (post-op 6.gün) hem deney hem de kontrol grubundaki hayvanların sağ kulak bölgesi traş edilip dezenfekte edildikten sonra marjinal kulak veninden yaklaşık 2 ml kan alınıp EDTA'lı tüpe konulup hematolojik

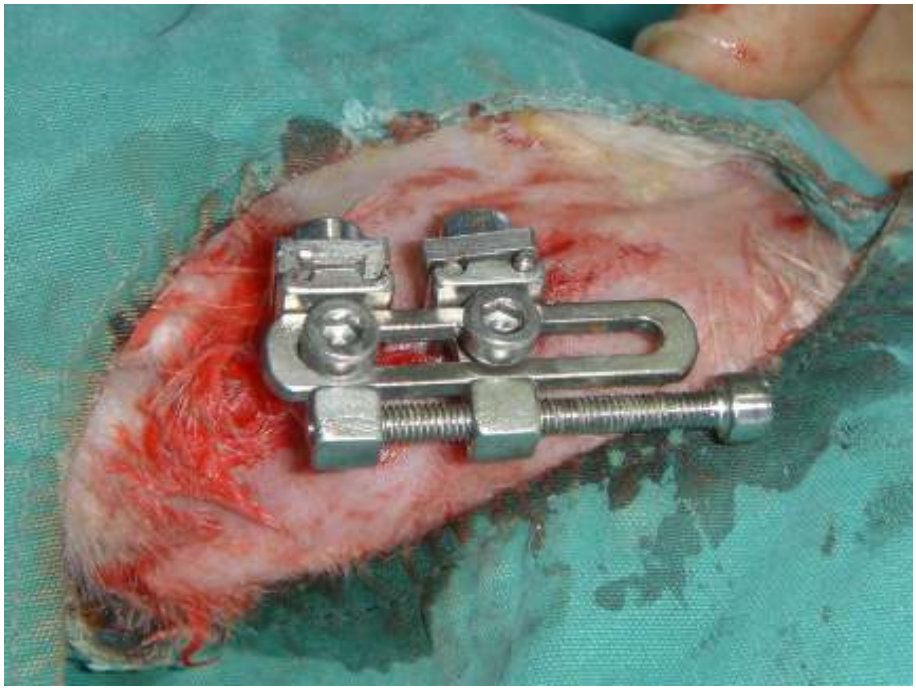
incelemelerden hematokrit değerlerine nüvetocrit cihazında (CN:090-Yapılcan) bakıldı. Aynı şekilde kontrol grubunda da hemotokrit değerlerine bakıldı.



Şekil 3.2. Osteotomi hattı



Şekil 3.3. Eksternal pinlerin uygulanması ve osteotominin tamamlanması



Şekil 3.4. Ameliyat sonunda yerleştirilmiş olan distraktörün görünümü



Şekil 3.5. Deney sırasında uygulanan rekombinant insan eritropoetini

3.3. Ameliyat Sonrası Bakım ve Latent Dönem

Ameliyattan sonra hem deney hem de kontrol grubundaki hayvanlar tekli kafeslere konularak veteriner hekim gözetiminde tutuldu. Antibiyotik olarak günde bir kez 40000 IU/kg Penisilin G prokain (Pencain-K 800000 IU, IM, Bilim İlaç) ve analjezik olarak günde bir kez 2 mg/kg Trimadol Hidroklorür (Contramal

ampul 100 mg, IM, Abdi İbrahim) toplam 5 gün uygulandı. Cilt antiseptiği ile ameliyat bölgesinin pansumanı 10 gün boyunca yapıldı. Bütün hayvanlar iyileşinceye kadar havuç gibi sert yiyecekler dışında rutin yumuşak tavşan diyetiyle beslendi. Çalışmayı etkilememesi için hiçbir besleyici nitelikte ilaç verilmedi. Deri yüzeylerindeki, diyet alışkanlıklarındaki ve hareketlerindeki her değişiklik takip edildi. Çalışma boyunca alt gingivadaki ülserasyonları engellemek için tavşanların uzayan üst kesici dişleri toplam uzunluğunun üçte biri kadar kısaltıldı. Çalışma boyunca tavşanlarda herhangi kilo kaybına rastlanmadı. Hayvanlar latent dönemde toplam iki gün bekletildi.

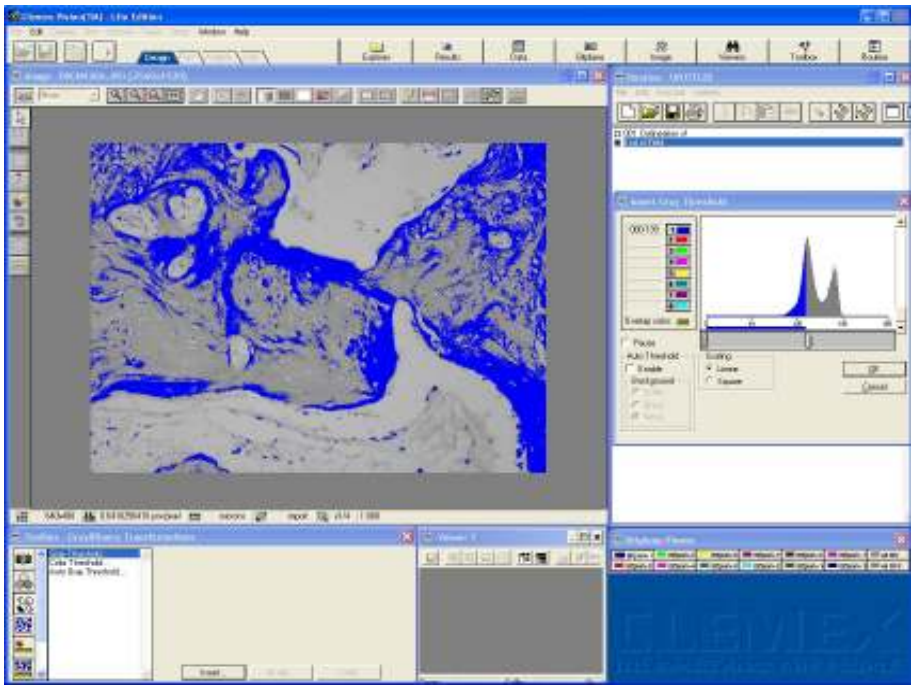
3.4. Distraksiyon ve Pekiştirme Dönemi

İki günlük latent dönemden sonra aktivasyon dönemine geçildi. Distraksiyon aygıtı 5 günlük bir dönemde 12 saatte bir 0.5 mm olacak şekilde günde 1 mm aktive edildi. Distraksiyon döneminde distraksiyon vidasını çevirme saatleri 08.00 ve 20.00 idi. Aktivasyon dönemi 5 gün sürdü. Toplam 5 mm uzatma işleminden sonra distraktör sabitlenip 30 günlük pekiştirme dönemine geçildi. Pekiştirme döneminin tamamlanmasının ardından hayvanlar intravenöz 1ml/kg sodyum pentotal enjeksiyonu ile sakrifiye edildi. Ameliyat sahasındaki mandibulalar diseke edilerek çıkarıldı. Örnekler %10'luk fosfat tamponlu formaldehite konuldu.

3.5. Yeni Oluşan Kemik Bölgesinin Histomorfometrik Olarak İncelenmesi

Dokuların hazırlanması işlemi ve histomorfometrik inceleme Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuarında yapıldı. %10'luk tamponlanmış formaldehitte tespit olan sol mandibula kemikleri kolay dekalsifiye olması için distraksiyon sahasının her iki tarafında 1 cm normal kemik kalacak şekilde küçültüldü. Bu küçültülen kemikler dekalsifikasyon için % 8'lik formik asit ve % 8'lik

hidroklorik asit karışımının içerisine konuldu. Bu karışım daha etkili olabilmesi için haftada iki kez değiştirildi. Dokular mikrotom ile kesilebilecek kıvama gelince, yani tamamen dekalsifiye olunca, asidi dokudan uzaklaştırmak için 5 saat akan suyun altında yıkandı. Daha sonra ototeknikon ile doku takibine alındı. Doku takibi sonrası dokular parafine gömülüp, mikrotom ile hemen hemen aynı seviyeden sagital olarak 5µ'luk kesitler alındı. Kesitler lam üzerine alınıp, bu kesitlerin bir kısmı osteoblast, osteoklast ve trabeküler alanları incelemek için hematoksilen-eozin (HE) ile bir kısmı damarları ve fibroblastları incelemek için immünohistokimyasal olarak VEGF ve FGF ile bir kısmı da kollajen lifleri incelemek için histokimyasal olarak Von Gieson's ile boyandı. Boyanan preparatlar Nikon Eclipse E400 (Japan) ışık mikroskobu ile incelendi. Distraksiyon sahasındaki yeni kemik bölgesi ve normal kemik bölgesi ışık mikroskobuna monte edilen Nikon Coolpix 5000 (Japan) dijital fotoğraf makinesi ile görüntülendi. Örneklerin fotoğraflandığı ışık mikroskobik büyütmede Nikon Mikrometre Lamı (Nikon Stage Micrometer Type A, Japan) görüntüsü de alındı. Tüm görüntüler PC ortamına aktarıldı. Fotografların analizi PC ortamında Clemex Vision Lite 3.5 (Kanada) programı ile gerçekleştirildi. İlk başta Nikon Mikrometre Lamı görüntüsü ile uzunluk kalibrasyonu yapıldı. Daha sonra örneklerin fotoğraflarında belirli alanlar seçilerek incelendi. İnceleme için yeni oluşan kemikteki mandibulanın alt kenarına yakın bölgelerde 450000 μm^2 alan her örnekte ayrı ayrı işaretlendi. Görüntü analizi programı yardımıyla, hem deney grubunda hem de kontrol grubunda yeni oluşan kemik bölgesinde seçilen alandaki osteoblastlar, osteoklastlar, fibroblastlar, damarlar ve kollajen lifler işaretlenerek, otomatik olarak saydırıldı. Seçilen bölgedeki trabeküler kemik alanları da hesaplandırıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Alan hesabı örneklemesi (mavi alanlar distrakte sahadaki trabeküler kemik alanlarını göstermektedir).

3.6. İstatistiksel Yöntem

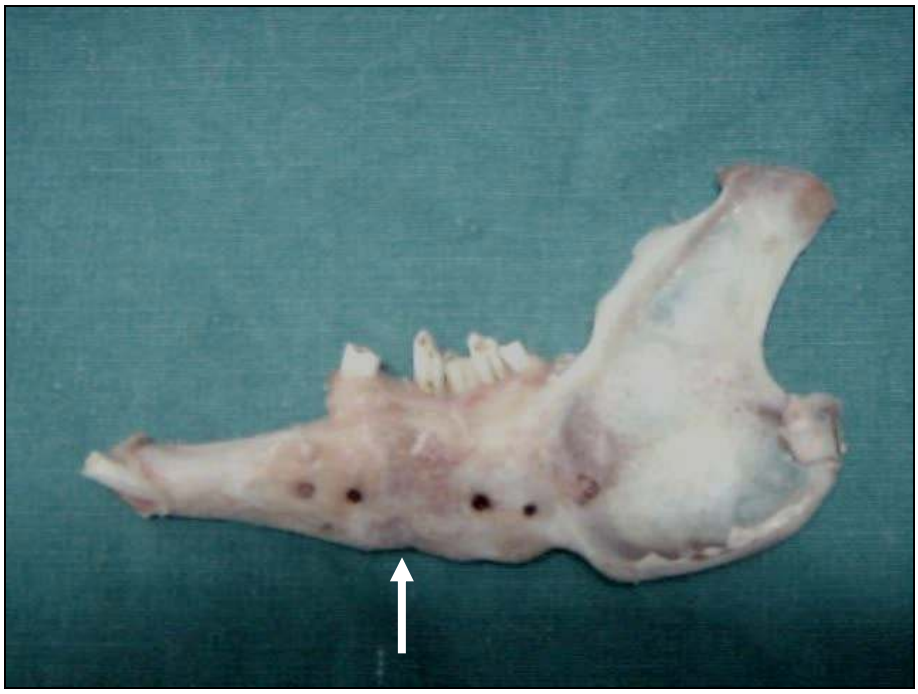
Histomorfometrik veriler Windows XP programı altında çalışan SPSS (Version 10.0) istatistik programında Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel olarak bu veriler ortanca±çeyrek sapma olarak ifade edilerek $p<0.05$ ise anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

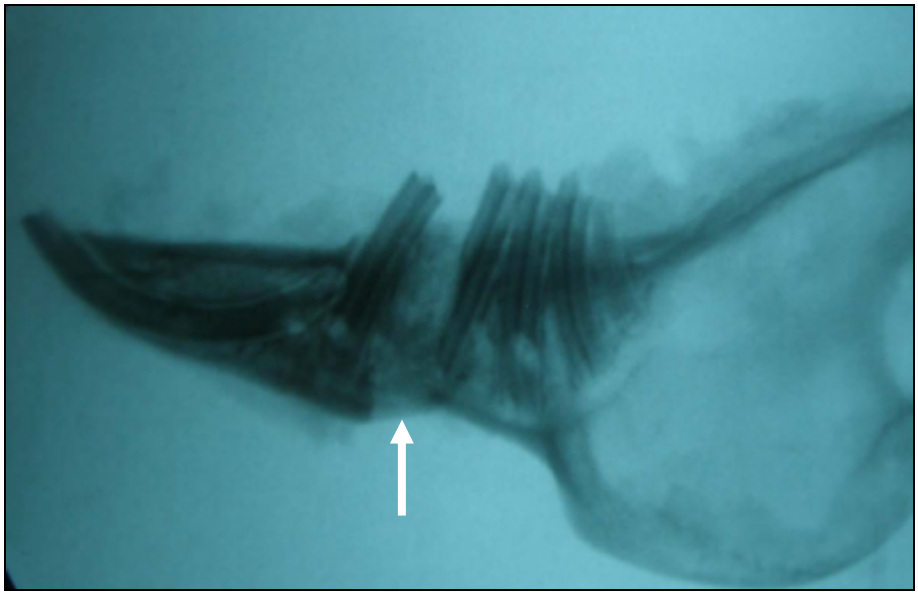
Deney grubundan bir tavşan cerrahiden 3 gün sonra distraksiyon aygıtını çıkardığından dolayı çalışmadan çıkarıldı. 15 hayvan ile çalışmaya devam edildi. Bütün hayvanlarda iyileşme sorunsuzdu. Çalışmaya devam eden tüm deney hayvanlarında distraksiyondan önce normal kapanış, distraksiyon dönemini takiben tek taraflı çapraz kapanış ve laterognati meydana geldi (Şekil 4.1). Her iki gruptaki hayvanların ameliyat sonrası ağırlıkları ve hemotokrit değerleri arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0.05$). Pekiştirme döneminin sonunda klinik olarak diseke edilen mandibulaların hepsinin gözle muayenesinde, düz grafilerle yapılan radyolojik incelemesinde, ışık mikroskobuyla yapılan makroskobik incelemesinde ve panoromik histolojik incelemesinde yeni kemik oluştuğu görüldü (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



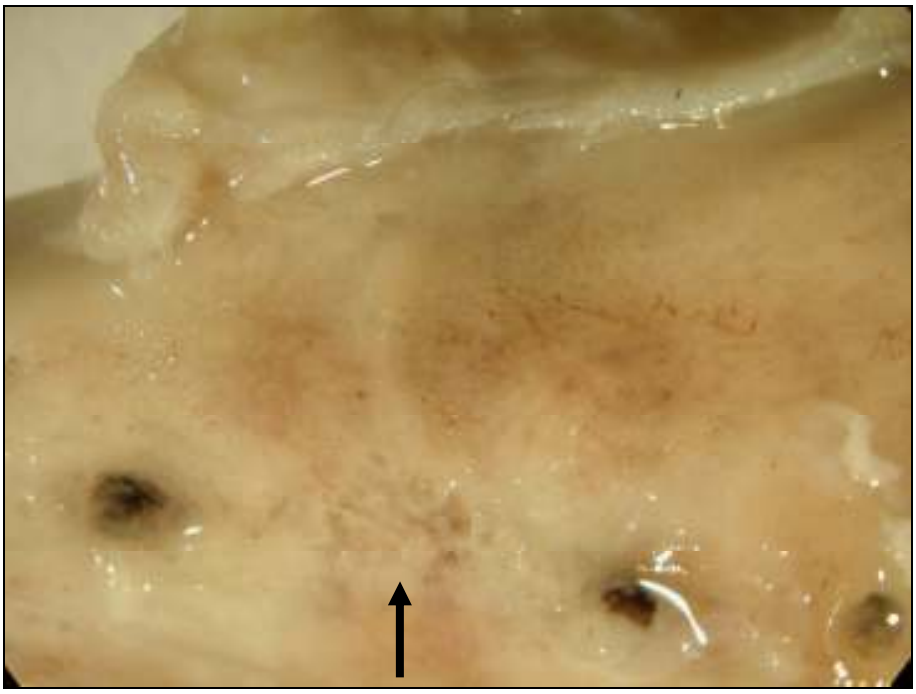
Şekil 4.1. Distraksiyon öncesinde normal kapanış, distraksiyon sonrasında oluşan çapraz kapanış ve laterognati



