T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER CERRAHİ ANABİLİM DALI

TAVŞAN TİBİASINDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİNİN DEĞİŞİK KEMİK GREFTLERİ VE TİDEGLUSİB KULLANILARAK İYİLEŞMENİN RADYOLOJİK VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Kerem YENER

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ali HAYAT

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21090 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2022

TEŞEKKÜR

Eğitimim sırasında varlığı ve desteği ile bana güven veren, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, klinik ve hayat tecrübesiyle doktora eğitimimin her aşamasında bana bilgi ve deneyimlerini sunan hocam, sayın Prof. Dr. Ali HAYAT'a,

Doktora eğitimim boyunca tüm bilgisini, tecrübelerini ve önerilerini içtenlikle paylaşan ve klinik deneyimlerinin yanı sıra hayata dair tecrübelerinden de her zaman yararlandığım, örnek almaya çalıştığım değerli hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Ünal YAVUZ'a,

Tezimin her aşamasında fedakarca yardım eden, histopatolojik değerlendirmesinde katkılarını esirgemeyen hocam, sayın Doç. Dr. RahşanYILMAZ'a,

Aynı anabilim dalında birlikte çalışmaktan keyif aldığım cerrahi anabilim dalındaki değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Mehmet Salih KARADAĞ, Arş. Gör. Kübra DİKMEN ve Vet. Hek. Mehmet Sıdık HURMA'ya,

Bütün doktora eğitimim süresince aynı çalışma ortamını paylaşmaktan keyif aldığım Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ndeki tüm mesai arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında bana destek olan ve hiçbir şeylerini benden esirgemeyen aileme sevgi ve fedakarlıkları için teşekkür ederim.

Kerem YENER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR…… i
ŞEKİLLER DİZİNİ……..iv
TABLOLAR DİZİNİ…….. …...vi
KISALTMALAR……... … vii
ÖZET……. …...ix
ABSTRACT……. …..xi
1. GİRİŞ…….…… ….1
2. GENEL BİLGİLER…….. …. 3
2.1. Kemik Doku……..……. .3
2.1.1. Kemik Dokunun Makroskobik Yapısı…… ..……..4
2.1.2. Kemik Dokunun Mikroskobik Yapısı……..……..6
2.1.3. Kemik Oluşumu (Osteogenez)…….……...……...13
2.2. Transplantasyon…… …….……22
2.2.1. Kemik Greftleriyle Osteosentez…….……. ….22
2.3. Greft Tipleri…… ……..……25
2.3.1. Otojen Kemik Greftleri…….…… ….26
2.3.2. Homojen Kemik Greftleri (Homogreft)… …… . ..26
2.3.3. Heterojen Kemik Greftleri (Ksenogreftler)…….…….....28
2.3.4. Kompozit Greftler……..… ……. .29
2.3.5. Alloplastik (Sentetik, Biyomateryaller) Greftler… … …30
2.4. WNT/ß- katenin Sinyal Yolağının Kemik Oluşumu Üzerine Etkileri…..…… 34
2.5. Tideglusib…….…….…35
2.6. Hipotez…….…….…..…36
3. GEREÇ VE YÖNTEM……..… …….. 37
3.1. Deney Hayvanları ve Protokol Dizaynı…….……..…...37
3.2. Greft Materyalleri…….……..……37
3.3. Anestezi…….……..….....38
3.4. Operatif Prosedür…….……..…….……38
3.5. Klinik Muayeneler…….…..……...40
3.6. Radyolojik Muayeneler……..……...…40
3.7. Histolojik Muayeneler ……..…….…… …41

3.8. İstatistiksel Değerlendirme……..…….……..42
4.BULGULAR……..……43
4.1. Greft Materyallerine Ait Bulgular……..……..…43
4.2. Klinik Bulgular……..…….…… 43
4.3. Radyolojik Bulgular……..…… 43
4.3.1. Postoperatif Radyolojik Bulgular …….…….……43
4.3.2. Postoperatif Onbeşinci Gündeki Radyolojik Bulgular…..…. 44
4.3.3. Postoperatif Otuzuncu Gündeki Radyolojik Bulgular…...….45
4.3.4. Postoperatif Kırkbeşinci Gündeki Radyolojik Bulgular...…..46
4.3.5. Postoperatif Altmışıncı Gündeki Radyolojik Bulgular…...…47
4.4. Makroskobik Bulgular……...……..49
4.5. Histolojik Bulgular ……..……...51
4.5.1. Otuz Günlük Gruplardaki Histolojik Bulgular…..……..…51
4.5.2. Altmış Günlük Gruplardaki Histolojik Bulgular…..… …….55
5.TARTIŞMA …….. …… …..64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER……..…… …… …72
7.KAYNAKLAR……..…… ….…73
8.EKLER
8.1.Etik Kurul Kararı
8.2.İntihal Raporu
8.3. Orjinallik Raporu ve Beyan Formu
8.4. Tez Veri Giriş Formu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kemik dokunun normal yapısı……..……4

Şekil 2.2. Sert kemiğin morfolojisi……..…….……5

Şekil 2.3. Kemik dokunun bileşenlerinin şematik görünümü…..……7

Şekil 2.4. Periost ve endostun mikroskobisi……...… …….. 9

Şekil 2.5. Kemik dokusunu oluşturan hücrelerin görünümü…..…… 10

Şekil 2.6. Kemik hücrelerinin mikroskobisi……..…… ..13

Şekil 2.7. İntramembranöz ossifikasyon…….…..…… 15

Şekil 2.8. Endokondral ossifikasyonda ikincil kemik yapı oluşumu ve aşamaları……..…… 16

Şekil 2.9. Kırık iyileşmesinde enflamasyon safhası……..…..……..18

Şekil 2.10. Kırık iyileşmesinde onarım safhasında gerçekleşen yumuşak kallus oluşumu…… … 19

Şekil 2.11. Kırık iyileşmesinde onarım safhasında gerçekleşen sert kallus oluşumu……...20

Şekil 2.12. Kırık iyileşmesinde yeniden şekillenme safhası……..…. …21

Şekil 2.13. Kemik greftinin çevre dokularla ilişkisini gösteren şema…...23

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan greft materyalleri……...……. 38

Şekil 3.2. Operasyon sonrası kemik defektlerinin görünümü…..….……39

Şekil 4.1. Postoperatif radyografik görünüm…….……...…….44

Şekil 4.2. Postoperatif 15. gündeki radyografik görünüm……..…. …45

Şekil 4.3. Postoperatif 30. gündeki radyografik görünüm……...……. …46

Şekil 4.4. Postoperatif 45. gündeki radyografik görünüm…..…….….47

Şekil 4.5. Postoperatif 60. gündeki radyografik görünüm……...…….48

Şekil 4.6. 30. güne ait defektlerin postoperatif makroskobik görüntüsü . 49

Şekil 4.7. 60. güne ait defektlerin postoperatif makroskobik görüntüsü...50

Şekil 4.8. 30. gün kontrol grubu histolojik görüntüsü (H&E x4)…...…..51

Şekil 4.9. 30. gün Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (H&E x4)52

Şekil 4.10. 30. gün Tideglusib grubu histolojik görüntüsü (H&E x4)…...53

Şekil 4.11. 30. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (H&E x4)…… ……....54

Şekil 4.12. 30. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (Masson's Trichrome x10)……..…. 55

Şekil 4.13. 60. gün Kontrol grubu histolojik görünütüsü (H&E x4…… .56

Şekil 4.14. 60. gün Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (H&E x4)……57