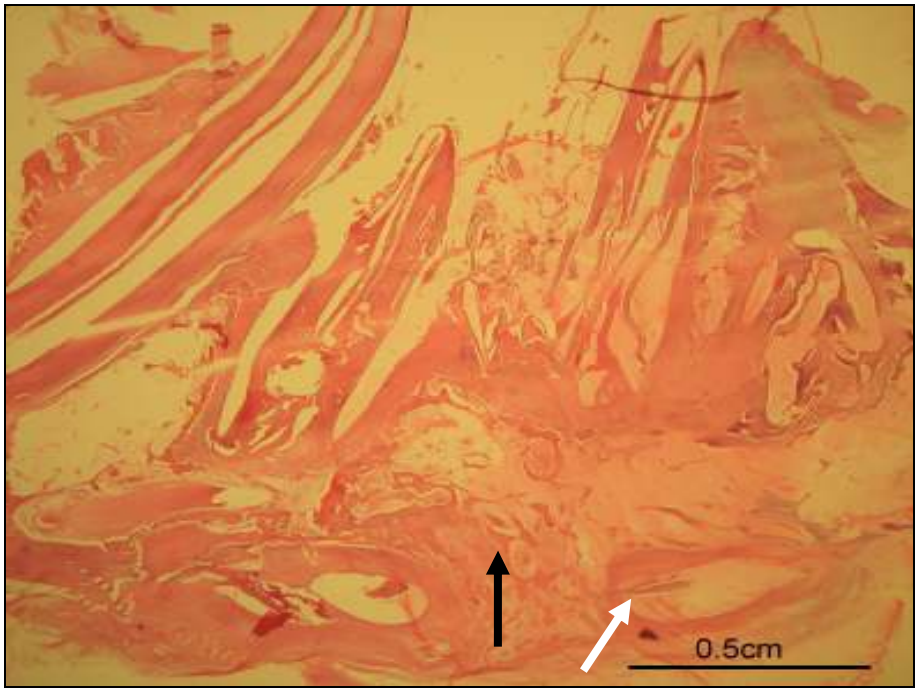
Şekil 4.2. Distrakte edilen mandibulada pin yuvalarının ve yeni oluşan kemik dokusunun görüntüsü



Şekil 4.3. Direk radyografide yeni oluşan kemik bölgesi



Şekil 4.4. Yeni oluşan kemik bölgesinin ışık mikroskobu (Nikon SMZ 1500) ile elde edilen makroskobik görüntüsü



Şekil.4.5. Panoromik histolojik görüntülemede yeni oluşan kemik bölgesinde trabeküler kemik yapıları (siyah ok) ve pin boşlukları (beyaz ok) görülmektedir (HE).

4.1. Deney ve Kontrol Grubunda Yeni Oluşan Kemik Dokusunun Histomorfometrik Analiz Bulguları

Hem kontrol hem de rHuEPO verilen deney grubunda yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoblast sayısı, osteoklast sayısı, fibroblast sayısı, damar sayısı, kemikleşme alanı ve kollajen liflerinin alanı görüntü analizi sistemi ile histomorfometrik olarak incelenip matematiksel olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6). Her bir örnekte osteoblast, osteklast ve trabeküler kemik alanı için bir kesit, damar sayısı için bir kesit, fibroblast sayısı için bir kesit ve kollajen lif sayısı için bir kesit incelenmiştir.



Şekil 4.6. Yeni oluşan kemik bölgesinin histolojik görüntüsü, ob)osteoblast oc)osteoklast f)fibroblast c)kollajen (HE)

4.1.1.Yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoblast sayısı

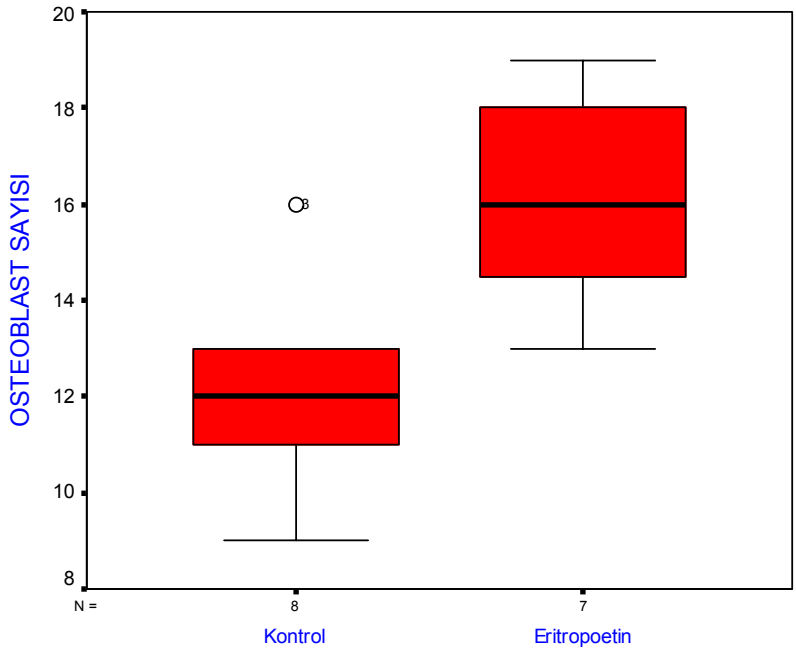
Deney ve kontrol gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoblast sayıları kıyaslandığında deney grubunda belirgin artış olduğu görüldü. Belli bir birim alandaki (450000 μm^2) osteoblast sayısı rHuEPO verilen grupta 16±0.5 iken kontrol grubunda 12±0

olarak bulundu. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo 4.1). Gruplar arasındaki osteoblast sayısının dağılımı Grafik 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoblast sayıları

OSTEOBLAST SAYISI	N	AO	SS	O	ÇS	Z	P
Kontrol	8	12.12	2.03	12	0	-2.739	**0.004**
Eritropoetin	7	16.14	2.34	16	0.5		

N:Her bir gruptaki eleman sayısı AO:Aritmetik ortalama SS:Standart Sapma O:Ortanca ÇS:Çeyrek Sapma Z: Mann-Whitney U testi değeri



Grafik 4.1. Gruplar arasında osteoblast sayısının dağılımı

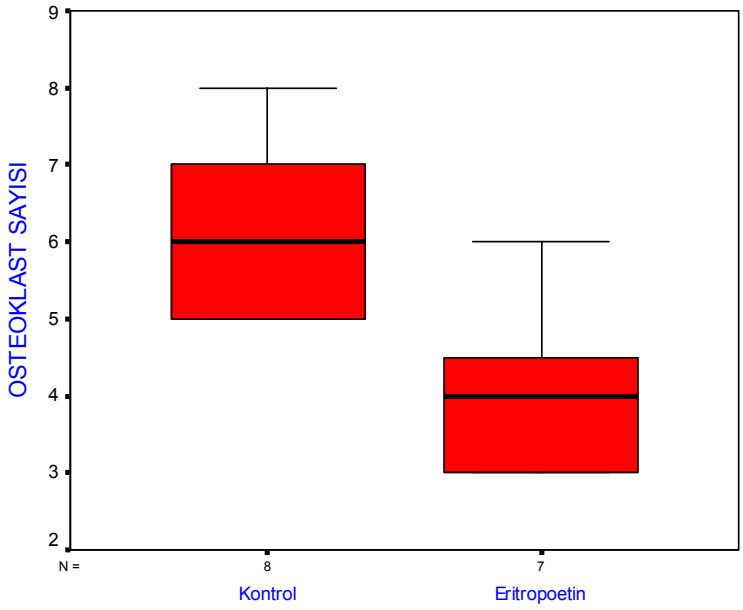
4.1.2.Yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoklast sayısı

Yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoklast sayıları deney grubunda kontrol grubuna göre belirgin derecede daha azdı. Kontrol grubunda belli bir birim alandaki (450000 μm^2) osteoklast sayısı 6±0.5 iken, rHuEPO verilen grupta 4±0 olarak belirlenip, istatistiksel olarak iki grup arasındaki fark anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo 4.2). Gruplar arasındaki osteoklast sayısının dağılımı Grafik 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki osteoklast sayıları

OSTEOKLAST SAYISI	N	AO	SS	O	ÇS	Z	P
Kontrol	8	6.12	1.12	6	0.5	-2.652	**0.006**
Eritropoetin	7	4	1.15	4	0		

N:her bir gruptaki eleman sayısı AO:Aritmetik ortalama SS:Standart Sapma O:Ortanca ÇS:Çeyrek Sapma Z: Mann-Whitney U testi değeri



Grafik 4.2. Gruplar arasında osteoklast sayısının dağılımı

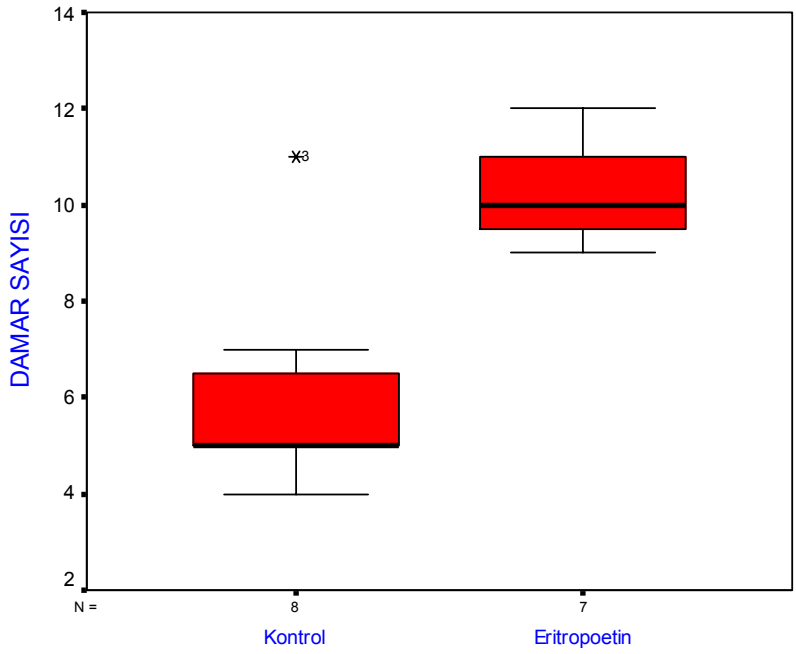
4.1.3. Yeni oluşan kemik bölgesindeki damar sayısı

Hem deney hem de kontrol grubunda, yeni oluşan kemik sahasındaki birim alanda (450000 μm^2) bulunan damar sayıları incelendiğinde rHuEPO verilen grupta damar sayısı 10±1.5 iken kontrol grubunda 5±1.0 olarak belirlendi. rHuEPO verilen gruptaki birim alandaki damar sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında daha fazla olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.3). Gruplar arasındaki damar sayısının dağılımı Grafik 4.3'te gösterilmiştir. Şekil 4.7'de yeni oluşan kemik bölgesindeki damarlar görülmektedir.

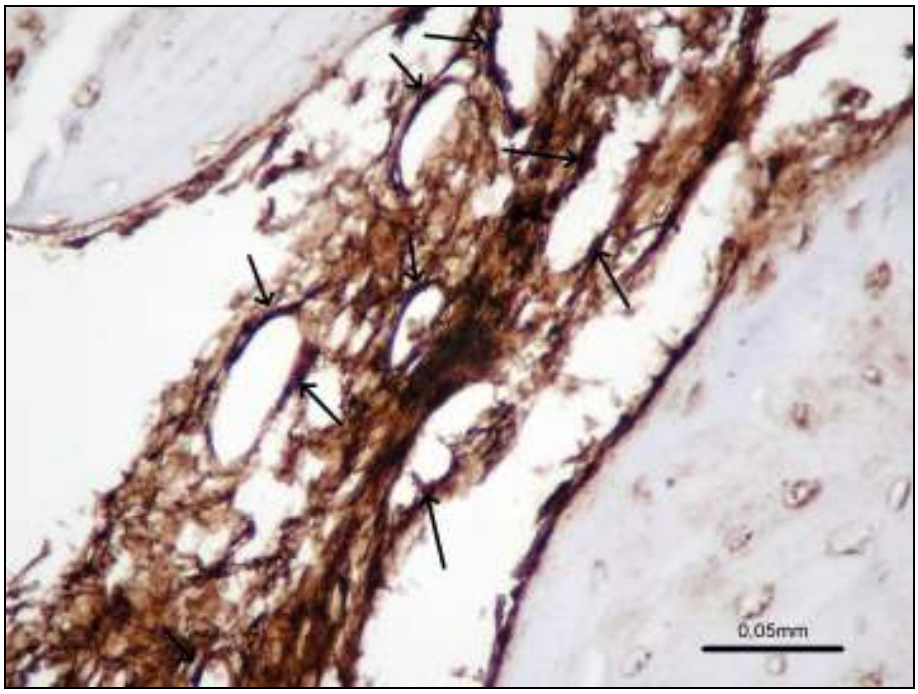
Tablo 4.3. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki damar sayıları

DAMAR SAYISI	N	AO	SS	O	ÇS	Z	P
Kontrol	8	6	2.20	5	-1	-2.701	**0.006**
Eritropoetin	7	10.2	1.11	10	1.5		

N:her bir gruptaki eleman sayısı AO:Aritmetik ortalama SS:Standart Sapma O:Ortanca ÇS:Çeyrek Sapma Z: Mann-Whitney U testi değeri



Grafik 4.3. Gruplar arasında damar sayısının dağılımı



Şekil 4.7. Yeni oluşan kemik bölgesindeki damarların görüntüsü (VEGF)

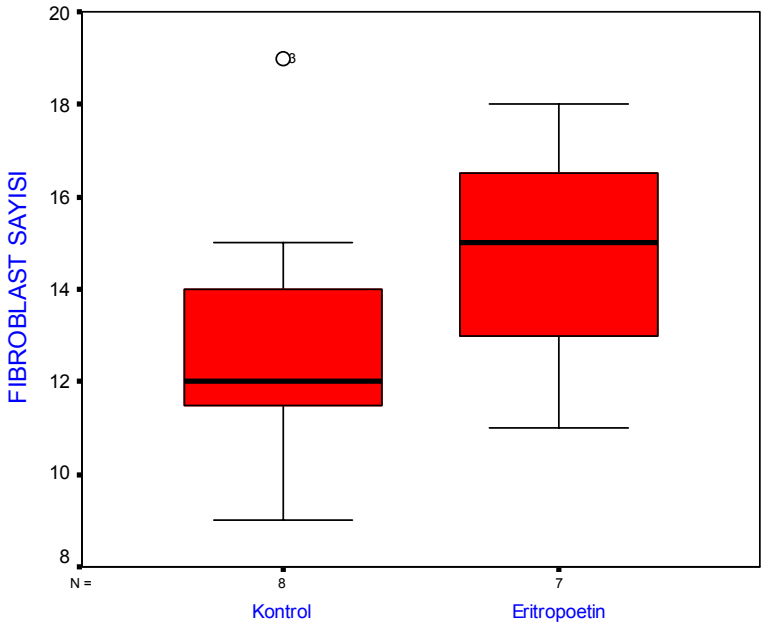
4.1.4. Yeni oluşan kemik bölgesindeki fibroblast sayısı

Hem kontrol hem de rHuEPO verilen grupta yeni oluşan kemik bölgesindeki birim alanda (450000 μm^2) bulunan fibroblast sayıları değerlendirildiğinde rHuEPO verilen grupta 15±2.5 ve kontrol grubunda 12±1 olduğu görüldü. Deney grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında deney grubunda daha fazla sayıda fibroblast bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Tablo 4.4). Gruplar arasındaki fibroblast sayısının dağılımı Grafik 4.4'te gösterilmiştir. Yeni oluşan kemik bölgesindeki fibroblastlar Şekil 4.8'de görülmektedir.

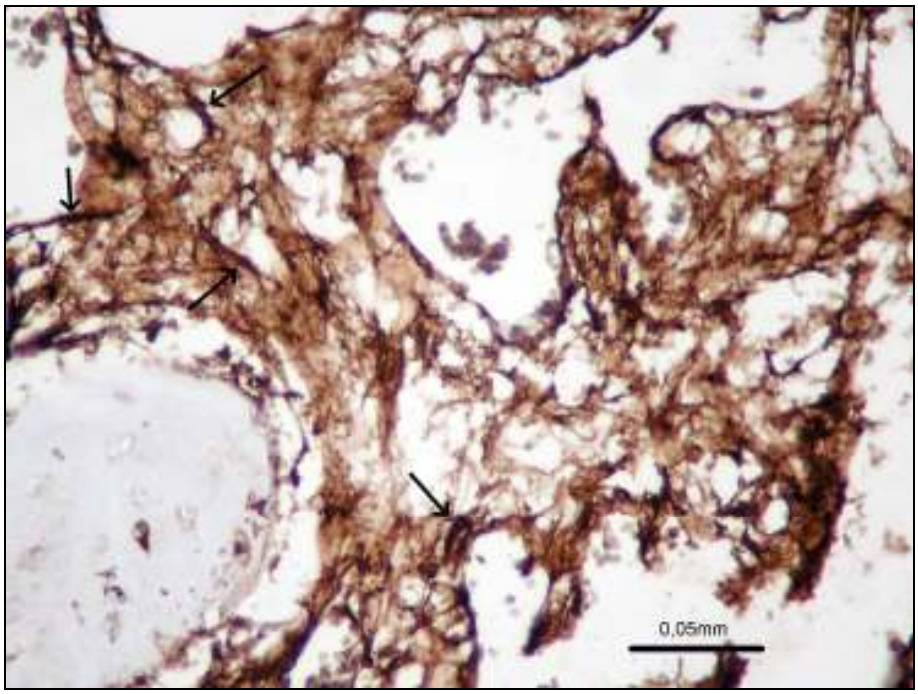
Tablo 4.4. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki fibroblast sayıları

FİBROBLAST SAYISI	N	AO	SS	O	ÇS	Z	P
Kontrol	8	12.87	2.99	12	1	-1.228	0.232
Eritropoetin	7	14.71	2.56	15	2.5		

N:her bir gruptaki eleman sayısı AO:Aritmetik ortalama SS:Standart Sapma O:Ortanca ÇS:Çeyrek Sapma Z: Mann-Whitney U testi değeri



Grafik 4.4. Gruplar arasında fibroblast sayısının dağılımı



Şekil 4.8. Yeni oluşan kemik bölgesindeki fibroblastların görüntüsü (FGF)

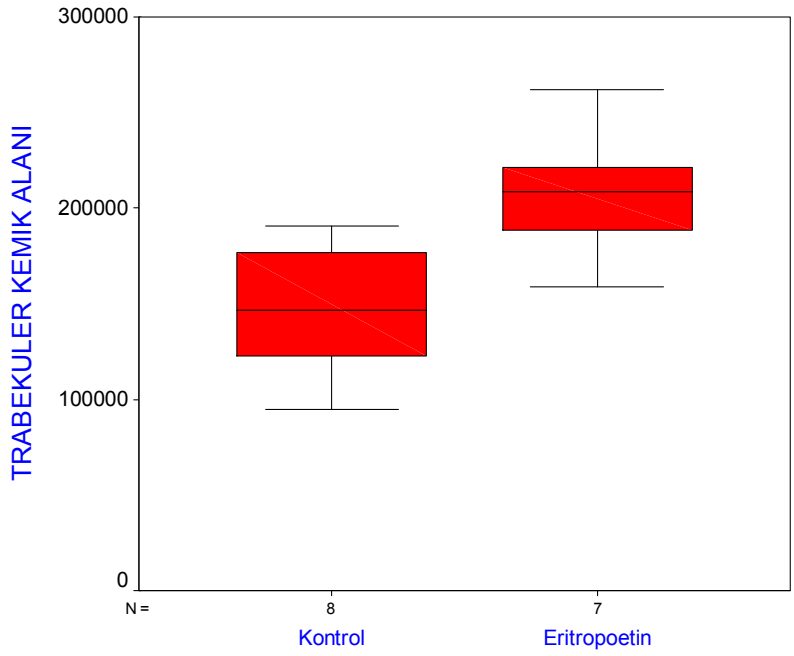
4.1.5. Yeni oluşan kemik bölgesindeki trabeküler kemik alanı

Deney ve kontrol gruplarındaki yeni oluşan kemik bölgesi ışık mikroskopik olarak incelendiğinde deney grubunda belirgin olarak damarlaşma ile osteoblastik aktivitenin artmış, osteoklastik aktivitenin ise azalmış olduğu görülüyordu. Bunun sonucunda, deney grubunda kontrol grubuna göre düzenli kemik yapımı görülüyordu. Her iki gruptaki birim alanda (450000 μm^2) bulunan trabeküler kemik alanları incelendiğinde, rHuEPO verilen grupta bu alan 208701±36694 μm^2 iken, kontrol grubunda 146541±315776 μm^2 olarak belirlendi. Rakamlardan da anlaşılacağı gibi, rHuEPO verilen grupta kontrol grubuna göre daha fazla trabeküler kemik alanı vardı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo 4.5). Gruplar arasında yeni oluşan kemik bölgesindeki trabeküler kemik alan dağılımı Grafik 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki trabeküler kemik alanları

TRABEKÜLER KEMİK ALANI	N	AO	SS	O	ÇS	Z	P
Kontrol	8	147265.63	33469.91	146541	-31576	-2.662	**0.006**
Eritropoetin	7	207136.57	34311.61	208701	36694		

N:her bir gruptaki eleman sayısı AO:Aritmetik ortalama SS:Standart Sapma O:Ortanca ÇS:Çeyrek Sapma Z: Mann-Whitney U testi değeri



Grafik 4.5. Gruplar arasında trabeküler kemik alan dağılımı

4.1.6. Yeni oluşan kemik bölgesindeki kollajen lif sayısı

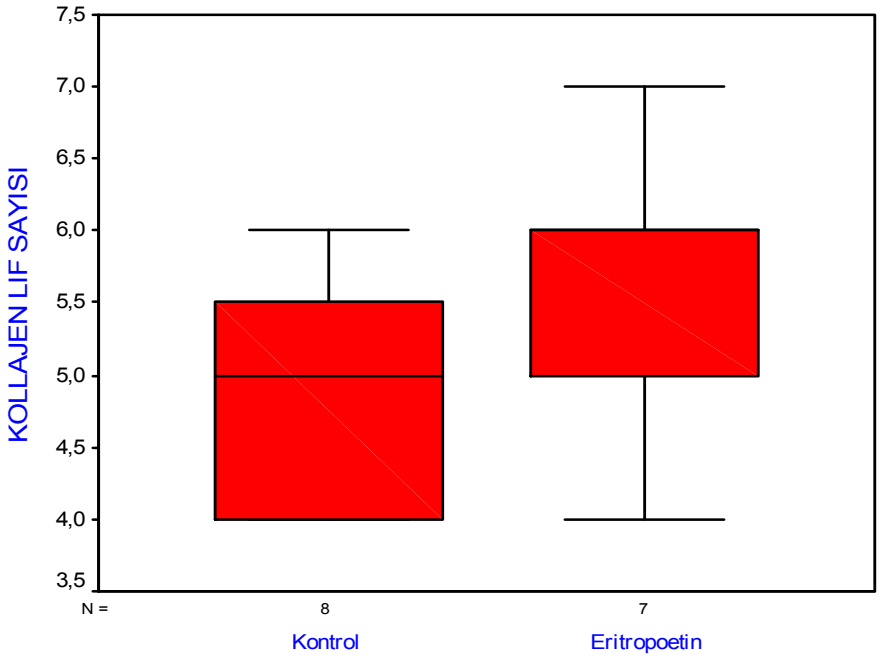
Yeni oluşan kemik sahasındaki kollajen liflerin değişiklikleri kıyaslandığında, rHuEPO verilen grupta birim alanda (450000µm^2) kollajen lif sayısı 6±0.5 iken kontrol grubunda bu sayı 5.0±0 olarak belirlendi. İstatistiksel olarak incelendiğinde iki grup arasında fark olmamasına rağmen deney grubunda kollajen lif sayısı daha fazlaydı

(p>0.05) (Tablo 4.6). Gruplar arasındaki kollajen lif sayısı dağılımı Grafik 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.9'da yeni oluşan kemik sahasındaki kollajen lifleri görülmektedir.

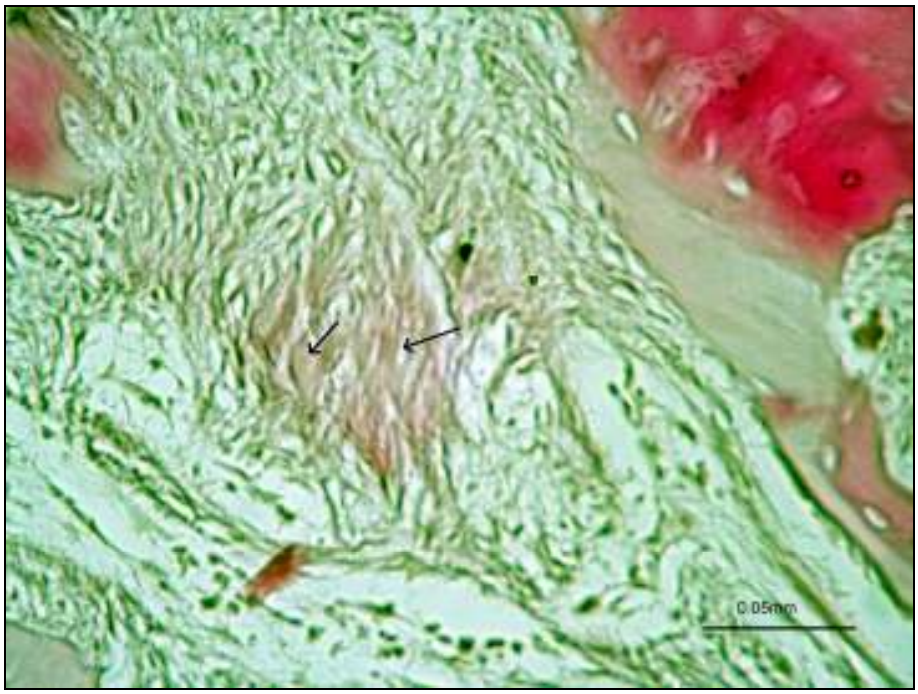
Tablo 4.6. Kontrol ve deney gruplarında yeni oluşan kemik bölgesindeki kollajen lif sayıları

KOLLAJEN LİF SAYISI	N	AO	SS	O	ÇS	Z	P
Kontrol	8	4.87	0.83	5	0	-1.395	0.189
Eritropoetin	7	5.57	0.97	6	-0.5		

N:her bir gruptaki eleman sayısı AO:Aritmetik ortalama SS:Standart Sapma O:Ortanca ÇS:Çeyrek Sapma Z: Mann-Whitney U testi değeri



Grafik 4.6. Gruplar arasında kollajen lif sayısının dağılımı



Şekil 4.9. Yeni oluşan kemik sahasındaki kollajen liflerin görüntüsü (Von Gieson's)

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Distraksiyon Osteogenezisi (DO), bilinçli bir osteotomiyi takiben kemiğin distal ve proksimal uçlarının günde belli bir oranda çekilmesiyle kallusun indükte edilmesi ve dolayısıyla yeni kemik oluşturma yöntemidir. Ortopedik cerrahideki uygulamaların ardından maksillofasiyal bölgede de başarıyla uygulanması DO'ya olan ilgiyi giderek arttırmıştır. Mandibula ilerletmesi (Diner ve ark 1997), dudak-damak yarıklı hastalarda maksiller ilerletme (Cohen ve ark 1997), hızlı dental ve dentoalveoler hareket (Liou ve Huang 1998, Kişnişci ve ark 2002), orta yüz ve maksillanın ilerletilmesi (Cedars ve ark 1999), sinüs tabanı yükseltilmesi ile kombine anterior maksiller ilerletme (Gaggl ve ark 2005), kret ogmentasyonu amacıyla vertikal alveoler distraksiyon (Uçkan ve ark 2002a-2002b, Raghoebar ve ark 2000-2002, Racmiel ve ark 2001), dentoalveoler transport DO ile alveol yarık rekonstrüksiyonu (Dolanmaz ve ark 2003) gibi çeşitli endikasyonlarda başarıyla uygulanmıştır.

DO'nun başarısında biyolojik ve biyomekanik faktörler önemli rol oynar. Son zamanlarda DO hakkındaki araştırmalar bu konulara yoğunlaşmıştır (Yeung ve ark 2002, Yates ve ark 2002, Loboa ve ark 2004, McTavish ve ark 2000). Bununla birlikte DO hakkındaki araştırmalar; a)osteotomi tekniklerinin modifikasyonu (Bell ve ark 1997), b) distraksiyon aygıtlarının geliştirilmesi (Ploder ve ark 1999) , c) distraksiyon protokolünün geliştirilmesi (Al Ruhaimi 2001a) d)preoperatif planlamaların yapılabilmesi (Kofod ve ark 2005), e) distraksiyona bağlı yeni kemik oluşumu ve şekillenmesinin izlenme tekniklerinin gelişmesi (Nocini ve ark 2002, Roth ve ark 1997, Troulis ve ark 2003) f)büyüme faktörleri ve sitokinler gibi farmakoloik ajanlarla yeni kemik oluşumunun hızlandırılması (Terheyden ve ark 2003, Okazaki ve ark 1999) üzerine yoğunlaşmıştır.

Distraksiyon uygulaması esnasında yeni kemik formasyonunun düzenlenebilmesi, gelecekteki kraniofasiyal uygulamalara yeni bir bakış ve yorum getirebilir. Bu yüzden

araştırmacıların bir kısmı, distraksiyon aygıtlarının modifikasyonu ile distraksiyon oran ve ritminin idealizasyonuna yönelik çalışmalar yaparken (Ploder ve ark 1999, Al Ruhaimi 2001a) bir kısmı ise yeni kemiğin oluşmasını hızlandırıp tedavi süresini kısaltmaya yönelik; a)progenitör hücrelerin transplantasyonu (Kitoh ve ark 2004), b)büyüme faktörleri, hormonlar ve bifosfonatların uygulanması (Rauch ve ark 2000, Bail ve ark 2002, Little ve ark 2003) ve c)demineralize kemik matriksi, kalsiyum sülfat ve elektrofizyolojik aletlerin kullanılması (Hagino ve Hamada 1999, Al Ruhaimi 2001b, Hagiwara ve Bell 2000) gibi çeşitli çalışmalar yapmıştır.

Günümüzde distraksiyon sürecinde yeni oluşan kemiğin yeterli radyolojik görüntülenmesi mümkün olmadığı için distraksiyonun oran ve ritminin arttırılmasıyla oluşturulan yeni kemiğin değerlendirilmesi zordur. Bu durumda, histolojik değerlendirmelerin yapılabileceği deneysel çalışmalara olan ihtiyaç açıktır.