Şekil 4.15. 60. gün Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (Masson's Trichrome x4)…… ……..…..….. ….57

Şekil 4.16. 60. gün Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (Masson's Trichrome x40)……..…… … ….…..… . 58

Şekil 4.17. 60. gün Tideglusib grubu histolojik görüntüsü (H&E x4) ... .59

Şekil 4.18. 60. gün Tideglusib+ Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (H&E x4)…… ..…... 60

Şekil 4.19. 60. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (Masson's Trichrome x4)……..…..…… ..… .60

Şekil 4.20. 60. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu histolojik görüntüsü (Masson's Trichrome x40)……..……..… …..61

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Postoperatif izleme süreleri ve greft materyallerinin uygulandıkları defekt sayıları……..…… … ……40

Tablo 3.2. Modifiye Lane ve Sandhu radyolojik skorlama kriterle ...….41

Tablo 3.3. Kemik iyileşmesi ile ilgili histolojik skorlama parametreleri.42

Tablo 4.1. Modifiye Lane ve Sandhu skorlama kriterlerine göre defektlerin 30. ve 60. günlerdeki radyolojik değerlendirmeleri……..…….48

Tablo 4.2. 30. ve 60 gün iyileşen defekt bölgesinin rakamsal ölçüm değerleri……...……...…… ……62

Tablo 4.3. Modifiye histolojik skorlama kriterlerine (209) göre defektlerin 30. ve 60. günlerdeki değerlendirmeleri……...……..…..….63

KISALTMALAR

BMP: Kemik Morfogenetik Proteini (Bone Morphogenetic Protein)

VEGF: Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)

OPN: Osteopontin

ESM: Ekstrasellüler Matrikste

TGF-B: Transform Büyüme Faktörü (Transforme Growth Factor)

IGF-I: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (Insulin-Like Growth Factor 1)

IGF-II: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü- 2 (Insulin-Like Growth Factor 2)

IL- 1: İnterlökin-1

PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor)

ATPaz: Plazma Adenozin Trifosfataz

FGF Fibroblast Büyüme Faktörü (fibroblast Growth Factor)

FDBA: Dondurulmuş Kurutulmuş (Liyofilize) Kemik

DFDBA: Demineralize Dondurulmuş- Kurutulmuş Kemik

NaOH: Sodyum Hidroksit

H_2O_2: Hidrojen Peroksit

HA: Hidroksiapatit

TCP: Trikalsiyum Fosfat

YDR: Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu Tekniği

TCF: T Hücre Faktörü (T Cell Factor)

LEF: Lenfoid Güçlendirici- Bağlayıcı Faktör

GSK-3: Glikojen Sentez Kinaz

PSP: Progresif Supranükleer Palsi

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

KBD: Kritik Boyutlu Kemik Defektleri

PAA: Poli Amino Asit

ÖZET

TAVŞAN TİBİASINDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİNİN DEĞİŞİK KEMİK GREFTLERİ VE TİDEGLUSİB KULLANILARAK İYİLEŞMENİN RADYOLOJİK VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Kerem YENER

Veteriner Cerrahi Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Bu çalışmada tideglusib ve kemik greft karışımının kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Tideglusib, alzheimer gibi çeşitli nörolojik bozuklukların tedavisinde kullanılan bir ilaç olup literatürde yapılan bir çalışmada tideglusibin kemik rejenerasyonunda görev alan yolaklardan bir tanesi olan Wnt yolağı ile dentin dokusunun rejenerasyonu üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir. Dentin ve kemik dokusu yapısal ve iyileşme mekanizması olarak birbirine benzemektedir. Bu sebeple tideglusibin benzer etkiyi kemik dokusunda da gösterebileceğini düşünmekteyiz. Kemik greftlerinin temel görevi kemik rejenerasyonunun sağlanması ve yeniden modellenerek fonksiyonel iyileşmeyi sağlamaktır. Kemik greft materyalleri kaynaklarına göre dörde ayrılmaktadır. Bunlar; otojen, allojen, ksenojen ve alloplastik greft materyalleridir. Bu greft materyalleri çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle araştırmalar alternatif materyal ve uygulamalar üzerinde yoğunlaşarak devam etmektedir. Çalışmada toplam 16 adet Yeni Zelanda tavşan kullanılmıştır. Genel anestezi altında tavşanların tibia kemiklerinde unikortikal 3.5 mm çapında defekt oluşturulmuştur. Çalışmada gruplar şu şekildedir; Grup 1: Sol proksimal tibia defekt alanı kontrol (Defekt alanı boş bırakılmıştır), Grup 2: Sol distal tibia defekt alanına tideglusib+kalsiyum sülfat uygulanmıştır. Grup 3: Sağ proksimal defekt alanına sadece kalsiyum sülfat uygulanmıştır. Grup 4: Sağ distal defekt alanına sadece tideglusib uygulanmıştır. Tavşanların postoperatif 15, 30, 45 ve 60. günde tibia kemiklerinin medio-lateral radyografileri alınmıştır. Otuzuncu günde ilk 8 tavşan altmışıncı günde

ise kalan 8 tavşan histopatolojik incelemeler için sakrifiye edilmiştir. Elde edilen örneklerde yeni kemik oluşumu radyolojik ve histopatolojik analiz ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları tideglusib+kalsiyum sülfat grubunda en iyi iyileşmenin olduğunu ve kemik rejenerasyonu ile yeni kemik formasyonunu arttırdığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kemik İyileşmesi, Greft, Tideglusib, Kalsiyum sülfat

ABSTRACT

RADIOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF THE HEALING OF BONE DEFECTS CREATED EXPERIMENTALLY IN RABBIT TIBIA BY USING VARIOUS BONE GRAFT AND TIDEGLUSIB

Kerem YENER

Department of Veterinary Surgery, Doctoral Thesis

In this study, it is aimed to evaluate the effects of tideglusib and bone graft mixture on bone healing. Tideglusib is a drug used to treat various neurological disorders such as Alzheimer's and in a study conducted in the literature, tideglusib has been shown to have a positive effect on the regeneration of dentin tissue by the Wnt pathway, which is one of the pathways involved in bone regeneration. Dentin and bone tissue are similar in structure and healing mechanism. For this reason, we think that tideglusib may have a similar effect in bone tissue. The main task of bone grafts is to provide bone regeneration and functional recovery by remodeling. Bone graft materials are divided into four according to their sources. These; autogenous, allogeneic, xenogenous and alloplastic graft materials. These graft materials have several advantages and disadvantages. For this reason, research continues by focusing on alternative materials and applications. A total of 16 New Zealand rabbits were used in the study. Under general anesthesia, unicortical 3.5 mm diameter defect was created in the tibia bones of the rabbits. The groups in the study are as follows; Group 1: Left proximal tibia defect area control (Defect area left blank), Group 2: Tideglusib + calcium sulfate was applied to left distal tibia defect area. Group 3: Only calcium sulfate was applied to the right proximal defect area. Group 4: Only tideglusib was applied to the right distal defect area. Medio-lateral radiographs of the tibia bones of the rabbits were taken on the 15th, 30th, 45th and 60th postoperative days. On the thirtieth day, the first 8 rabbits were sacrificed, and on the sixtieth day, the remaining 8 rabbits were sacrificed for histopathological examinations. In the obtained samples, the new bone formation was evaluated by radiological and

histopathological analysis. The results of our study show that the tideglusib+calcium sulfate group had the best healing and increased bone regeneration and new bone formation.