Son yıllarda, kemik iyileşme çevresine *recombinant human osteogenic protein-1* (rhOP-1) (Terheyden ve ark 2003) ve *insulin-like growth factor* (IGF) (Stewart ve ark 2000) gibi büyüme faktörleri eklenmesi ile kemik iyileşmesinin hızlandırıldığı gösterilmiştir. Kitoh ve ark (2004), DO esnasında distrakte sahaya kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreleri ve trombositten zengin plazmaları transplante ettikleri akondroplazili iki hasta ile konjenital psödoartrozisli bir hasta olmak üzere toplam üç vakanın ön sonuçlarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, mezenşimal kök hücreleri transplantasyonu uygulamadıkları 16 femur ve 14 tibia uzatması gerçekleştirdikleri toplam 8 akondroplazili hastayı kontrol grubu olarak belirlemişlerdir. Deney grubundaki hastalarda yaş ortalamasının daha düşük olmasına rağmen daha fazla kemik uzunluğu elde edilerek daha kısa sürede iyileşme belirtileri gözlenmiştir. Araştırmacılar, sınırlı sayıda vakada ön klinik sonuçlar olmasına rağmen, DO esnasında trombositten zengin plazma ile birlikte kemik iliği kaynaklı osteoblast benzeri hücrelerin transplantasyonunun

komplikasyonları azaltarak yeni kemik formasyonunu hızlandırdığını ve tedavi süresini kısalttığını belirtmişlerdir.

Okazaki ve ark (1999), tavşan modelinde yaptıkları bir çalışmada rekombinant insan *fibroblast growth factor-2* (FGF-2)' nin tek lokal enjeksiyonunun özellikle distrakte kallusun pekiştirme dönemi üzerine olmak üzere DO'ya etkisini araştırmışlardır. Osteotomiden 10 gün sonra günde 1.4 mm toplam 7 gün distrakte edilip toplam 9.8 mm uzunluk elde edilmiştir. Deney grubuna aktivasyonun son gününde kallusun içerisine 150 mikrogram serum fizyolojik içerisinde 200 mikrogram rekombinant insan FGF-2 enjekte edilip kontrol grubuna hiçbir şey verilmeden enjeksiyon yapılmıştır. Araştırmacılar, FGF-2 enjeksiyonunun ikinci haftada kemik oluşumu üzerine önemli bir etki meydana getirdiğini, yeniden şekillenme döneminin deney grubunda daha erken başladığını ve 5. hafta sonunda deney grubunun kontrol grubuna göre iki kat daha fazla kemik mineral içeriğine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Hızlı ve uzun distraksiyonun yapıldığı, kemik oluşmasının zor olduğu bu ağır şartların bulunduğu durumlarda FGF-2'nin kemik formasyonunu stimüle ettiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmadaki FGF-2'nin kemik oluşması üzerine doğrudan etkisinin ya mezenşimal hücre proliferasyonunu stimüle ederek ya da az farklılaşmış progenitör hücrelerden kemik hücrelerinin oluşmasını gerçekleştirerek yaptığını ve ekledikleri mezenşimal hücrelerin daha sonra farklılaşacağını veya diğer prekürsör hücrelerin farklılaşmasını destekleyeceğini iddia etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca FGF'nin bu etkisini kemik oluşumu dizisinin bir seri akışını meydana getiren prostoglandinler, endojen FGF, *transforming growth factor-beta* (TGF-β) ve *bone morphogenetic protein* (BMP)'ler gibi diğer faktörlerin lokal üretimini stimüle ederek yapabileceğini bu yüzden FGF'nin bir sırayla faktörlerin ortaya çıkmasını sağlayarak kemik oluşum dizisinin geç evrelerindeki olayların akışını başlatan bir faktör olarak rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak distrakte kallusun merkezine

FGF-2 nin tek lokal enjeksiyonunun kemik oluşumunu uyararak pekiştirme dönemini azalttığını ve FGF'nin klinik olarak DO'nun süresini kısaltmada yararlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Rauch ve ark (2000), DO sırasında lokal olarak verilen TGF-β1'in osteojenik oluşumları uyarabileceği üzerine bir hipotez kurup 61 adet iskeletsel olarak olgun, erkek, beyaz Yeni Zelanda tavşan modelinde araştırma yapmışlardır. Bütün tavşanların sol tibialarına osteotomi yapılıp 42 tanesine subkütan olarak miniozmotik pompa yerleştirildikten sonra diğer tavşanlar kontrol grupları olarak hizmet etmişlerdir. 7 günlük latent dönemden sonra toplam 3 hafta boyunca 12 saatte bir 0.25 mm olmak üzere distraksiyon başlatılmıştır. Distraksiyonun başlamasıyla bu subkütan olarak yerleştirilen miniozmotik pompanın katateri vasıtasıyla osteotomi bölgesine 0, 10, 20, ve 40 mg/gün dozlarında dört farklı şekilde TGF-β1 uygulanmıştır. Tavşanların bir kısmı distraksiyon döneminin sonunda bir kısmı ise 3 hafta sonra öldürülerek histolojik, densitometrik ve biyomekaniksel olarak değerlendirilmiştir. TGF-β1 tedavisi distraksiyon aralığındaki kemik mineral yoğunluğuna ve histolojik olarak kemik miktarına bir etkisi belirlenmemiş fakat kallus bölgesindeki fibröz doku miktarını arttırmıştır. Aksiyal olmayan çekme kuvvetlerinde kırılma dayanıklılığı TGF-β1 ile tedavi edilen tavşanlarda daha düşük bulunup sonuçta DO esnasında TGF-β1 ile tedavi bu modelde başarısız bulunduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar bu bulguları çeşitli şekilde yorumlamışlardır; a)çalışmadaki dozun bir etki gerçekleştirmek için çok düşük olduğu, b)TGF-β1 bir etkiye sahip olabilecekken ameliyat bölgesine ulaşmadığı, c)distraksiyon ile yeni kemiğin oluşumunu TGF-β1'in uyarmadığı. Araştırmacılar DO esnasında ilk oluşan doku olan fibröz doku barlarının yeni kemik formasyonu için osteokondüktif yüzey olarak hizmet ettiklerini belirtmişlerdir. Bu yüzden TGF-β1'in bütün doku tamir cevabını düzenleyen fibrogenezisi arttırdığını iddia edip, bu durumu biyomekanik testlerde deney grubunun daha düşük

direnc sahip olmasıyla açıklamışlardır. Bu yüzden TGF-β1'in yara iyileşmesini geciktirir gibi gözüktüğünü ve endojen TGF-β1 in yaptığı etkiyi eksojen eklenen TGF-β1'in yapmadığını belirtmişlerdir.

Clark ve ark (2006), radyasyon gören tavşan mandibulalarının distraksiyonu esnasında kemik rejenerasyonu üzerine hiperbarik oksijen (HBO) tedavisinin etkisini değerlendirmişlerdir. 20 adet Yeni Zelanda tavşanı 4 gruba ayrılmıştır; 1. grup kontrol, 2. grup preoperatif olarak radyasyon tedavisi alanlar, 3. grup preoperatif ve postoperatif olarak HBO tedavisi alanlar ve 4. grup preoperatif radyasyon tedavisi ile birlikte preoperatif ve postoperatif HBO tedavisi alanlar. Bütün tavşanların sol mandibulalarına distraksiyon aygıtı yerleştirilip kortikotomi yapılıp 3 gün latent dönemden sonra toplam 14 gün günde bir tur olmak üzere 1 mm/gün oranında distraksiyon başlatılmıştır. HBO tedavisi dikkate alınmadan yapılan histomorfometrik analizde, radyasyon tedavisi almayan gruplarda radyasyon alan gruplara göre yeni kemik dolgusunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Gruplar bağımsız olarak değerlendirildiğinde, sadece HBO tedavisi alan grupta yeni kemik oluşum yüzdesi en yüksek olmasına rağmen sadece radyasyon alan grupta en düşük olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar distraksiyon bölgesine radyasyonla birlikte HBO tedavisi alan grup ile sadece radyasyon alan grup kıyaslandığında kemik dolgu yüzdesi ve kemik mineral yoğunluğu yüzdesi açısından fark olmadığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca HBO almadan sadece radyasyon alan grupta distraksiyon bölgesinde yeni kemik yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli miktarda düşük olduğu görülmüştür. Araştırmacılar sonuç olarak radyasyon alan kemiklerde HBO tedavisi eklense bile DO kullanımını desteklemediklerini ve radyasyon alan kemiklerde rekonstrüktif araç olarak HBO nin tam tedavi potansiyelinin ileri araştırmalar gerektirdiğini belirtmişlerdir. Muhonen ve ark (2002), yaptığı benzer bir çalışmada, bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu

olarak radyasyonla bozulmuş mandibular kemik dokusunun DO esnasında osteojenik aktiviteyi arttırmada HBO tedavisinin önemli bir etkisinin olmadığı göstermişlerdir.

Terheyden ve ark (2003), 7 adet fare mandibulasında bilateral uyguladıkları DO esnasında BMP-7 olarak da bilinen rhOP-1 uygulamasının pekiştirme süresini kısaltabilme ve yeni oluşan kemiğe yükleme kapasitesini attırabilme etkisini değerlendirmek için hayvan deneyi yapmışlardır. Latent dönemden sonra distraktör toplam 4.9 mm distraksiyon aralığı elde edilinceye kadar 7 gün boyunca günde 0.7 mm aktive edilmiştir. Aktivasyon döneminin sonunda 1. ve 2. gün, 20 mikrogram asetat tampon içerisinde 50 mikrogram rhOP-1, mandibulanın sol tarafındaki deney bölgesindeki kallus içerisine enjekte edilmiştir. Sağ mandibuladaki DO ise kontrol olarak belirlenip bu bölgedeki kallus içerisine 20 mikrogram asetat tampon plasebo solüsyonu olarak verilmiştir. Araştırmacılar rhOP-1 enjekte edilen taraftaki maksimum yüklemenin plasebo tarafındakine göre önemli derecede yüksek olduğunu ve deney tarafında bütün vakalarda mikroradyografik olarak distraksiyon vektörüne paralel olarak sürekli kemik köprüleri görülmesine rağmen kontrol tarafında bütün vakalarda kapanmayan aralıklarla beraber küçük kemik köprüleri görülmüştür. Araştırmacılar rhOP-1'nin kallus maturasyonu üzerindeki bu etkisini fraktür aralığında bulunan hücre populasyonunu etkileyerek ve kallus içerisindeki osteoblastik hücre sayısını arttırarak yaptığı şeklinde açıklamaktadırlar. Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda, aktivasyon döneminden sonraki 1. ve 2. günde kallus içerisine iki tekrar eden rhOP-1 enjeksiyonun kallus olgunlaşmasını hızlandırabileceğini ve klinik olarak aktivasyondan sonra rhOP-1 ile kallusu pekiştirerek tahminen 4 hafta sonra distraktörü çıkarmanın mümkün olabileceğini, ayrıca bu faktörün insan üzerinde faydası kanıtlandığı zaman, arzu edilen pozisyonda uzun süre beklemiş kallusları tedavi etmek için bir katalizör gibi kullanılabileceğini belirtmektedirler.

Eckardt ve ark (2002), bir tavşan modelinde yaptıkları bir araştırmada sağ tibial DO'da *vascular endothelial growth factor* (VEGF), VEGF inhibitörü ile plasebo gruplarını kıyaslayarak terapötik anjiogenezisin ortopedik uygulamalarda kullanılabilir olup olmadığını ve DO esnasında anjiogenezisin ekzojen stimülasyonunun yeni oluşan kemik formasyonunu arttırıp arttırmadığını araştırmışlardır. Araştırmacılar, yeni oluşan kemiğin mineral yoğunluğu, bükülme dayanıklılığı ve histomorfometrik parametreler açısından VEGF, VEGF inhibitör grupları arasında fark olmadığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar DO sırasında VEGF ile VEGF inhibitörünün yeni oluşan kemikteki kan akımına etkisinin çok az olduğunu veya hiç olmadığını aynı zamanda distraksiyon yapılmayan bölgedeki kemikte VEGF'nin kan akımını hızlandırmasına rağmen VEGF inhibitörünün kan akımını azalttığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak DO esnasında kemik oluşumunu hızlandırmada VEGF'yi tavsiye etmemişlerdirler.

Subaşı ve ark (2001), deney grubunda 12 adet ve kontrol grubunda 11 adet olmak üzere toplam 23 adet Yeni Zelanda tavşanlarında yaptıkları bir çalışmada DO sonucunda oluşan yeni kemik dokusu üzerine kemoterapötik ajanların etkinliğini radyolojik, histolojik ve sintigrafik olarak değerlendirmişlerdir. Deney grubuna osteosarkomanın tedavi protokolüyle aynı şekilde 8 g/m² yüksek doz methotrexate infüzyon yoluyla kulak veninden verilmiştir. Bu protokol uygulandığı dönemde tavşanlara tibial DO uygulanmıştır. İki grup arasında distraksiyon döneminden önce ve distraksiyondan sonra yapılan radyolojik, sintigrafik ve histopatolojik bulgular açısından fark olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışma sonunda, tavşanlarda tümör rekonstrüksiyonu için uygulanan DO esnasında antineoplastik ilaçların kullanımının yeni kemiğin oluşumuna negatif etkisi olmadığı belirtilmiştir.

DO esnasında pamidronat (Little ve ark 2001) ve zoledronik asit (Little ve ark 2003, Pampu 2005) gibi bifosfanatların uygulanması ile yeni oluşan kemik miktarında

artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Williams ve ark (2001), yaptığı çalışma sonucunda pamidronatın dozunun onda bir dozunda kullanılan zoledronik asitin kemik mineral içeriğini arttırma açısından pamidronattan daha potansiyel etkiye sahip olduğunu ve pamidronat grubunda nefokalsinozis görülmesine rağmen zoledronik asit grubunda nefrokalsinozisin hiç görülmediğini belirtmiştir. Bifosfonatlarla ilgili yapılan diğer bir çalışmada zoledronik asitin DO sırasında normal ve yeni oluşan kemiğin mekanik dayanıklılığını arttırdığı belirtilmiştir (Bilston ve ark 2002).

Farklı sebeplerle ortaya çıkan aneminin tedavisinde kullanılan EPO eritrosit sayısını çoğaltır ve dolayısıyla dokuların oksijenizasyonu arttırıcı etki sağlar. Son dönemlerde yara iyileşmesini de arttırıbileceği düşüncesi ortaya atılmış ve birçok çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmaların tamamı yumuşak dokuya ait farklı yara modellerinde yapılmıştır. Literatürde EPO'nun sert doku iyileşmesi veya DO'da kullanımına ilişkin herhangi bir çalışma yoktur.

Deneysel çalışmalar, farklı havyan modellerinde kraniomaksillofasiyal DO'nun biyolojik ve biyomekanik prensiplerini daha iyi anlamak için ve insan kraniofasiyal iskeletine DO uygulamasının temellerini oluşturmak için yapılmıştır. Deneysel çalışmalarda tavşan kullanılması; a) barınma ve beslenme maliyetlerinin düşük olması ve b) distraksiyonun aktif döneminde sedasyona gerek duyulmayarak müdahalenin kolay uygulanabilirliğinden dolayı tercih edilmiştir. Bununla birlikte insana benzer sert ve yumuşak doku cevabı vermesi, metabolizma hızının insana göre oldukça hızlı olması ve kısa sürede çalışma sonuçlarının alınması diğer önemli avantajlarıdır (Swennen ve ark 2002). Bütün bu nedenler göz önünde bulundurularak bu çalışmada model olarak tavşan tercih edilmiştir.

Bilindiği gibi distraksiyon; osteotomi, latent dönem, aktivasyon dönemi, pekiştirme dönemi ve yeniden şekillenme dönemi olmak üzere beş safhadan oluşmaktadır.

DO'nun en önemli ve hassas safhalarından birisi, kemiğin cerrahi olarak ayrıldığı osteotomi safhasıdır. Endosteumu ve periosteumu koruma zorunluluğu olan kortikotomi ile yapılan orjinal İlizarov yönteminin (Ilizarov 1989) insan kranimaksillofasiyal iskeletinde önemli olmadığı ve hatta küçük aygıtların kullanılması nedeniyle yöntemin sonuçlarının tahmin edilebilirliğini güçleştirdiği düşünülmektedir (Delloye ve ark 1990, Yasui ve ark 1999, Frierson ve ark 1994). Bununla birlikte, Frierson ve ark (1994), testere ile yapılan osteotominin damar yapısının daha geç oluşmasına ve uzun pekiştirme dönemine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Latent dönem süresi, kallus distraksiyonunu etkileyen en büyük faktörlerden biridir. Tavakoli ve ark (1998), koyun mandibulalarında latent dönem sürelerini değiştirerek bu sürenin etkilerini incelemişlerdir. 0, 4 ve 7 günlük latent dönem sürelerini kullanarak, yeni oluşan kemiği histolojik, densitometrik ve mekaniksel olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, osteodistraksiyon esnasında farklı latent dönemlerinin, yeni oluşmuş kemiğin kalite ve miktarını etkilemediğini göstermiştir. Troulis ve ark (2000), mandibular DO esnasında latent dönemin etkisini değerlendirmek için bir domuz modeli kullanmışlardır. Bu çalışmanın sonuçları, 0 ve 4 günlük latent dönemler arasında fark olmadığını gösterip mandibula distraksiyonunun latent dönemsiz başarıyla yapılabileceğini işaret etmiştir. Aida ve ark (2003), mandibular DO sırasında ideal latent dönem süresini belirlemek için bir tavşan çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada 0, 2, 5 ve 10 günlük latent dönemler kullanılmıştır. Her bir latent dönem süresinden sonra, 12 saatte bir 0.25 mm olmak üzere günde 0.5 mm ve toplam 5 mm distraksiyon gerçekleştirmişlerdir. İncelemeler aktivasyon döneminden hemen sonra yapılmıştır. Latent dönemsiz ve 2 günlük grupta distraksiyon aralığının fibröz dokuyla dolduğu, 10 günlük latent dönemde istenen klinik uzunluğun elde edilemeyip distraksiyonun zorlaştığı ve 5 günlük latent dönemde ise distraksiyon aralığının zengin yeni kemik trabekülleriyle dolduğu gözlenmiştir. Tavşan

mandibular distraksiyonunda 5 günlük latent dönemin ideal olduğunu ve bu sürenin insanda 7 günlük latent döneme karşılık geldiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, incelemenin pekiştirmenin hemen başında yapılmış olması sonuçların güvenilirliği hakkında şüphe oluşturmaktadır. DO tedavi süresini kısaltmayı hedefleyen bu çalışmada, literatürde kabul gören en kısa bekleme sürelerinden biri olan 2 günlük latent dönem kullanılmıştır.

Kallus distraksiyonunu etkileyen diğer ana unsurlar distraksiyon oranı ve ritmidir. Kraniofasiyal iskeletin uzatılması için günde 1 mm distraksiyon oranı yaygın olarak kabul edilmiştir. McCarthy ve ark (1992)'nın yaptığı çalışmaya uygun olarak çoğu kranifasiyal kemik uzatmaları günde 1 mm olarak yapılmıştır. Stewart ve ark (1998), tavşanlarda 12 saatte bir 0.5 mm olmak üzere 15 gün boyunca günde 1mm ve 12 saatte bir 1.5 mm olmak üzere 5 gün boyunca günde 3 mm distraksiyon oranlarını kullanarak ekstraoral bilateral mandibular distraksiyon yöntemini uygulamışlardır. Kemik densitometri ve mekaniksel test verileri 1 mm uygulanan grup ile 3 mm uygulanan grup arasında fark olmadığını göstermesine rağmen histolojik bulgular 3 mm gibi yüksek distraksiyon oranlarında yeterli kemik birleşiminin gerçekleşemediğini göstermiştir. Bu histolojik sonuçlar önceden rapor edilen köpek tibia modelindeki (Ilizarov 1989a, 1989b) bulgularla uyumlu olup bacaktaki gibi mandibulada DO esnasında ideal oranın günde 1mm olabileceğini göstermektedir (Stewart ve ark 1998, Troulis ve ark 2000). Al Ruhaimi (2001a), 24 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanarak yaptığı çalışmada farklı oran ve ritimlerde toplam 10 mm distraksiyon uygulayarak osteogenezisi incelemiştir. Hayvanlar her birinde 6 tavşan olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. 3 günlük latent dönemden sonra 1. grup günde iki kez 0.5 mm olmak üzere toplam 1 mm, 2. grup günde tek seferde toplam 1mm, 3.grup günde iki kez 1mm olmak üzere toplam 2mm ve 4. grup günde tek seferde 2 mm distrakte edilmişlerdir. Altı hafta pekiştirme süresinden sonra yapılan histolojik incelemede kullanılan oranlar arasında

günde 1mm'lik oranda distrakte edilen gruplarda en iyi osteogenezis olduğunu ve günde bir kez bir mm ile günde iki kez 0.5 mm' lik oranlar arasında önemli bir fark olmadığını gözlemişlerdir. Bununla birlikte, günde iki kez 1mm uygulanan grupta tamamlanmamış osteogenezis ve günde tek seferde 2 mm uygulanan grupta fibröz birleşme ile sonuçlanmıştır. Tavşan modelinin kullanıldığı bu çalışmada da Al-Ruhaimi'nin (2001a) sonuçları göz önüne alınarak uzatma oranı ve ritmi 12 saat arayla 0.5 mm olarak belirlenmiştir.

Mandibular uzatmadan sonra pekiştirme döneminin ideal süresini belirlemek için çok az çalışma yapılmıştır. Smith ve ark (1999), 12 adet iskeletsel olarak olgun köpekte yaptığı bir çalışmada 7 günlük latent dönemden sonra 12 saatte bir 0.5 mm olmak üzere günde 1mm distraksiyon uygulayarak 4, 6 ve 8 haftalık pekiştirme dönemlerini karşılaştırmışlardır. Dört haftalık grupta 6 ve 8 haftalık gruba göre yeni oluşan kemik yoğunluğunun önemli miktarda düşük olduğunu gözlerken, 6 ve 8 haftalık gruplar arasında herhangi bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak en az pekiştirme döneminin 10 mm yeni kemik için 6 hafta olması gerektiğini önermişlerdir. Bu süre köpek modelleri için 6-8 hafta (Smith ve ark 1999, Cope ve Samchukov. 2000) olmasına rağmen yapılan bir literatür araştırmasında tavşan modellerinde en fazla uygulanan pekiştirme süresinin 4 hafta olduğu ve bu sürenin pekiştirme için yeterli olduğu belirtilmiştir (Swennen ve ark 2002). Bu çalışmada literatür araştırmasıyla uyumlu olarak pekiştirme süresi 4 hafta olarak uygulanmıştır.

McMahon ve ark (1990) çeşitli dozlarda rHuEPO'nun farmakokinetiğini ve etkisini araştırmak için sağlıklı gönüllü bireyler üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Toplam 32 erkek gelişigüzel dört eşit gruba ayrılarak 1.gruba 150 IU/kg rHuEPO subkütan, 2.gruba 150 IU/kg rHuEPO intravenöz, 3.gruba 300 IU/kg rHuEPO subkütan ve 4. gruba 300 IU/kg rHuEPO intravenöz olarak uygulanmıştır. Ayrıca her gruptaki iki birey plasebo

olarak karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, subkütan enjeksiyonla serum EPO konsantrasyonlarının yükselmesinin uzun süreli olmasından dolayı, enjeksiyon öncesi serum EPO konsantrasyonunun, 48 saatte bir subkütan olarak uygulanmasının, aynı dozun intravenöz olarak uygulanmasından daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca birkaç dozdan sonra 150 IU/kg ve 300 IU/kg dozların her ikisinde serum EPO konsantrasyonları açısından benzer seviyeler elde edildiği belirtilmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak bu çalışmada 150 ve 300 IU/kg rHuEPO uygulamasının güvenli olduğunu, hemodinamik parametrelerde anlamlı değişiklikler gözlenmediğini, subkütan uygulamada absorbsiyonunun yavaş olmasıyla birlikte düşük serum seviyelerini 48 saat korumasına rağmen intravenöz uygulamada serum seviyelerinde 18-24 saat sonra aşırı düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan başka bir insan çalışması sonucunda, rHuEPO'nun subkütanöz enjeksiyonunun en tatmin edici yol olduğu belirtilmiştir (Mcdougall ve ark 1989). Buna karşın Cheung ve ark (2001) sağlıklı gönüllü insanlar üzerinde yaptıkları bir araştırmada, haftada bir subkütan uygulanan 40.000 IU dozun haftada üç kez subkütan 150 IU/kg uygulanan doza klinik olarak eşit eritropoetik cevap oluşturduğunu belirtmişlerdir. McMahon ve Mcdougall'in yaptıkları çalışmayla uyumlu olarak sunulan çalışmada rHuEPO 150 IU/kg dozunda, 48 saatte bir ve subkütan olarak uygulanmıştır. Ayrıca uygulama primer kallus oluşumunun gerçekleştiği latent dönem ve kallusun uzatıldığı aktivasyon dönemini kapsayacak şekilde dört kez tekrarlanmıştır. Bu dönemler vasküler yapıların oluştuğu ve çoğaldığı dolayısıyla oksijenizasyona ihtiyacın yüksek olduğu dönemlerdir.

Jaquet ve ark (2002), koroner bypass cerrahisi esnasında elde ettikleri myokard doku örneklerini fibrin jel içine yerleştirip 21 gün kültürde bekleterek immünohistokimyasal ve PCR analizle rHuEPO'nun anjiogenik etkisini, VEGF ve aFGF gibi diğer sitokinler ile kıyaslamışlardır. Araştırmacılar rHuEPO nın hiçbir büyüme faktörü

uygulanmayan kontrol grubuna göre endotelyal hücre büyümesini 12-24 saat daha erken başlattığını ve daha hızlı yaptığını göstermişlerdir. Sadece rHuEPO uygulamasının kapiller büyümeyi %220, sadece VEGF uygulamasının %230 arttırdığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar EPO ve VEGF nin eşit anjiogenik potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir.

Fearon ve Weinthal (2002), kraniosynostozis sendromlu bebeklerde ve küçük çocuklarda cerrahiden önce rHuEPO uygulamasının kan transfüzyon oranını azaltıp azaltmadığını ve bu hastalarda haftada bir dozluk uygulamanın güvenliği ile etkinliğini ileri dönük gelişigüzel yaptıkları bir çalışmada araştırmışlardır. Araştırmacılar, yeni doğan bebeklerde ve küçük çocuklarda kraniosynostozis tedavilerinde preoperatif üç hafta boyunca haftada bir doz EPO uygulamasıyla hemoglobin seviyesinin yeterince yükselerek kan transfüzyon oranının EPO almayan kontrol grubuna göre çok düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca çocuklarda haftada bir dozluk uygulamanın haftada üç günlük doz olan standart uygulamadan daha güvenli ve etkili olduğunu düşündüklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmanın ve diğer cerrahi alanlarındaki yayınlanan çalışmaların sonuçlarını temel alarak, kraniosynostozis tedavisi gerektiren bebeklerin ve çocukların ailelerine haftada bir dozluk preoperatif EPO uygulamasını rutin olarak tavsiye etmektedirler.

Buemi ve ark (2002), 51 fare üzerinde yaptıkları bir çalışmada, dorsal bölgedeki random paternli iskemik fleplerde rHuEPO'nun iyileşmeye ve yeniden damarlanmaya olan etkisini değerlendirmişlerdir. Kontrol gruplarında deride oluşan özellikle aktif enflamasyon olaylarıyla uyumlu olarak bacak ısısında bir artış olmasına rağmen, rHuEPO ile tedavi edilen gruplarda iskemik bölge ısısında herhangi bir gözlem zamanında önemli bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir. rHuEPO'nun deney grubunda büyük bir inflamatuar hücre göçü ile inflamasyon oluşumunu kontrol grubundan daha erken başlattığını ve daha

hızlı normale döndüğünü gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar rHuEPO nun bu etkisinin deri damarlarına direk aktivitesinden ve bazı adezyon moleküllerinin aktivasyonu boyunca tamir mekanizmasıyla ilişkili hücre hareketinin hızlı ayarlanmasından dolayı olabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, rHuEPO ile tedavi edilen gruplarda yeni oluşan hücrelerin sayısında ve damarların sayısında bir artış bulunmuştur. Araştırmacılar bu çalışma sonucunda, rHuEPO uygulamasının inflamatuar cevabı hızlandırarak, iskemik fleplerde kapiller yoğunluğu arttırarak ve zarar görmüş bölgenin erken tamirine izin vererek erken ve geç safhalarında yara iyileşmesini arttırabileceğini belirtmişlerdir.

Haroon ve ark (2003), fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada doku yaralanmasına fizyolojik cevap olarak yara iyileşmesinde hematopoetik sitokin EPO'nun etkisini incelemişlerdir. Bu in vivo yara iyileşmesi modelinde fibrinle dolu iki tarafı poröz kapalı paketler hayvanlara subkütan olarak yerleştirilmiştir. Bu paket içindeki fibrinler yara iyileşmesinin cevabı olarak yeni kan damarları, makrofajlar ve fibroblastlardan oluşan granulasyon dokusuyla yer değiştirmiştir. Fibrin matriks içine uygulanan lokal eksojen rekombinant EPO granulasyon doku formasyonunu doza bağlı olarak arttırmıştır. Bu çalışmada yara iyileşmesi esnasında endojen EPO'nun fizyolojik rolünü araştırmak için EPO'yu nötralize eden çözünür EPO reseptörü veya anti-EPO antikorları kullanılmış ve yara iyileşmesi olayları esnasında EPO'nun önemli bir rolünü gösteren doza bağlı olarak granulasyon doku inhibisyonu gözlenmiştir. Yara iyileşmesini hızlandıran rekombinant EPO'nun bu yeteneğinin granulasyon doku formasyonu esnasında anjiogenik etkisiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yara iyileşme sürecinde önemli rol oynayan hücrelerden olan makrofajlarda, EPO reseptör sentezi belirgin şekilde bulunmuştur.

Galeano ve ark (2004), yaptıkları bir çalışmada zayıf iyileşmeye sahip genetik olarak diabetik farelerde anjiogenezis ve yara iyileşmesi üzerine rHuEPO'nun kapasitesini değerlendirmişlerdir. rHuEPO'nun VEGF mRNA sentezi ile oluşumunu ve protein

sentezini istatistiksel olarak arttırdığını bulmuşlardır. VEGF üzerine bu etkinin EPO'nun klasik hematopoetik etkisinden kaynaklanmadığını, bu anjiogenik faktörü direk etkileme ve endotelyal hücre mitozisini uyarma yeteneğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda yeni damar oluşumunu gösteren bir işaret olan CD31 mRNA sentezini de arttırdığını bulmuşlardır. Bu çalışmada rHuEPO verilen gruplarda, epidermal rejenerasyon, granulasyon doku kalınlığı ve yeni yapılanan kapiller damarların oluşması gibi histolojik parametrelerde pozitif yönde artış olduğu gösterilmiştir Rejenere olan dokulara ihtiyaç duyduğu oksijen ile besin desteğinin sağlanması ve granulasyon doku oluşumu için önemli olan anjiogenezis, rHuEPO verilen gruplarda belirgin olarak artmıştır. Araştırmacılar, bu çalışmanın sonuçlarının EPO'nun yara iyileşmesinde fizyolojik bir rolü olduğu hipotezini (Haroon ve ark 2003) doğruladığını ve devamlı farmokolojik dozlarda kullanıldığında güçlü anjiojenik etkiye sahip olabileceğini belirtmektedirler.