Keywords: Bone Healing, Graft, Tideglusib, Calcium sulphate

1. GİRİŞ

Kemik doku; organizmanın ana iskelet sistemini oluşturan, üzerine yapışan kasların desteğiyle vücudun hareket etmesini sağlayan ve yapısındaki kalsiyum ile sertleşmiş özel bir dokudur (1). Kemik doku kendi kendini tamir edebilen, skar doku oluşmadan iyileşebilen ve remodelasyon ile kendini yenileyebilen tek dokudur (2). Ancak bu doku üzerinde meydana gelen çeşitli boyutlardaki defektlerin rekonstrüksiyonunda çeşitli kemik greftleri kullanılmaktadır (3).

Canlı dokuların anatomik yapılarını desteklemek ve/veya bu yapılar üzerinde meydana gelen defektlerin onarılmasını sağlamak için verici bölgeden alınarak alıcı bölgeye nakledilen bir doku parçasına veya organa greft denilmektedir. Bu amaçla insanlarda vücutta en çok greft olarak kullanılan doku kemik dokudur (4-6). Kemik greftleri, travmaya bağlı meydana gelen kemik kırıkları, kistlerin meydana getirdiği defektlerin onarılması, kemikteki maddi kayıpların telafi edilmesi, doğuştan ortaya çıkan deformitelerin ve kemikteki kist, tümör ve osteomiyelitis gibi patolojik olguların meydana getirdiği geniş kemik defektlerinin sağaltımında, kemik defektlerinin doldurulması ve kemik iyileşmesini hızlandırmak için kullanılan materyallerdir. Kemik greftlerinin temel görevi kemik rejenerasyonunun sağlanması ve yeniden modellenerek fonksiyonel iyileşmeyi sağlamaktır (4, 5). Kemik greftleri; uygulanan materyalin immünolojik kökenine göre otojen kemik greftleri ve homojen kemik greftleri, ksenogreftler, alloplastik ve kompozit greftler olarak sınıflandırılırlar. Bu greft materyalleri çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. (6, 7). Kemik greftlerinin kemik iyileşmesini artırıcı etkileri bulunmasına rağmen yabancı cisim reaksiyonu oluşturma ve reddedilebilme gibi dezavantajları bulunmaktadır (8). Kemik greftlerinin mevcut dezavantajlarını en aza indirmek ve ortadan kaldırmak için alternatif materyal ve uygulamalar üzerinde çalışmalar artarak devam etmektedir.

Alloplastik greftler yapay yollardan elde edilen sentetik yapıdaki greft materyalleridir. Otojen, allojen ve ksenojen greftlerin dezavantajlarına karşın alternatif arayışlar sonucu ortaya çıkmıştır (9). Bu greftler kemik dokusunun inorganik yapısına benzer ve kemiklerdeki büyük defektlerin kapatılmasında yapısal destek görevi görürler (10). Ayrıca travmatik, doğmasal ve gelişimsel defektlerin sağaltımında başarıyla kullanılırlar (11). Alloplastik greftler seramik, metalik ve polimer kökenli olarak üç sınıfa ayırmak mümkündür (12). Kemiğin inorganik yapısına en çok benzeyen seramiklerdir. Seramikler bu özelliklerinden dolayı greft materyali olarak daha çok

tercih edilmektedir. Seramik yapılı alloplastik greftlerden kalsiyum sülfat, paris alçısı veya gypsum adlarıyla da bilinmektedir (13, 14).

Kalsiyum sülfat, yavaş çözünürlüğe sahip, kristalize yapıda ve 30-60 gün arasında rezorbe olabilmektedir. Enfeksiyon varlığında kullanılabilmesi, pahalı olmaması ve rezorbe olması önemli avantajları arasındadır (13, 15). Ancak nadir de olsa canlı organizmada alerjik reaksiyon ve enflamatuar oluşturabilmesi gibi dezavantajler rapor edilmiştir (16).

Tideglusib, alzheimer gibi çeşitli nörolojik bozuklukların tedavisinde kullanılan bir kimyasaldır. (17, 18). Neves ve ark. (2017) yaptığı bir çalışmada dentin dokunun rejenerasyonunda tideglusibin olumlu etkisi rapor etmektedir (19). Literatürde, tideglusibin bu etkisinin kemik rejenerasyonunda görev alan yolaklardan bir tanesi olan Wnt yolağı aktivasyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği ifade edilmiştir (20). İyilikçi (2020) tarafından yapılan bir çalışmada tideglusib BMP (kemik morfogenetik proteini) ve VEGF (vasküler endoteliyal büyüme faktörü) salınımını arttırarak kemik oluşumunu tetiklemiş, calvaryal kemikteki defektlerin iyileşmesinde olumlu etkisinin olduğu ve herhangi bir toksisite meydana gelmediği rapor edilmiştir (21).

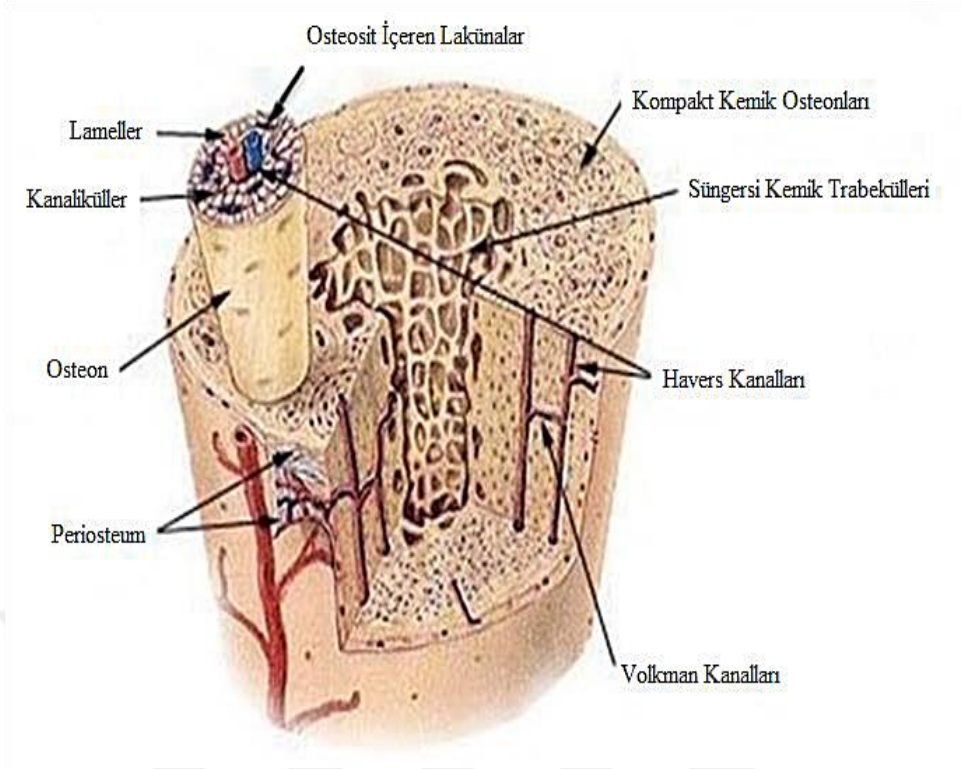
Dentin doku ile kemik doku yapısal ve iyileşme mekanizması olarak birbirine benzeyen mineralize yapılardır (22). Guel- Vaquez ve ark (2018) tarafından yapılan çalışmadan tideglusibin kalvaryal kemik rejenerasyonu ve diş çürüklerinin tedavisi üzerine olan olumlu etkilerinden yola çıkılarak, ekstremitelerde deneysel olarak oluşturulan kemik defektleri üzerindeki rejenerasyon etkinliği alloplastik bir greft olan kalsiyum sülfat ile karşılaştırılarak, radyolojik ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilecek sonuçların kemik defektlerinin tedavisinde bir kaynak oluşturacağı, benzer hastalıklarının tedavisi ile ilgili çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Doku

Kemik, canlı vücuduna yapısal destek sağlayan, beyin ve göğüs kafesi içindeki organları koruyarak, kalsiyum, fosfat ve diğer mineralize iyon rezervuarı oluşturan, kas ve tendonların tutunmasına imkan tanıyarak destek doku olarak hareketi sağlayan, dinamik, konnektif ve ileri derecede özelleşmiş bir bağ dokudur (23). Hayati önem taşıyan organları hem koruyup hem de destek olmaktadır. Yapısında lökosit üretiminden sorumlu kemik iliği ile kan yapma görevini üstlenerek hemopoietik fonksiyon göstermektedir (24). Vücudun en sert dokusu olan kemik bu özelliğinden dolayı oldukça iyi kanlanan bir dokudur. Kan perfüzyonunu gelişimi sırasında yapısına katılan kapiller sağlar. Osteositler kapillerin en az 0,2 mm yakınında olacak şekilde konumlanmıştır (25).

Vücut ağırlığının %18-20'sini oluşturarak basınç, çekme, eğilme ve bükülmelere karşı oldukça dayanıklı olan kemik doku, canlı yaşamı süresi boyunca istemli fiziksel aktivitelere destek ve direnç sağlayarak, yapısını, hacmini ve iç yapısını oluşturan bileşenlerini dıştan gelen mekanik uyarımlar doğrultusunda şekillendirebilen ve kendini yapısal olarak yenileyebilen özelleşmiş bir yapıdır (15, 26). Kemik dokunun bu özellikleri dikkate alındığında, büyüme ve iyileşmesi birçok biyokimyasal, biyomekaniksel, hücresel, hormonal ve patolojik olayın birbirini takip eden reaksiyonu olarak düşünülmektedir (Şekil 2.1) (25, 27).

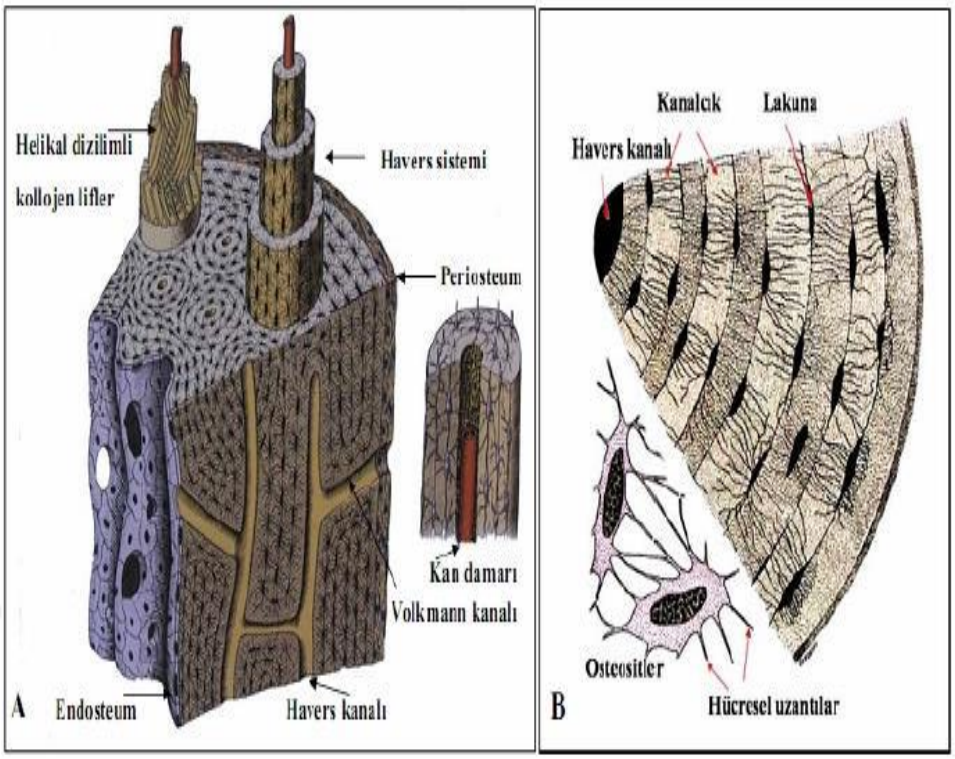


Şekil 2.1. Kemik dokunun normal yapısı (52)

2.1.1. Kemik Dokunun Makroskobik Yapısı

Kemik dokunun makroskobik yapısı sert (kompakt, kortikal) kemik ve süngerimsi (trabeküler, kansellöz, spongiyoz) kemik olarak ikiye ayrılmaktadır. Sert kemik, uzun kemiklerin gövde kısmı ile kemiğin metafizer ve epifizer bölgelerinde süngerimsi kemiğin üstünde bulunur. Süngerimsi kemik ise uzun kemiklerde sert kemiğin alt kısmında ve küçük kemiklerin iç bölgeleri ile vertebralarda bulunmaktadır (28). Uzun, kısa ve yassı kemiklerde bulunan süngerimsi kemik ve sert kemiklerin miktarları ve dağılımları farklılık göstermektedir (29).

Sert (kompakt, kortikal) kemik, iskelet sisteminin yaklaşık %85'ini oluşturur. Gelen travmatik kuvvetlere karşı direnç oluşturmak, kemik mobilizasyonuna yardımcı olmak ve kemik dokunun destek görevi yaptığı organları korumak görevleri arasındadır (30). Sert kemikte mikroskobik olarak görülebilen lamel adı verilen kemik katmalarının oluşturduğu kanalcıklar mevcuttur. Bu lameller; dış çevresel lameller (outer circumferential), iç çevresel lameller (inner circumferential), osteonlar (Haversian Kanal Sistemi) ve interstisyel (intersitial) lameller gibi 4 farklı tip olarak uzun kemiklerin diyafizer bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 2.1- 2.2) (31, 32).



Şekil 2.2. Sert kemiğin morfolojisi. A) Havers ve Volkmann kanal sistemlerinin kemik doku içerisindeki yerleşimleri. B) Lamellar yapıların paralel ve farkı yönlerde dizilimleri. Lakunadan uzanan kanaliküller havers kanalları arasındaki bağlantıyı sağlanmaktadır (92).

.

Dış çevresel lameller (outer circumferential), sahip oldukları Sharpey lifleri sayesinde kemik ile en alt tabakasında bulunduğu periost arasındaki kuvvetli bağlantıyı sağlayarak diyafizer hattın en dış kısmını oluştururlar. İç çevresel lameller (inner circumferential), dış çevresel lamellere benzer ancak süngerimsi kemik trabekülleri bu tabakadan destek alarak kemik iliğine yapılanarak gelişim gösterir (33).

Osteonlar (Haversian Kanal Sistemi), çevresinde ortalama en çok 4 ile 20 halkalar halinde lamelin dizilmesi ile oluşurlar. Lamellerin sayısını içerisindeki hücrelerin beslenme kapasiteleri belirler. Haversian kanalları, Volkmann kanalları ve rezorbsiyon kaviteleri ile sert kemiğin gözenekli yapısındaki gözenek miktarını belirler. Bu gözenekli yapı ise osteositlerin kemik matriksi içerisindeki bulundaki kısımları oluşturur (34, 35).