Buemi ve ark (2004), 21 adet fare üzerinde yaptıkları bir çalışmada iskemik deri yarasının iyileşmesinde ve anjiogenezisinde rHuEPO'nun etkisini değerlendirmişlerdir. İmmünohistokimyasal analizde 3. ve 5. günde mikro damar yoğunluğunun değerlendirilmesinde, rHuEPO ile tedavi edilen insizyonel ve iskemik yara gruplarında rHuEPO uygulanmayan iskemik gruplarına göre istatistiksel olarak artış vardı. rHuEPO verilen iskemik yara grubunda 3. günde çok sayıda endotelyal adacıklı granulasyon dokusu görülmesine rağmen kontrol gruplarında çok az endotelyal adacıklı granulasyon dokusu gözlenmiştir. rHuEPO tedavisi uygulanmayan iskemik yara grubunda 5. günde rHuEPO ile tedavi edilen iskemik yara grubuna göre %30 daha az yeni kapiller olduğu görülmüştür. Onuncu günde granulasyon kollajenden zengin dokuya vekalet ederken gruplar arasında damar yoğunluğu açısından fark olmadığı görülmüştür. Ek olarak rHuEPO uygulamasının basit ve iskemik yaralarda doku kollajen içeriğini arttırdığı belirtilmiştir. İskemik yaralarda rHuEPO uygulaması 3. ve 5. günlerde anjiogenik büyüme faktörü olan VEGF'yi

önemli miktarda arttırırken basit yaralarda çok az arttırmıştır. Bununla birlikte, yaralara rHuEPO uygulamasının, iskemik yaradaki bozulmuş parametreleri geri getirdiğini, rHuEPO' nun sebep olduğu artmış VEGF içeriğinin yeni kapiller damar formasyonu ve kollajen muhteviyatını içeren yara iyileşme parametreleri düşünüldüğünde oldukça etkili olduğunu gözlemişlerdir. Ek olarak, iyileşen dokulara ihtiyaç duyduğu oksijen ile besin desteğinin sağlanması ve granulasyon doku oluşumu için anjiogenezisin önemli olduğu, bunun yanısıra fibroblastik aktivite ile kollajenin sentezi ve olgunlaşması için ise oksijenin önemli olduğu belirtilmiştir. Ayrıca EPO'nun VEGF üzerindeki etkisinin klasik hematopoetik etkisiyle gerçekleşmemiş olabileceğini anjiogenik faktörler üzerine doğrudan uyarıcı etkisiyle ve endotel hücre mitozisini doğrudan uyarma yeteneğinden dolayı olabileceğini belirtmişledir. Araştırmacılar bu çalışmanın sonunda cerrahi boyunca yeterli kan desteğinin önemli olduğunu, doku iskemisinin iyileşmedeki bozulmuş kollajen ve vasküler dengeden sorumlu olduğunu ve rHuEPO uygulamasının neovaskülarizasyon ile dermal rejenerasyonu uyararak yara iyileşmesini hızlandırmaya yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir.

Sonuç: sunulan çalışmada rekombinant insan eritropoetininin, mandibular DO'daki iyileşme üzerine etkileri araştırılmıştır. Deney grubuna rHuEPO postoperatif 48 saatte bir toplam 4 doz 150 IU/kg subkütan olarak uygulanmıştır. Deney ve kontrol grubunda, 2 gün latent dönem, 5 gün toplam 5 mm distraksiyon dönemi ve 28 gün pekiştirme döneminin sonunda yeni oluşan kemik bölgesi histomorfometrik olarak incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre rHuEPO yeni oluşan kemik bölgesinde birim alandaki osteoblast hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa, osteoklast hücre sayısında anlamlı bir azalmaya, fibroblast hücre sayısında anlamlı olmayan bir artışa, damar sayısında anlamlı bir artışa, kollajen lif sayısında anlamlı olmayan bir artışa ve trabekülasyon alanında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu çalışmanın sonuçları yumuşak doku iyileşmesi

üzerine olumlu etkilerine benzer olarak, rHuEPO'nun DO yöntemiyle elde edilen yeni kemik dokusunun kalitesini arttırdığı ve dolayısıyla iyileşme hızını arttırdığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada, eritropoetinin anjiogenezisi uyarıcı etkisi istatistiksel olarak artmış damar sayısını açıklamaktadır. Bununla birlikte fibroblastik aktivite, kollajen sentezi ve olgunlaşması için önemli olan oksijen desteğini eritroid öncü hücreleri uyarıp arttırma etkisi istatistiksel olarak olmasa da artmış fibroblast sayısı ile kollajen lif sayısını açıklamaktadır. rHuEPO damar üzerine bu etkiyi, ya damar endotel hücrelerini ya da VEGF gibi büyüme faktörlerini doğrudan etkileme yoluyla gerçekleştirmektedir. DO esnasında ilk oluşan kollajen lif sayısındaki kısmi artış, yeni kemik oluşumu için osteokondüktif yüzey olarak hizmet ettiklerinden dolayı, eritropoetinin DO'da az da olsa osteokondüktif bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada istatistiksel olarak artmış osteoblast sayısın nedeni, eritropoetinin osteoblastlara farklılaşacak ve çoğalacak pluripotent mezenşimal hücrelerin kemotaksis ve migrasyonunu etkilemesiyle açıklanabilir. Kemik tamiri osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki uyum ile gerçekleştiğinden dolayı bizim çalışmamızda osteoblast sayısı arttığı için osteoklast sayısı azalmıştır. Ayrıca rHuEPO grubunda artmış anjiogenezis, mineralizasyon hızının artması ile sonuçlanarak istatistiksel olarak trabeküler kemik alanını arttırmış olabilir. Bu durum osteoindüktif bir etki olarak yorumlanabilir.

Rekombinant insan eritropoetinin yumuşak dokudaki yara iyileşimi üzerine olumlu etkileri ve bu çalışmanın bulguları, latent dönem ve distraksiyon dönemi boyunca 48 saatte bir subkütan olarak verilen rHuEPO'nun DO esnasında kemik iyileşmesini belirgin olarak hızlandırdığını, vaskülarite açısından daha kaliteli kemik oluşturduğunu ve sonuç olarak yeni oluşan kemiğin sağlamlığını arttırabileceğini düşündürmektedir. İskemik alanları ilgilendiren DO uygulamalarıyla birlikte rHuEPO verilmesi vasküleriteyi arttırıcı etkisiyle

yara iyileşmesine katkı sağlayabilir ve potansiyel bazı sorunların önüne geçebilir. Bununla birlikte, klinik uygulamaya geçilmeden önce rHuEPO'nun kısa dönemdeki bu olumlu etkilerinin uzun dönem çalışmalarla da incelenmesi ve desteklenmesi gereklidir. Ayrıca DO için en etkin dozun ve uygulama protokolünün bulunması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZI / KONYA-2006

Ahmet MİHMANLI

Eritropoetinin Mandibular Distraksiyon Osteogenezisi Üzerine Etkisi

Bu çalışmanın amacı, subkütan olarak uygulanan rekombinant insan eritropoetininin (rHuEPO), mandibulanın distraksiyon osteogenezisi (DO) esnasında yeni kemiğin oluşumu ve kalitesi üzerine etkisini histomorfometrik olarak değerlendirmektir.

Bu çalışmada 16 adet genç erişkin beyaz erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Hayvanlar rastgele seçilerek deney ve kontrol grubu olmak üzere eşit iki gruba ayrıldı. Bütün hayvanların mandibula sol tarafına özel yapım bir distraktör yerleştirilerek DO uygulaması gerçekleştirildi. Deney grubuna ilk doz operasyondan hemen sonra olmak üzere 48 saat ara ile toplam 4 doz 150 IU/kg rHuEPO subkütan olarak, kontrol grubuna ise aynı protokolle sadece 0.5 ml/kg serum fizyolojik verildi.

İki günlük latent dönemden sonra 5 gün boyunca 12 saat ara ile 0.5 mm oranında günlük 1 mm olacak şekilde mandibula 5 mm uzatıldı. 30 günlük konsolidasyon süresinin ardından hayvanlar sakrifiye edildi. Örnekler hazırlandıktan sonra yeni oluşan kemik bölgesi histomorfometrik olarak incelendi.

Histomorfometrik incelemede deney ve kontrol grubu kıyaslandığında, deney grubunda yeni oluşan kemik bölgesinde birim alandaki osteoblast sayısı, damar sayısı ve trabeküler kemikleşme alanları daha fazla olurken, osteoklast sayısı daha azdı. Bu farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Deney grubunda birim alandaki fibroblast sayısı ve

kollajen lif sayısı kontrol grubuna göre fazla olmakla birlikte bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Bu çalışmanın bulgularına göre DO esnasında subkütan olarak uygulanan rHuEPO, yeni oluşan kemiğin iyileşme hızını ve kalitesini arttırmaktadır. Bununla birlikte, klinik uygulamaya geçilmeden önce rHuEPO'nun kısa dönemdeki bu olumlu etkilerinin uzun dönem çalışmalarla da incelenmesi ve desteklenmesi gereklidir.

7. SUMMARY

The Effect of Erythropoietin on Mandibular Distraction Osteogenesis

The aim of this study is to evaluate the effects of subcutaneous administration of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) on regenerate formation and quality during mandibular distraction osteogenesis.

16 adult, male New Zeland rabbits were conducted for this study. Ethical approval was obtained from Animal Research Institute. Subjects were randomly divided into two groups. Distraction osteogenesis (DO) was performed with a custom-made distractor on left mandibles of rabbits. In experimental group, 4 doses of 150 IU/kg rHuEPO administration were performed with 48 hours interval. The first dose was applied immediately after surgery. Control subjects were given 0.5ml/kg isotonic solution with same manner. After 2 days of latency, mandibles were distracted 1mm/day with 12 hours interval for 5 days. A 5 mm lengthening was achieved. All animals were sacrificed following 30 days of consolidation. After that, samples were prepared to perform histomorphometric evaluation of newly formed bone area.

Number of osteoblasts and blood vessels was significantly higher while number of osteoclasts was significantly lower in experimental group than control group respectively ($p<0.05$). In experimental group newly formed trabecular bone area was more than control group ($p<0.05$). Additionally, fibroblast and collagen number per unit area were more excessive in experimental group. However this finding was not statistically significant ($p>0.05$).

According to the results of this study, subcutaneous administration of rHuEPO improves the rate and quality of bone healing during DO. However, short-term favorable

effects of rHuEPO in this study should be supported with long-term investigations before clinical applications.

8. KAYNAKLAR

Abbott LC (1927) *The operative lengthening of the tibia and fibula,* J Bone Joint Surg, 9,128-152. Alınmıştır: Davies J, Turner S, Sandy JR (1998) *Distraction osteogenesis-a review,* Br Dent J, 14, 462-467.

Aida T, Yoshioka I, Tominaga K, Fukuda J (2003) *Effects of latency period in a rabbit mandibular distraction osteogenesis*, Int J Oral Maxillofac Surg, 32, 54-62.

Al Ruhami KA (2001a) *Comparison of different distraction rates in the mandible: an experimantel investigation,* Int J Oral Maxillofac Surg ,30, 220-227.

Al Ruhaimi KA (2001b) *Effect of calcium sulphate on the rate of osteogenesis in distracted bone,* Int J Oral Maxillofac Surg, 30, 228-233.

Aldegheri R, Trivella G, Lavini FM (1989) *Epiphyseal distraction Chondrodiatasis,* Clin Orthop Rel Res, 241, 117-127.

Alkan A, Bas B, Inal S (2005) *Alveolar distraction osteogenesis of bone graft reconstructed mandible,* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**,** 100, 39-42.

Alkan A, Arici S, Sato S (2006) *Bite force and occlusal contact area changes following mandibular widening using distraction osteogenesis*, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 101, 432-436.

Alvarez Arroyo MV, Castilla MA, Gonzalez Pacheco FR, Tan D, Riesco A, Casado S et al (1998) *Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation,* J Am Soc Nephrol, 9,1998-2004.

Anagnostou A, Lee ES, Kesseimian N, Levinson R, Steiner M (1990) *Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells,* Proc Natl Acad Sci 87,5978-5982.

Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh DR (1994) *Inflamatory cells in normal human fracture healing,* Acta Orthop Scand, 65,462-466.

Annino DJ, Goguen LA, Karmogy CS (1994) *Distraction osteogenesis for reconstruction of mandibular symphyseal defects,* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 120, 911-916.

Aronson J, Harrison BH, Stewart CL, Harp JH (1989) *The histology of distraction osteogenesis using different external fixators,* Clin Orthop Rel Res, 241, 106-116.

Aronson J, Good B, Stewart C, Harrison B, Harp J (1990) *Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis,* Clin Orthop Rel Res, 250, 43- 49.

Aronson J, Harp JH (1994) *Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis,* Clin Orthop Rel Res, 301, 73-79.

Ashley RA, Dubuque SH, Dvorak B, Woodward SS, Williams SK, Kling PJ (2002) *Erythropoietin stimulates vasculogenesis in neonatal rat mesenteric microvascular endothelial cell,* Pediatr ResApr, 51,472-478.

Asonova SN (1996) *Morphogenesis mechanisms of limb connective tissue structures in the conditions of gradual distraction,* Genij Ortopedii, 2-3, 124.

Bail HJ, Kolbeck S, Lindner T, Dahne M, Weiler A, Windhagen HJ et al (2001) *The effect of growth hormone on insulin-like growth factor 1 and bone metabolism in distraction osteogenesis,* Growth Horm IGF Res, 11, 314-323.

Bail HJ, Raschke MJ, Kolbeck S, Krummrey G, Windhagen HJ, Weiler A et al (2002) *Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis,* Bone, 30, 117-124.

Bazan JF (1989) *A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin,erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor b chain*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 164, 788-796.

Bell WH, Harper RH, Gonzalez M, Cherkashin AM, Samchukov ML (1997) *Distraction osteogenesis to widen the mandible,* Br J Oral Maxillofac Surg, 35, 11-19.

Bilston LE, Little DG, Smith NC, Williams P, Briody J (2002) *Zoledronic acid improves the mechanical properties of normal and healing bone,* Clin Biomech, 17,716-718.

Birgegard G, Gudbjronsson B, Hallgren R, Wide L (1991) *Anemia of chronic inflammatory arthritides-Treatment with recombinant human erythropoietin,* Contributions to Nephrology, 88, 295-303.

Blackburn ME, Kendall RG, Gibbs JL, Dickinson DF, Parsons JM, Norfolk DR. (1992) *Anaemia in children following cardiac transplantation: treatment with low dose human recombinant erythropoietin*, Int J Cardiol, 36, 263-266.

Block MS, Brister GD (1994) *Use of distraction osteogenesis for maxillary advancement: preliminary results*, J Oral Maxillofac Surg, 52, 282-286.

Block MS, Chang A, Crawford C (1996) *Mandibular alveolar ridge augmentation in the dog using distraction osteogenesis,* J Oral Maxillofac Surg, 54, 309-314.

Brighton CT (1984) *Principles of fracture healing, In "instructional course lectures",* Rosemont, American Academy of Orthopaedic Surgeons.

Brown AL, Tucker B, Baker LRI, Raine AEG (1989) *Seizures related to blood transfusion and erythropoietin treatment in patients undergoing dialysis,* British Medical Journal**,** 299, 1258-1259.

Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, Galeano MR, Sansotta C, Cavallari V et al (2002) *Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps,* Acta Derm Venereol, 82, 411-417.

Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A et al (2004) *Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds,* Shock, 22, 169-173.

Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M (1995) *Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro*, Kidney Int Mar, 47, 740-745.

Carnot P and Deflandre C (1906) *Sur l'activite hemopoietique de serum au cours de la regeneration du sang*, Compte Rendu de L0 Academie Des Sciences, 111, 344-346. Alınmıştır : Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Cedars MG, Linck DL , Chin M, Toth BA (1999) *Advancement of the midface using distraction techniques,* Plast Reconstr Surg, 103, 429-441.

Cheung W, Minton N, Gunawardena K (2001) *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa once weekly and three times weekly*, Eur J Clin Pharmacol, 57, 411-418.

Chiapasco M, Lang NP, Bosshardt DD (2006) *Quality and quantity of bone following alveolar distraction osteogenesis in the human mandible,* Clin Oral Implants Res, 17, 394-402.

Chin M, Toth BA (1996) *Distraction osteogenesis in maxillofacial surgery using internal devices: review of five cases,* J Oral Maxillofac Surg, 54, 45-53.

Chin M, Toth BA (1997) *Le Fort III advancement with gradual distraction using internal devices*, Plast Reconstr Surg, 100, 819 –830.

Choi IH, Chung CY, Cho TJ, Yoo WJ (2002) *Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis,* J Korean Med Sci, 17, 435-447.

Claes L, Laule J, Wenger K, Suger G,Lıener U, Kınzl L (2000) *The influence of stiffness of the fixator on maturation of callus after segmental transport* , J Bone Joint Surg Br, 82, 142-148.

Clark CL, Strider J, Hall C, Ferguson HW, Armstrong KL, Runner RR et al (2006) *Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy,* J Oral Maxillofac Surg, 64, 589-593.