Süngerimsi kemik, sert kemikte olmayan içleri kemik iliği ile dolu labirent gibi birbirleriyle ilişkili, düzensiz boşlukları içeren kemik trabeküllerinden oluşmaktadır (Şekil 2) (36). Uzun kemiklerin metafizer bölgesinde, vertebralarda ve düz kemiklerde bulunan süngerimsi kemik toplam kemiklerin %15'ini oluşturmaktadır. Gözenekli yapının oldukça fazla olduğu bu kemikte kan hücrelerinin aktif çoğaldığı safhalarda ve

mezenkimal kök hücreler için depo olarak kullanıldığı aşamalarda kırmızı rengi alırken, yaşlanmaya bağlı yağ depolanması görev aldığında sarı renkte gözlenirler (28, 29, 35).

2.1.2. Kemik Dokunun Mikroskobik Yapısı

Kemik dokunun mikroskobik yapısında primer (nonlamellar, immature veya woven) ve sekonder (lamellar veya matur) kemik olmak üzere iki farklı ana türü olduğu gibi kompozit ve bundle olarak adlandırılmış kemik türleri de bulunmaktadır (36).

Primer (nonlamellar, immature veya woven) kemik, çoğunlukla geçici olarak kemik iyileşmesi esnasında veya fetal gelişme sırasında oluşan kemik yapısıdır (33, 37). Kırık iyileşmesi sırasında çok çabuk oluşur, lameller yapısı az, kollajen lifleri çok, hücrece zengindir (38). Kemik iyileşmesi döneminde 30-60 mm/günlük meydana geliş hızı ile büyük önem arz ederler. Primer kemik çabucak mineralize olarak yerini sekonder kemiğe bırakır (29).

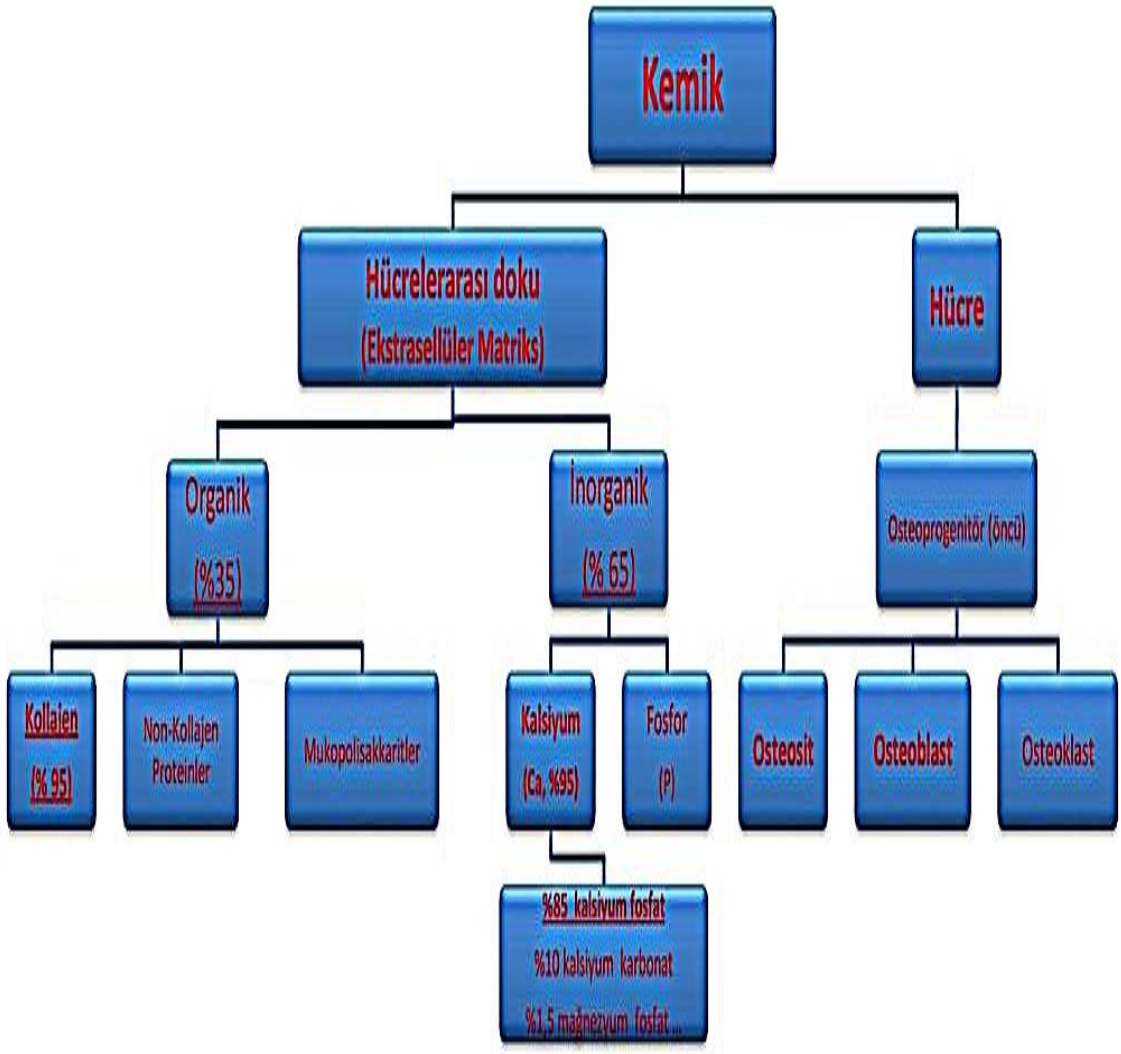
Sekonder (lamellar veya matur) kemik, çoğunlukla yetişkinlerde bulunan, iyi organize olmuş, zengin kollajen yapılı, mineralizasyonu yüksek, travmatik kuvvete karşı dirençli, oldukça güçlü bir kemik yapısıdır (33, 37).

Kompozit kemik, primer (birincil) kemikten sekonder (ikincil) kemiğe geçiş sırasında ortaya çıkan kemik yapısı iken bundle kemik ligamentlerin ve eklemlerin etrafında çizgisel iç bağlantıları olan kemik yapısıdır (33, 36).

2.1.2.1.Kemik Matriksi

Kemik matriksi, kemiğin hücresel olmayan, kalsifiye olmuş ara maddesine denilmektedir (36). Kemik dokusunun matriksi, sert yapısından dolayı difüzyona imkan vermez bu yüzden beslenme kanallar aracılığı ile olmaktadır. Sert kemiğin enine alınan kesitlerinde bu kanal sisteminin düzenli olarak yerleşmiş halkalar şeklinde olduğu görülmektedir. Bu halkalar 3-7 μm kalınlığında ve genelde kemik kanalı (Havers Kanal Sistemi) etrafında olacak şekilde düzenli dairesel bir yapı oluşturur. Bu dairesel yapılar; osteonlar (Haversian Kanal Sistemi), periost altındaki dış çevresel lameller (outer circumferential), endosteum etrafındaki iç çevresel lameller (inner circumferential) ve interstisyel (intersitial) lamellerdir. Kemik dokusunun en iç tabakasından en dış tabakasına kadar besin aktarımının sağlanması bu lameller ile olmaktadır (39).