Codivilla A (1905*)* *On the means of lengthening in the lower limbs the muscles and tissues which are shortened through deformity,* Am J Othop Surg, 2, 353-369. Alınmıştır: Davies J, Turner S, Sandy JR (1998) *Distraction osteogenesis-a review,* Br Dent J, 14, 462-467.

Cohen SR, Burstein FD, Stewart MB, Rathburn MA (1997) *Maxillary-midface distraction in children with cleft lip and palate: a preliminary report,* Plast Reconstr Surg, 99, 1421-1428.

Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM (1999) *Mandibular distraction osteogenesis; Historical perspective and future directions*, Am J Orthod Dentofac Orthop, 115, 448-460.

Cope JB, Samchukov ML (2000) Regenerate *bone formation and remodeling during mandibular osteodistraction,* Angle Orthod, 70, 99-111.

D'Andrea AD, Zon LI (1990) *Erythropoietin receptor: subunit structure and activation*, Journal of Clinical Investigation, 86, 681-687.

Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P et al (1998*)* *Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue,* Blood, 92, 3218-3225.

Danis A (2001) *Mechanism of bone lengthening by the Ilizarov tecnique,* Bull Mem Acad R Med Belg, 156, 107-112.

Davies J, Turner S, Sandy JR (1998) *Distraction osteogenesis-a review,* Br Dent J, 14, 462-467.

De Klerk G, Rosengarten PCJ, Vet RJWM, Goudsmit R (1981) *Serum erythropoietin (ESF) titers in anemia*, Blood, 58, 1164-1170.

Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, Vincent A (1990) *Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening: an experimental study,* Clin Orthop Scand, 250, 34-42.

Diner PA, Kollar EM, Martinez H, Vazquez MP (1996) Intraoral *distraction for mandibular lengthening: a technical innovation,* J Craniomaxillofac Surg, 24, 92-95.

Diner PA, Kollar EM, Martinez H, Vazquez MP (1997) *Submerged intraoral device for mandibular lengthening,* J Craniomaxillofac Surg, 25, 116-123.

Dolanmaz D, Karaman AI, Durmus E, Malkoc S (2003) *Management of alveolar clefts using dento-osseous transport distraction osteogenesis,* Angle Orthod, 73, 723-729.

Eckardt H, Bundgaard KG, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hvid I (2002) Effects *of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF- inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis*, Journal of Orthopaedic Research, 21, 335-340.

Erslev A (1953) *Humoral regulation of red cell production,* Blood, 8 , 349-357. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Erslev AJ (1974) *In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum free solution,* Blood, 44, 77-85. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Erslev AJ and Caro J (1986) *Physiologic and molecular biology of erythropoietin,* Medical Oncology and Tumour Pharmacotherapy, 3, 159-164. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Fatouros MS, Vekinis G, Bourantas KL, Mylonakis EP, Scopelitou AS, Malamou-Mitsis VD et al (1999) *Influence of growth factors erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on mechanical strength and healing of colonic anastomoses in rats,* Eur J Surg, 165, 986-992.

Fearon JA, Weinthal J (2002) *The use of recombinant erythropoietin in the reduction of blood transfusion rates in craniosynostosis repair in infants and children,* Plast Reconstr Surg, 109, 2190-2196.

Frierson M, Ibrahim K, Boles M, Bote H, Ganey T (1994) *Distraction osteogenesis. A comparison of corticotomy techniques*, Clin Orthop Relat Res, 301, 19-24.

Folkman J, Shing Y (1992) *Angiogenesis*, J. Biol Chem ,267, 10931-10934.

Frost HM (1989) *The biology of fracture healing: an overview for clinicians, Part I,* Clin Orthop Rel Res, 248, 283-293.

Fukuda MN, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M (1989) *Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates*, Blood, 73, 84-89.

Gaggl A, Rainer H, Chiari FM (2005) *Horizontal distraction of the anterior maxilla in combination with bilateral sinuslift operation--preliminary report,* Int J Oral Maxillofac Surg, 34, 37-44.

Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A et al (2004) *Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse,* Diabetes, 53, 2509-2517.

Gantous A, Phillips JH, Catton P, Holmberg D (1994) *Distraction osteogenesis in the Irradiated canine mandible,* Plast Reconstr Surg, 93, 164-168.

Garnick MB, Abels R, Rudnick SA (1991) *The role of recombinant human erythropoietin in the management of anemia associated with acquired immune deficiency syndrome,* Contributions to Nephrology, 88, 282-292.

Giulnazarova SV, Kazak LA, Mashinskaia TM (1991) *Significance of roentgenologic indications of osteogenesis in the choice of tactics in distraction osteosynthesis using Ilizarov's method in rigid pseudarthrosis,* Ortop Traumatol Protez, 9, 21-24.

Goodnough L, Rudnick S, Price T, Ballas S, Collins M, Crowley J et al (1989) *Increased preoperative collection of autologous blood with recombinant human erythropoietin therapy,* New England Journal of Medicine, 321, 1163-1168.

Gregoli PA, Bondurant MC (1999) *Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors,* Journal of Cellular Physiology, 178, 133-143.

Gross M, Goldwasser E (1971) *On the mechanism of erythropoietin- induced differentiation. IX. Induced synthesis of 9s ribonucleic acid and of hemoglobin,* Journal of Biological Chemistry, 246, 2480-2486.

Grutzmacher P, Bergmann M, Weinreich T, Natterman U, Reimers E, Pollock M (1988) *Beneficial and adverse effects of correction of anaemia by recombinant human erythropoietin in patients on maintenance haemodialysis,* Contributions to Nephrology, 66, 104-113.

Guerrero CA (1990) *Rapid mandibular expansion*, Rev Venez Orthod, 48, 1.

Hagino T, Hamada Y (1999) *Accelerating bone formation and earlier healing after using demineralized bone matrix for limb lengthening in rabbits,* J Orthop Res, 17, 232-237.

Hagiwara T, Bell WH (2000) *Effect of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis,* J Craniomaxillofac Surg, 28, 12-19.

Harada K, Sato M, Omura K (2004) *Maxillary distraction in patients with cleft deformity using a rigid external distraction device: a pilot study on the distraction ratio of the maxilla to the device,* Scand J Plast ReconstrSurg Hand Surg, 38, 277-280.

Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO (2003) *A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response,* Am J Pathol, 163, 993-1000.

Hasse A, Porksen M, Schultze S, Engel A, Feyerabend T (2000) *Effect of bFGF on regeneration of distracted mandibles after radiation,* Mund Kiefer Gesichtschir, 2, 423-427.

Henry DH, Abels RI (1994) *Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer and chemotherapy induced anaemia; results of double-blind and open label follow up studies,* Seminars in Oncology, 21, 21-28.

Hirashima K, Bessho M, Jinnai I (1991) *Improvement in anemia by recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndrome and aplastic anemia,* Contributions to Nephrology, 88, 254-265.

Holbein O, Neidlinger-Wilke C, Suger G, Kinzl L, Claes L (1995) *Ilizarov callus distraction produces systemic bone cell mitogens,* J Orthop Res, 13, 629-638.

Hu J, Zou S, Li J, Chen Y, Wang D, Gao Z (2003) *Temporospatial expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during mandibular distraction osteogenesis*, J Craniomaxillofac Surg, 238-243.

Hulth A (1989) *Current concepts of fracture healing,* Clin Orthop Rel Res, 249, 265-284.

Ilizarov GA (1988) *The principles of the Ilizarov method,* Bull Hosp Joint Dis Orthop Inst, 48, 1-11.

Ilizarov GA (1989a) *The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues : Part 1. The influence of stability of fixation and soft-tissuepreservation,* Clin Orthop 238, 249-281.

Ilizarov GA (1989b) *The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II The influence of the rate and frequency of distraction,* Clin Orthop Rel Res, 239, 263-285.

Imai N, Kawamura A, Higuchi M, Oheda M, Orita T, Kawaguchi T et al (1990) *Physicochemical and biological comparison of Recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin,* Journal of Biochemistry, 107, 352-359.

Irianov YM (1996a) *Spatial organization of a microcirculatory bed in distraction bone regenerates,* Genij Ortopedii, 1, 14-18.

Irianov YM (1996b) *Scanning electron microscopy of distraction regenerate,* Genij Ortopedii, 2-3, 131-132.

Irianov YM (1996c) *Peculiarities of angiogenesis in distraction regenerates*, Genij Ortopedii, 2-3, 132-136.

Iseri H, Kisnisci R, Bzizi N, Tuz H (2005) *Rapid canine retraction and orthodontic treatment with dentoalveolar distraction osteogenesis,* Am J Orthod Dentofacial Orthop, 127, 533-541.

Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A (1985) *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin,* Nature 313, 806-810.

Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L (1957*)* *Role of the kidney in erythropoiesis,* Nature, 633-634. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO, Goldwasser E (1959) *Studies on erythropoiesis XI. Reticulocyte response of transfusion induced polycythaemic mice to anemic plasma from nephrectomised mice and to plasma from nephrectomised rats exposed to low oxygen,* Blood, 14, 635-643. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH (2002) *Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential,* Microvasc Res, 64, 326-333.

Jelkmann WE, Fandrey J, Frede S, Pagel H (1994) *Inhibition of erythropoietin production by cytokines. Implications for the anaemia involved in inflammatory states*, Annals of the New York Academy of Sciences, 718, 300-309.

Jelkmann W, Widemann G (1990) *Serum erythropoietin level:Relationship to blood haemoglobin concentration and erythrocyticactivity of the bone marrow,* Klinische Wochenschrift, 68, 403-407.

Jourdanet D (1863) *De l'anemie des altitudes et de l'anemie en general dans ses rapports avec la pression del l'atmosphere,* Balliere, 44. Alınmıştır : Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Kallio TJ, Vauhkonen MV, Peltonen JI, Karaharju EO (1994) *Early bone matrix formation during distraction. A biochemical study in sheep,* Acta Orthop Scand, 65, 467-471.

Karp NS, Thorne CHM, McCarthy JG, Sissons HA (1990) *Bone lengthening in the craniofacial skeleton,* Ann Plast Surg, 24, 231-237.

Karp NS, McCarthy JG, Schreiber JS, Sissons HA, Thorne CH (1992) *Membranous bone lengthening, A serial histological study,* Ann Plast Surg, 29, 2-7.

Kazanjian VH (1941) *The Interrelation of Denstiry and Surgery in the trestment of Deformaties of the Face and Jaws,* Am J Orthod Oral Surg, 27, 10-30. Alınmıştır: Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM (2001) *Historical development and evolution of craniofacial distraction osteogenesis In 'Craniofacial distraction osteogenesis', Ed by* JB Cope ML Samchukov MA Cherkashin, 3-17, Mosby, Missouri.

Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Kessler P, Wiltfang J, Neukam FW (2000) *A new distraction device to compare continuous and discontinuous bone distraction in mini-pigs: a preliminary report,* J Craniomaxillofac Surg, 28, 5-11.

Kisnisci RS, Iseri H, Tuz HH, Altug AT (2002) *Dentoalveolar distraction osteogenesis for rapid orthodontic canine retraction,* J Oral Maxillofac Surg, 60, 389-394.

Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N (2004) *Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases,* Bone, 35, 892-898.

Kofod T, Pedersen TK, Norholt SE, Jensen J (2005) *Stereolithographic models for simulation and transfer of vector in vertical distraction of the mandibular ramus: a technical note,* J Craniofac Surg, 16, 608-614.

Koury MJ, Bondurant MC (1988) *Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells,* Journal of Cellular Physiology, 137, 65-74.

Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL (1991) *Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in-situ hybridization,* Blood, 77, 2497-2503.

Kuroda S, Araki Y, Oya S, Mishima K, Sugahara T, Takano-Yamamoto T (2005) *Maxillary distraction osteogenesis to treat maxillary hypoplasia: comparison of an internal and an external system,* Am J Orthod Dentofacial Orthop, 127, 493-498.

Kurtz A, Eckardt KU, Tannahill L, Bauer C (1988) *Regulation of erythropoietin production,* Contributions to Nephrology, 66, 1-15.

Labbe D, Kaluzinski E, Badie Modiri B, Compere JF (1997) *Mandibular distraction in adults. Nine case reports,* International congress on cranial and facial bone distraction processes, Paris, France, June 19-21.

Landry PS, Marino AA, Sadasivan KK, Albright JA (1996) *Bone injury response An animal model for testing therories of regulation,* Clin Orthop, 332, 260-273.

Law ML, Cai G, Lin F, Wei Q, Huang S, Hartz JH et al (1986) *Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism,* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83, 6920-6924.

Lin F, Suggs S, Lin C, Browne JK, Smalling R, Egrie JC et al (1985) *Cloning and expression of the human erythropoietin gene,* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82, 7580-7584.

Little DG, Comell MS, Briody J, Cowell CT, Artbuckle S, Cook-Yarborough CM (2001) *Intravenous pamidronate reduces osteoporosis and improves formation of the*

regenerate during distraction osteogenesis. A study in immature rabbits, J Bone Joint Surg, 7, 1069-1074.

Little DG, Smith NC, Williams PR, Briody JN, Bilston LE, Smith EJ et al (2003) *Zoledronic acid prevents osteopenia and increases bone strength in a rabbit model of distraction osteogenesis,* J Bone Miner Res, 18, 1300-1307.

Liou EJ, Huang CS (1998) *Rapid canine retraction through distraction of the periodontal ligament,* Am J Orthod Dentofacial Orthop, 114, 372-382.

Loboa EG, Fang TD, Warren SM, Lindsey DP, Fong KD, Longaker MT et al (2004) *Mechanobiology of mandibular distraction osteogenesis: experimental analyses with a rat model,* Bone, 34, 336-343.

Ludwig H, Fritz E, Kotzmann H, Hocker P, Gisslinger H, Barnas U (1990) *Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma,* New England Journal of Medicine, 322, 1693-1699.

Maffulli N (1996) *Callotasis lengthening: A review of some technical aspects,* Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst, 54, 249-254.

Mancini DM, Katz SD, Lang CC, LaManca J, Hudaihed A, Androne AS (2003) *Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure,* Circulation, 21, 294-299.

Marukawa K, Ueki K, Alam S, Shimada M, Nakagawa K, Yamamoto E (2005) *Expression of bone morphogenetic protein-2 and proliferating cell nuclear antigen during distraction osteogenesis in the mandible in rabbits*, Br J Oral Maxillofac Surg, 44, 141-145.

Maxwell AP, Lappin TRJ, Johnston CF, Bridges JM, Mcgeown MG (1990) *Erythropoietin production in kidney tubular cells,* British Journal of Haematology, 74, 535-539.

McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Thorne CH, Grayson BH (1992) *Lengthening the human mandible by gradual distraction,* Plast Reconstr Surg, 89, 1-8.

Mcdougall IC, Cavill I, Davies ME, Hutton RD, Coles GA, Williams JD (1989) *Subcutaneous recombinant erythropoietin in the treatment of renal anaemia in CAPD patients,* Contributions to Nephrology, 76, 219-226.

McKibbin B (1978) *The biology of fracture healing in long bones,* J Bone Joint Surg, 60, 150-162.

McMahon FG, Vargas R, Ryan M, Jain AK, Abels RI, Perry B et al (1990) *Pharmacokinetics and effects of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous injections in healthy volunteers,* Blood, 76, 718-722.

McTavish J, Marucci DD, Bonar SF, Walsh WR, Poole MD (2000) *Does the sheep mandibles relapse following lengthening by distraction osteogenesis?* J Craniomaxillofac Surg, 28, 251-257.

Meffert SB, Rosenstiel P, Röhl C, Warneke N, Held-Feint J, Sievers J et al (2002) *Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats,* Invest Ophthalmol Vis Sci, 43, 2021-2026.

Meischer F (1893*)* *Ueber die beziehungen zwischen meereshohe und beschhaffenheitdes blutes,* Korrespondenzblatt Fur Schweizer Arzte, 23, 830-832. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Michıeli S, Miotti B (1977) *Lengthening of mandibular body by gradual surgical orthodontic distraction,* J Oral Surg, 35, 187-192.

Molina F, Monasterio FO (1995) *Mandibular elongation and remodeling by distraction: a farewell to major osteotomies,* Plast Reconstr Surg, 96, 825-840.

Mosheiff R, Cordey J, Rahn BA, Perren SM, Stein H (1996) *The vascular suplly to bone in distraction osteogenesis: an experimental study,* J Bone Joint Surg, 78, 497-498.