Kemik matriksi organik (%35) ve inorganik (%65) olmak üzere 2 bileşenden oluşmaktadır (Şekil 2.3) (37).



Şekil 2.3. Kemik dokunun bileşenlerinin şematik görünümü (37).

2.1.2.1.1. İnorganik Matriks

İnorganik matriks, kemik dokunun mineralize yapısıdır. Kemik matriksinin %85 oranı ile en çok kalsiyum fosfat olmak üzere kalsiyum karbonat, kalsiyum florit, magnezyum florit, magnezyum hidroksit, magnezyum sülfat bileşikleri ile birlikte sitrat ve karbonat iyonlarından oluşmaktadır (40). Bu mineralize yapının büyük kısmı kalsiyum ve fosfor gibi iyonların meydana getirdiği hidroksiapatit (Ha) kristallerinden

oluşmaktadır. Ha krsitalleri kollajen fibriller üzerinde küçük tabakalar ve çubuklar halinde birikerek organize olmasıyla kemik dokuya sertlik, dayanıklılık ve sağlamlık kazandırmaktadır (41). Vücut sıvıları ile matriks arasındaki iyon değişimi Ha kristallerinin üzerinde hidrate olmuş hidrasyon tabakası ile gerçekleşmektedir. Ayrıca kalsifikasyonun kollajen fibriller üzerinde biriken kalsiyum tuzları ile başladığı bilinmektedir. Bu mekanizmaya ise proteoglikanlar ve kalsiyum bağlamada yüksek affinitesi olan osteopontin (OPN) gibi glikoproteinler sebep olmaktadır. Kalsiyum tuzları biriktikçe osteoblastik aktivite artarak ekstrasellüler matrikste (ESM) yoğunlaşır (39, 42, 43).

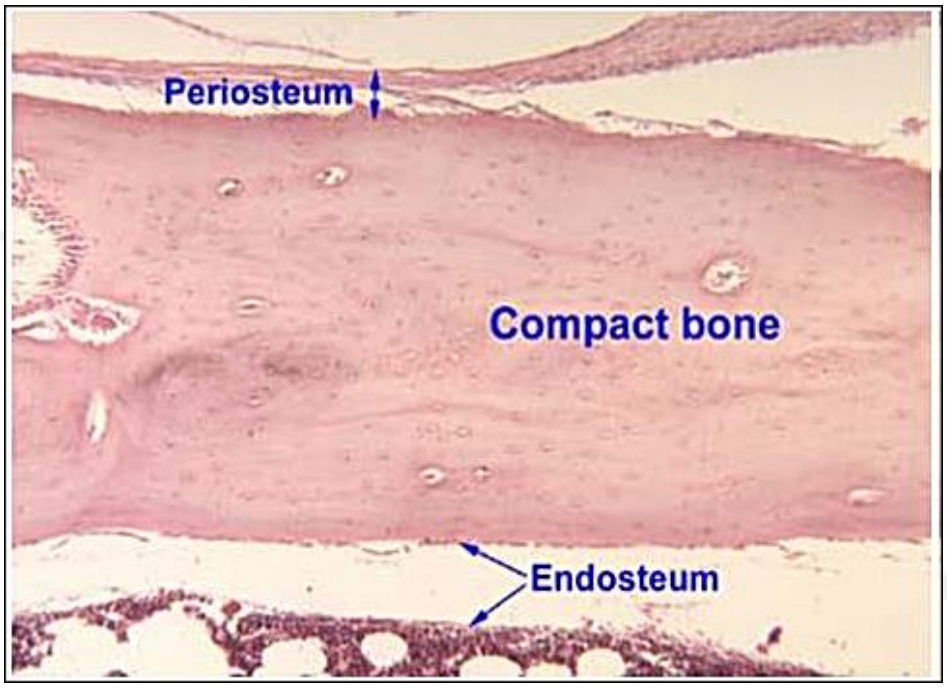
2.1.2.1.2. Organik Matriks

Organik matriks, kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %35'ini oluşturur ve bunun %90 oranını Tip 1 kollajen, %10 oranını ise kollajen olmayan bileşenler meydana getirir. Kemiğin organik matriksine osteoid madde de denilmektedir (36). Kollajen bileşenler, kemiğin kuvvet çizgileri boyunca konumlanarak dayanıklı bir gerilme kuvvet direnci sağlayan fibröz proteinlerden oluşmaktadır (43, 45). Kollajen olmayan bileşenler, fonksiyonel olarak en işlevsel olan proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. Kollajen dışı proteinler, organik matriks kalsifikasyonu, hücrelerin inorganik matriksle penetrasyonu ve büyüme faktörü salınımında görev almaktadırlar (46, 47).

2.1.2.2. Periost (Periosteum)

Periost, eklem yüzeyleri hariç kemikleri dıştan sıkıca saran biyolojik ve mekanik öneme sahip bir bağ doku membranıdır (Şekil 2.4) (48, 49). Periostun yapısı fazla miktarda fibroblast, kan ve lenf damarları, duyu sinirleri, elastik ve kollajen lifler içermektedir (44, 45). Gelişme dönemi dış tabaka (stratum fibrosum) ve iç tabaka (stratum kambiyum) olmak üzere iki katı içermektedir. Dış tabaka, kollajen liflerden zengin ve fibroblast bulunduran kalsifiye olmamış düzensiz sıkı bağ dokudan oluşmaktadır. İç tabaka ise osteoblasta dönüşebilme kabiliyeti olan osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır. Bu sebeple iç tabakaya osteojenik veya kambiyum tabakası da denilmektedir. Kemik onarımı ve şekillenmesinde iç tabaka oldukça aktif bir rol oynar (50).

Olgun kemiklerde periost, kemik dokuya oldukça sıkı bir şekilde tutunmaktadır. Dış tabakadan (stratum fibrosum) ayrılan kollajen lifler (Sharpey lifleri) periostu kemiğe bağlamak için; kemik dokunun içine yerleşerek dış kısımdaki sirkumferansiyel lamellerle yüzeye yakın ara lamellerin derinlerine kadar inmektedir. Bunun yanı sıra P maddesi (substance P) gibi reseptörler periost hücrelerinde bulunmakta ve kemik dokunun periostal büyüme ile onarımında düzenleyici bir özelliği olduğu görüşü bulunmaktadır (51).



Şekil 2.4. Periost ve endostun mikroskobisi (92).

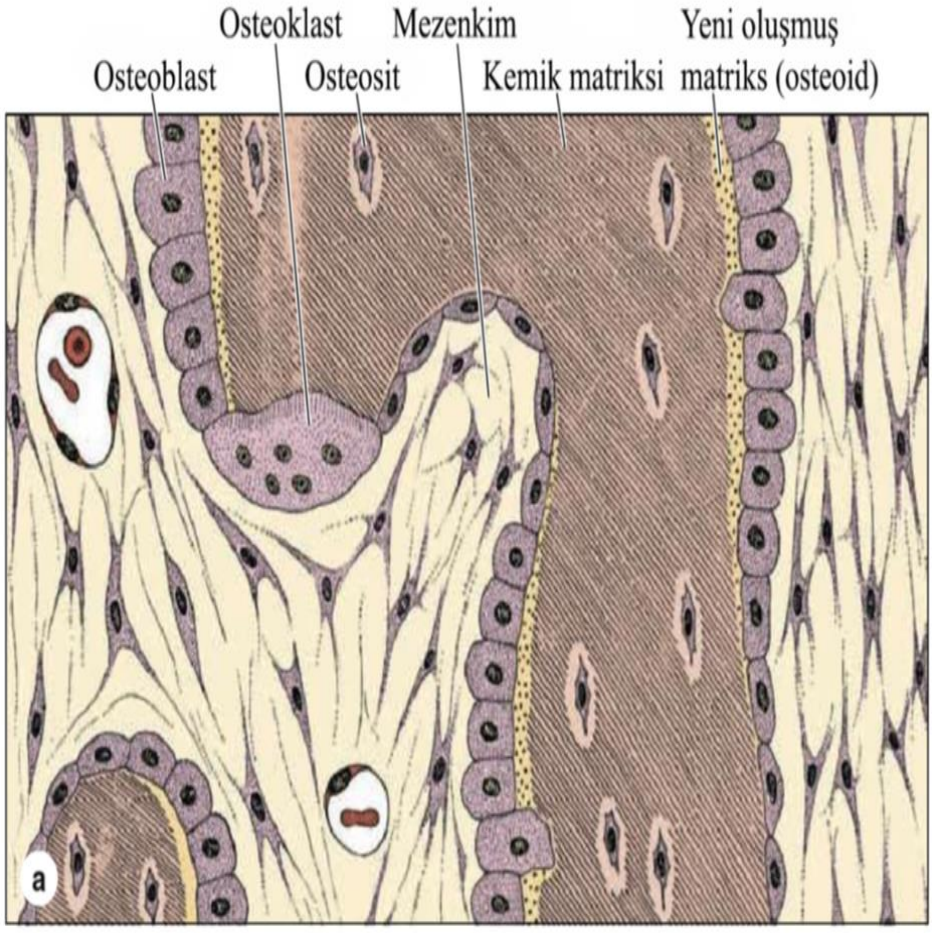
2.1.2.3. Endost (Endosteum)

Endosteum, kemik dokunun iç tabakasında bulunarak bütün boşlukları örten, kan damarlarından zengin ve tek katlı yassı osteoprogenitör hücreler ile miktarca az olarak bağ dokusundan oluşmaktadır (Şekil 4) (49, 52). Sert kemiklerin iç yüzeyleri ile süngerimsi kemikleri oluşturan trabeküllerin dış yüzeyleri endosteumdan oluşmaktadır. Endosteum, kemik iliği dokusunun devamı sonucu ortaya çıkan retiküler bağ dokusundan oluşmuştur. Endosteumların kemik dokuya bakan kısımlarında tek sıra halinde sıralanmış osteoprogenitör hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler sayesinde içerisinde osteoblastlar bulunduğu gibi aralarında osteklastik hücreler de bulunabilmektedir (53).

Periost ve endosteumun temel görevi; içerdikleri osteoprogenitör hücreler yardımı ile osteoblastların üretimini sürekli olarak sağlayarak kemik dokunun beslenme, büyüme ve onarımını sağlamaktır. Burdan çıkarılacak sonuç bu iki yapının ortopedik operasyonlarda zarar görmemesi kemik iyileşmesi açısından önemlidir (54).

2.1.2.4. Kemik Hücreleri

Kemik dokunun kıkırdak dokudan en büyük farkı kan damarı içermesidir (55). Kemik dokuyu; hücreler arası kalsifikasyon gösteren özel bir bağ doku olan kemik matriksi ile bu matriksin içerisindeki boşluklarda bulunan osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklast adı verilen 4 tip hücre yapısı oluşturmaktadır (Şekil 2.5- 2.6) (37).



Şekil 2.5. Kemik dokusunu oluşturan hücrelerin görünümü (25).

2.1.2.5.1. Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler kemik dokunun ana hücleri olup, kemiğin eklem oluşturmayan tüm yüzeylerinde bulunmaktadır (38, 55). Bu hücre yapısı internal medüller yüzeyde bulunan endosteum ile periostun derin katmanlarını meydana getirmektedir. Yoğun, düzensiz ve konnektif bir doku olan fibröz tabaka kalın dış katmanlarını oluşturmaktadır. Osteojenik tabaka ise daha ince ve zayıf iç katmanları meydana getiren osteojenik hücreler tarafından oluşturulur. Osteoprogenitör hücreler, fibroblastlara benzeyen, kemik hücresine dönüşebilen mezenkim hücrelerini içeren ve mitoz bölünme ile çoğalarak osteoblastları oluşturan özelleşmiş yapılardır. Kemik dokunun normal gelişimi sırasında osteonlarının sayıca artması için ayrıca travmatik, patolojik vb. sebeplerle yıkımlanan kemik dokunun yeniden şekillenmesi için bölünerek osteoblastları oluşturarak çoğalırlar (56). Ayrıca düşük oksijen konsantrasyonlarında kondrojenik hücrelerde dönüşebilmektedir (27).

2.1.2.5.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik yapıcı hücreler olup, tip I kollajeni, glikoproteinleri, proteoglikanları ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, osteoprotegerin gibi bazı proteinleri salgılayarak osteoid dokuyu ve kemik matriksini oluştururlar (56). Kemik yapımı aktivitesi sonlanmaya başladığı durumlarda bir kısmı osteositlere dönüşürken diğer kısımları ise periost ve endosteum yüzeylerindeki örtücü hücrelere dönüşürler (57). Kemik morfogenitk protein (BMP), transform büyüme faktörü-Beta (TGF-β), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-I), insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-II), interlökin-1 (İL-1), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi sinyal proteinleri de salgılayarak kemik rejenerasyonunda görev alırlar. Salgıladıkları sitokinler, büyüme faktörlerinin ve hormonların çalışma mekanizmasının düzenlenmesinden sorumludur. Ayrıca bu sitokinler ve büyüme faktörleriyle osteoklastların ve bazı hematopoetik hücrelerin değişiminden sorumludur. Kemik matriksinin organik bileşenlerinin sentezine yardımcı olurlar. Plazma adenozin trifosfataz (ATPaz) olarak bilinen ve kalsiyum pompasından sorumlu bu enzimi içerirler. ATP hidrolizi sonucu ortaya çıkan enerji ile hücre dışı matrikse kalsiyum iyonu iletirler. Osteoblastlar, D vitamini metabolizmasının yan ürünlerine, paratiroid hormonuna, prostoglandinlere, gonal ve adrenal steroidlere ait moleküllerin özel reseptörlerini içerirler (58-60).