Muhonen A, Muhonen J, Minn H, Kulmala J, Klossner J, Teras M et al (2002) *The effects of irradiation and hyperbaric oxygen on bone formation during rabbit mandibular distraction,* Arch Oral Biol, 47, 701-707.

Mujais SK, Beru N, Pullman TN, Goldwasser E (1999) *Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney,* Cell Biochemistry and Biophysiology, 30, 153-166.

Muntz A (1891) *Del'enrichissement du sang en hemoglobine, suivant les conditions d'existence,* Compte Rendu de L? Academie Des Sciences, 112, 298-301. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Murray JH, Fitch RD (1996) *Distraction histogenesis, Principles and indications*, J Am Acad Orthop Surg, 4, 317-327.

Nitta K, Uchida K, Kimata N, Honda K, Kobayashi H, Kawashima A, Yumura W, Nihei H (1999) *Recombinant human erythropoietin stimulates vascular endothelial growth factor release by glomerular endothelial cells,* Eur J Pharmacol, 28, 121-124.

Nocini PF, Albanese M, Wangerin K, Fior A, Trevisiol L, Kretschmer W (2002) *Distraction osteogenesis of the mandible: evaluation of callus distraction by B-scan ultrasonography,* J Craniomaxillofac Surg, 30, 286-291.

Obladen M, Maier R, Segerer H, Grauel L, Holland BM, Stewart G et al (1991) *Efficacy and safety of recombinant human erythropoietin to prevent the anaemias of prematurity,* Contributions to Nephrology, 88, 314-326.

Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C et al (2000) *Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts,* J Biol Chem, 15, 39754-39761.

Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, Matsushita T, Mamada K, Kawaguchi H (1999) *Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotasis bone lengthening of rabbits,* Calsif Tissue Int, 64, 542-546.

Pampu AA (2005) *Zoledronik asitin distraksiyon osteogenezis ve fiksatörle ilişkili osteoporozis üzerine olan etkisinin incelenmesi,* doktora tezi, 32-70.

Panikarovskii VY, Grigorian AS, Kaganovich SI, Osipian EM, Antipova ZP (1982) *Characteristics of Mandibular Reparative Osteogenesis under Compression-Distraction Osteosynthnesis: An Experimental Study,* Stomatol, 61, 21-25.

Pepper JR, Herbert MA, Andersen JR, Bobechko WP (1996) *Effect of capacitive coupled electrical stimulation on regenerate bone*, J Orthop Res 14, 296-302.

Perrien DS, Brown EC, Aronson J, Skinner RA, Montaque DC, Badger T (2002) *Immunohistochemical study of osteopontin expression during distraction osteogenesis in the rat,* J Histochem Cytochem, 50, 567-574.

Ploder O, Mayr W, Schnetz G, Unger E, Ewers R, Plenk H Jr (1999) *Mandibular lengthening with an implanted motor-driven device: preliminary study in sheep,* Br J Oral Maxillofac Surg, 37, 273-276.

Polley JW, Figueroa AA (1997) *Management of severe maxillary deficiency in childhood and adolescence through distraction osteogenesis with an external, adjustable, rigit distraction device,* J Craniofac Surg, 8, 181-186.

Postacchini F, Gumina S, Perugia D, De Marino C (1995) *Early fracture callus in the diaphysis of human long bones,* Clin Orthop, 310, 218-228.

Rachmiel A, Srouji S, Peled M (2001) *Alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis,* Int J Oral Maxillofac Surg, 30, 510-517.

Rachmiel A, Aizenbud D, Peled M (2005) *Long-term results in maxillary deficiency using intraoral devices,* Int J Oral Maxillofac Surg, 34, 473-479.

Raghoebar GM, Heydenrijk K, Vissink A (2000) *Vertical distraction of the severely resorbed mandible The Groningen distraction device,* Int J Oral Maxillofac Surg, 29, 416-420.

Raghoebar GM, Liem RS, Vissink A (2002) *Vertical distraction of the severely resorbed edentulous mandible: a clinical, histological and electron microscopic study of 10 treated cases*, Clin Oral Implants Res, 13, 558-565.

Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, Kolbeck SF, Weiler A, Raun K et al (1999) *Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate conconlidation in distraction osteogenesis,* Bone, 24, 81-88.

Rauch F, Lauzier D, Travers R, Glorieux FH, Hamdy R (2000*)* ***Effects of locally applied transforming growth factor-beta on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model,* Bone, 26, 619-624.

Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P et al (1999) *Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularиization in vivo,* Blood, 93, 2627-2636.

Roth DA, Gosain AK, McCarthy JG, Stracher MA, Lefton DR, Grayson BH (1997) *A CT scan technique for quantitative volumetric assessment of the mandible after distraction osteogenesis,* Plast Reconstr Surg, 99, 1237-1247.

Rosse WF, Waldemann TA (1964) *The metabolism of erythropoietin in patients with anemia due to deficient erythropoiesis,* Journal of Clinical Investigation, 43, 1348-1354. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Saleh M, Stubbs DA, Street RJ, Lang DM, Harris SC (1993) *Histologic analysis of human lengthened bone,* J Pediatr Orthop, 2, 16-21.

Samchukov ML, Cherkashin AM, Cope JB (1998a) *Distraction osteogenesis, History and biologic basis of new bone formation. Tissue engineering,* Applications in maxillofacial surgery and periodontics, Carol Stream, Illinois, Quintessence Publishing Co.

Samchukov ML, Cope JB, Harper RP, Ross JD (1998b) *Biomechanical considerations of mandibular lengthening and widening by gradual distraction using a computer model,* J Oral Maxillofac Surg, 56, 51-59.

Saray A, Ozakpinar R, Koc C, Serel S, Sen Z, Can Z (2003) *Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study,* Laryngoscope, 113, 85-89.

Sato W, Matsushita T, Nakamura K (1999) *Acceleration of increase in bone mineral content by low-intensity ultrasound energy in leg lengthening,* J Ultrasound Med, 18, 699-702.

Schenk RK, Gachter A (1994) *Histology of distraction osteogenesis,* In ' Bone formation and repair' Ed. by Brighton CT, Friedlaender G, Lane JM, 387-394, Rosemont, American Academy of Orthopaedic Surgeons.

Schenk RK, Hunziker EB (1994) *Histologic and ultrastructural features of fracture healing,* In 'Bone formation and repair' Ed. by Brighton CT, Friedlaender G, Lane JM, 117-146 Rosemont, American Academy of Orthopaedic Surgeons.

Sciadini MF, Dawson JM, Banit D, Juliao SF, Johnson KD, Lennington WJ et al (2000) *Growth factor modulation of distraction osteogenesis in a segmental defect model,* Clin Orthop Relat Res, 381, 266-277.

Scigalla P, Wieczorek L, Bicker U (1990) *Treatment of renal anemia with recombinant human erythropoietin: European experience,* In 'Erythropoietin in Clinical Applications', Ed.by MB Garnick , 141-182, Dekker, New York.

Shimazaki A, Inui K, Azuma Y, Nishimura N, Yamano Y (2000) *Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits,* J Bone Joint Surg, 82, 1077-1082.

Shoemaker CB, Mitsock LD (1986) *Murine erythropoietin gene; Cloning, expression and human gene homology,* Molecular and Cellular Biology, 6, 849-858.

Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P (2001) *Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress,* Proc Natl Acad Sci, 27, 4044-4049.

Smith SW, Sachdeva RC, Cope JB (1999) *Evaluation of the consolidation period during osteodistraction using computed tomography,* Am J Orthod Dentofacial Orthop, 116, 254-263.

Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ (1973) *Mandibular lengthening by gradual distraction,* Plast Reconstr Surg, 51, 506-508. Alınmıştır: Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM (2001) *Historical development and evolution of craniofacial distraction osteogenesis In 'Craniofacial distraction osteogenesis', Ed by* JB Cope ML Samchukov MA Cherkashin, 3-17, Mosby, Missouri.

Spector JA, Mehrara BJ, Luchs JS, Greenwald JA, Fagenholz PJ, Saadeh PB et al (2000) *Expression of adenovirally delivered gene products in healing osseous tissues,* Ann Plast Surg, 44, 522-528.

Stewart KJ, Lvoff GO, White SA, Bonar SF, Walsh WR, Smart RC et al (1998) *Mandibular distraction osteogenesis: a comparison of distraction rates in the rabbit model,*

J Craniomaxillofac Surg, 26, 43-49.

Stewart KJ, Weyand B, Van't Hof RJ, White SA, Lvoff GO, Maffulli N et al (2000) *A quantitative analysis of the effect of insulin-like growth factor-1 infusion during mandibular distraction osteogenesis in rabbits,* Br J Plast Surg, 52, 343-350.

Subasi M, Kapukaya A, Kesemenli C, Balci TA, Buyukbayram H, Ozates M (2001) *Effect of chemotherapeutic agents on distraction osteogenesis. An experimental investigation in rabbits,* Arch Orthop Trauma Surg, 121, 417-421.

Swennen G, Schliephake H, Dempf R, Schierle H, Malavez C (2001) *Craniofacial distraction osteogenesis: a review of the literature. Part I, clinicial studies,* Int J Oral Maxillofac Surg, 30, 89-103.

Swennen G, Dempf R, Schliephake (2002) *Cranio-facial distraction osteogenesis: a review of the literature. Part II: experimental studies,* Int J Oral Maxillofac Surg, 31, 123-135.

Sytkowski AJ (1980) *Denaturation and renaturation of human erythropoietin,* Biochemical Biophysical Research Communications, 96, 143-149.

Tajana GF, Morandi M, Zembo MM (1989) *The structure and development of osteogenic repair tissue according to Ilizarov technique in man: characterization of extracellular matrix,* Orthop, 12, 515-523.

Tavakoli K, Walsh WR, Bonar F, Smart R, Wulf S, Poole MD (1998) *The role of latency in mandibular osteodistraction,* J Craniomaxillofac Surg, 26, 209-219.

Terheyden H, Wang H, Warnke PH, Springer I, Erxleben A, Ludwig K et al (2003) *Acceleration of callus maturation using rhOP-1 in mandibular distraction osteogenesis in a rat model,* Int J Oral Maxillofac Surg, 32, 528-533.

Thorey F, Windhagen H, Linnenberg D, Nolle O, Maciejewski O, Spies C (2000) *Assessment of bone healing during callus distraction by an automatic torsional stiffness metering system*, Biomed Tech, 45, 343-348.

Trauner R, Obwegeser H (1957) *The surgical correction of mandibular prognathism and retrognathia with consideration of genioplasty. Part I. Surgical procedures to correct mandibular prognathism and reshaping of the chin*, Oral Surg Oral Med Oral Path, 10,

677-689. Alınmıştır: Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM (2001) *Historical development and evolution of craniofacial distraction osteogenesis In 'Craniofacial distraction osteogenesis', Ed by* JB Cope ML Samchukov MA Cherkashin, 3-17, Mosby, Missouri.

Troulis MJ, Glowacki J, Perrott DH, Kaban LB (2000) *Effects of latency and rate on bone formation in a porcine mandibular distraction model,* J Oral Maxillofac Surg, 58, 507-513.

Troulis MJ (2003) *Ultrasound: assessment of the distraction osteogenesis wound in patients undergoing mandibular lengthening*, J Oral Maxillofac Surg, 61, 1144-1149.

Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, Tomita K, Minato H (1999) *Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits,* J Bone Joint Surg, 81, 125-129.

Uckan S, Haydar SG, Dolanmaz D (2002a) *Alveolar distraction: analysis of 10 cases*, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 94, 561-565.

Uckan S, Dolanmaz D, Kalayci A, Cilasun U (2002b) *Distraction osteogenesis of basal mandibular bone for reconstruction of the alveolar ridge,* Br J Oral Maxillofac Surg, 40, 393-396.

Viault F (1890) *Sur l¢ augmentation considerable du nombre desglobules rouges dans lesange chez les habitants des haut plateaux de l¢ Amerique du Sud,* Seances et Memoirs de la Societe de Biologie, 111, 917-918. Alınmıştır : Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Waanders NA, Herzenberg JE, Goulet JA (1992) *A morphologic study of the regenerate bone structure in the early stages of distraction osteogenesis,* Bull Hosp Joint Dis Orthop Inst, 52, 36-48.

Wagner H (1971*) Operative Beinverlangerung,* Der Chirurg, 6, 260-266. Alınmıştır: Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM (2001) *Historical development and evolution of*

craniofacial distraction osteogenesis In 'Craniofacial distraction osteogenesis', Ed by JB Cope ML Samchukov MA Cherkashin, 3-17, Mosby, Missouri.

Wagner H (1978) *Operative lenghtening of the femur,* Clin Orthop, 136, 125. Alınmıştır: Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM (2001) *Historical development and evolution of craniofacial distraction osteogenesis In 'Craniofacial distraction osteogenesis', Ed by* JB Cope ML Samchukov MA Cherkashin, 3-17, Mosby, Missouri.

Warren SM, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Paccione MF, Greenwald JA, Spector JA et al (2001) *Rat mandibular distraction osteogenesis: part III. Gradual distraction versus acute lengthening,* Plast Reconstr Surg, 107, 441-453.

Wassmund M (1935) *Lehrbuch der praktischen chirurgie des mundes und der kiefer,* Band 1. Leizig, Hermann Meusser, 275-282. Alınmıştır: Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM (2001) *Historical development and evolution of craniofacial distraction osteogenesis In 'Craniofacial distraction osteogenesis', Ed by* JB Cope ML Samchukov MA Cherkashin, 3-17, Mosby, Missouri.

Watkins PC, Eddy R, Hoffman N, Stanislovitis P, Beck AK, Galli J (1986) *Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7 q22,* Cytogenetics and Cell Genetics, 42, 214-218. Alınmıştır: Kendall RG (2001) *Erythropoietin*, Clin. Lab. Haem, 23, 71-80.

Williams PR, Smith NC, Cooke-Yarborough C, Little DG (2001) *Bisphosphonates and nephrocalcinosis in a rabbit leg lengthening model: a histological and therapeutic comparison,* Pharmacol Toxicol, 89, 149-152.

Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM (1986) *Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis,* Lancet ii, 1175-1178.

Yamane K, Okano T, Kishimoto H, Hagino H (1999) *Effect of ED-71 on modeling of bone in distraction osteogenesis,* Bone, 24, 187-193.

Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A, Shimizu H, Shimomura Y (1993) *Factors affecting callus distraction in limb lengthening*, Clin Orthop Relat Res, 293, 55-60.

Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S (1997) *Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat,* J Bone Joint Surg, 79, 824-830.

Yates KE, Troulis MJ, Kaban LB, Glowacki J (2002) *IGF-I, TGF-beta, and BMP-4 are expressed during distraction osteogenesis of the pig mandible,* Int J Oral Maxillofac Surg, 31, 173-178.

Yeung HY, Lee KM, Fung KP, Leung KS (2002) *Sustained expression of transforming growth factor-beta1 by distraction during distraction osteogenesis***,** Life Sci, 24, 67-79.

Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B (2002) *Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development,* Development, 129, 505-516.

9. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Gaziantep'te doğdu. İlk, orta, lise eğitimini Gaziantep'te tamamladı. 1992 yılında başladığı İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nden 1997 yılında mezun oldu. 2002 Şubat ayında, Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda, doktora eğitimine başladı. 2006 Mart ayında yapılan sınavı kazanarak araştırma görevlisi olarak atandı. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dil olarak İngilizce bilmektedir.

10. TEŞEKKÜR

Maddi ve manevi desteklerini daima yanımda hissettiğim aileme,

İlgi, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, doktora çalışmamın planlaması ve yürütülmesi süresince bana yol gösteren danışmanım ve tez yöneticim Sayın Doç. Dr. Doğan Dolanmaz'a,

Çalışmada kullanılan apareylerin planlanmasında ve deneysel uygulamada bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Dt. Alper Pampu'ya,

Histomorfometrik incelemelerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa Cihat Avunduk'a ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Esra Erdemli'ye,

İstatistiksel analizlerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Eğitim Bilimleri Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ali Murat Sümbül'e,

Doktora tez çalışmam sırasında değerli yardımlarını gördüğüm, Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalındaki diğer hocalarıma, asistan arkadaşlarıma ve çalışanlarına, en içten duygularımla teşekkür ederim.