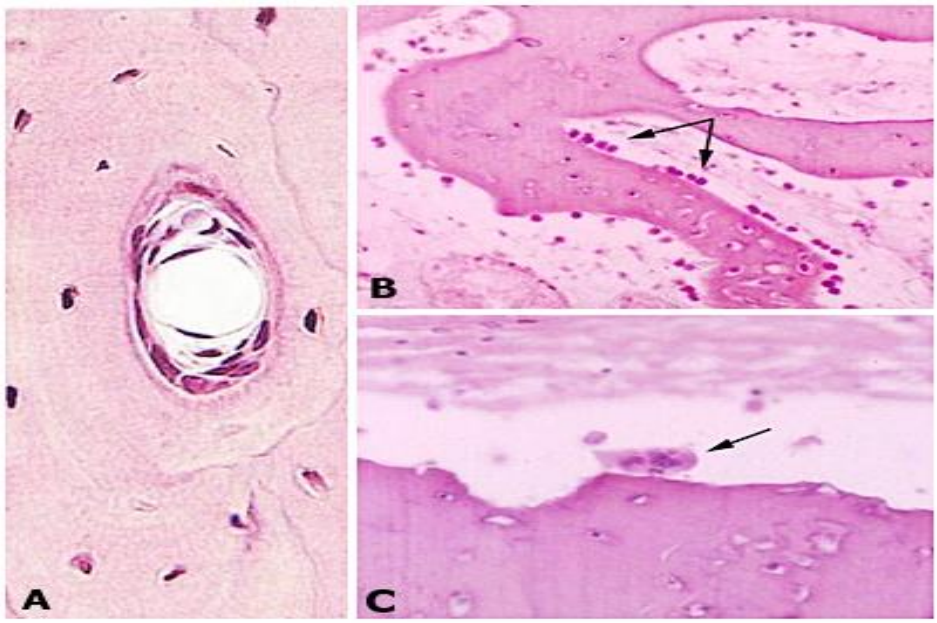
2.1.2.5.3. Osteositler

Osteositler, kemik matriksi içerisinde bulunan olgun osteoblastlardan oluşmaktadır (Şekil 6). Osteblastların farklılaşması sonucu oluşan osteositler, kemik matriksinin lamelleri arasında bulunan lakunalar içine yerleşmiştir. Her bir lakuna bir adet osteosit içermektedir. Osteositler kalsifiye kemik dokusunda bulunurlar. Osteositler, osteoblastlara göre daha elips, lakunalara uygun yerleşecek şekilde oval ve yassı yapıdadırlar. Osteositlerde bulunana stoplazmik uzantılar komşu osteositlerin birbirleriyle temas kurmasını sağlayarak besin maddelerinin taşınmasını sağlamaktadırlar (57). Osteositler; remodeling oluşumuna katkı sağlayacak metabolik olayların düzenlenmesinde, kemik dokuya kalsiyum iyonların aktarılmasını sağlayarak kemiğin mineral yapısına katkı sağlanmasında ve kemik dokunun beslenmesi için kan damarlarının yardımı ile oksijen transferinin gerçekleşmesine katkı sağlarlar (61-64).

2.1.2.5.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar; osteoprogenitör kök hücre farklılaşmasıyla, mononükleer fagosit sistemi ve açıklanamayan mononükleer hücre sirkulasyonu olan prosteoklastlar olarak adlandırılan üç orijinden köken almaktadır (Şekil 6)(65). Bu hücre tipi çok çekirdekli ve büyük, kemik rezorpsiyonundan görevli ve makrofaj özelliğine sahip kemik yıkıcı hücrelerdir (27, 52). Osteklast hücrelerde fazla miktarda lizozom bulunmakta, stoplazmalarında zarsız ribozamlar oldukça fazla olmakla birlikte stoplazmik katlarından oluşan ve kemik doku yüzeyine temas eden kısımlarında birbirlerinden bağımsız kıvrımlı yapıda kenarlar vardır (63).

Osteoklastlar, salgıladıkları asit fosfataz ile kemiğin inorganik matriksini, lizozomal enzimler ile de organik matriksini ayrıca kalsifiye kartilajı çözerek kalsifiye olmuş esas maddeyi serbest hale getirerek Howship Lakünaları olarak adlandırılan kemik yüzeyi eroziv alanları oluştururlar (66, 67). Bu lakünalar, kemik rezorbsiyonunun olduğu bölgeler olup paratiroid hormon ve kalsitonin hormonları osteoklastların kemik rezorbsiyonunun düzenlenmesinde görev alırlar (27, 52). Kemik dokunun rezorbsiyonu sonucu ortaya çıkan artık maddelerinden elimine edilmesinde görev alırlar. Kemik dokunun onarımı veya yapımı sırasında trabeküllerin yüzeyine ya da sert kemiklerin iç yüzeylerine konumlanarak bu yapıların rezorpsiyonu ile kemik dokuya genişleyip uzayabilme özelliği kazandırırlar (66, 77).



Şekil 2.6. Kemik hücrelerinin mikroskobisi A) osteosit, B) osteblast, C) osteklast (70).

Kısaca; osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar kalsiyum regülasyonu ile kemik dokunun yeniden yapılanma, onarım, şekillenme ve hemostazı gibi bölümlerinde aktif olarak görev alırlar (68).

2.1.3. Kemik Oluşumu (Osteogenez)

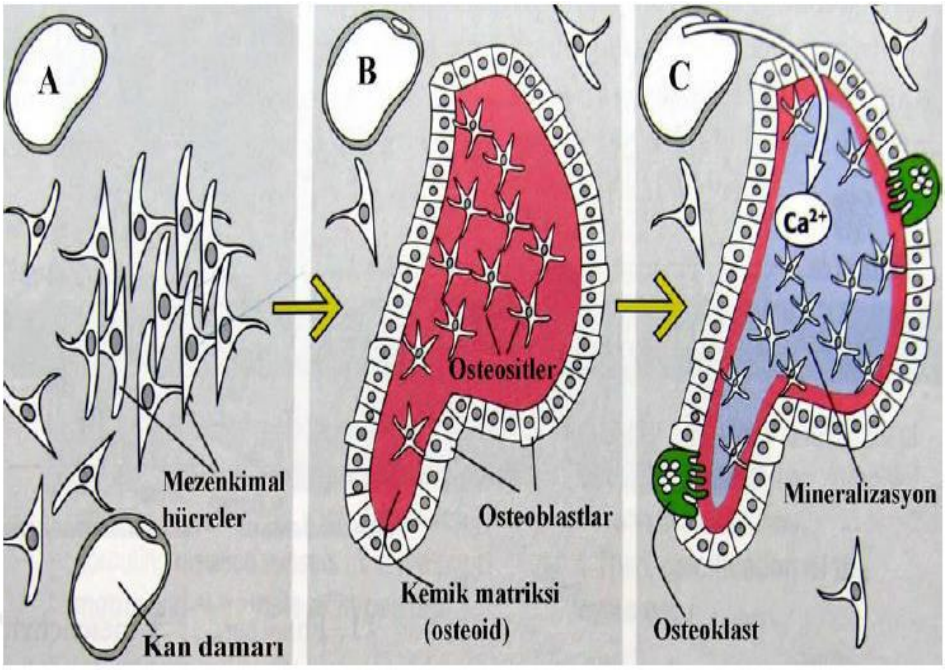
Kemik oluşumu (osteogenez), kemik dokunun büyüme ve gelişmesini kapsayan embriyonik dönemde başlayıp, genç erişkin döneme kadar devam eden bir süreçtir. Kemik oluşumu, osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan mineralizasyonu şeklinde olduğu durumlarda intramembranöz ossifikasyon (zarlar arası kemikleşme) veya kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin çökmesi ile gerçekleştiğinde endokondral ossifikasyon (kıkırdak kemikleşme) olarak adlandırılan iki yolla gerçekleşmektedir (36, 52). İntramembranöz ossifikasyon ve endokondral ossifikasyonun mekanizmalarında ilk önce birincil kemik meydana getirilir. Sonrasında birincil kemik rezorbe edilerek yerine tam lamellar ikincil kemik oluşturulur (24). Endokondriyal ossifikasyonda intramembranöz ossifikasyona göre daha kompleks süreçleri içermektedir (53).

Kemik yapım ve yıkım olayları canlıların kemiklerinde hayat boyu devam eden bir süreçtir. Yaşam periyodunun gençlik çağında kemik yapımı kemik yıkımından fazla olduğu gibi, orta yaşlı dönemlerinde dengede, yaşlılık çağında ise tam tersi kemik yıkımı kemik yapımından fazla gerçekleşmektedir (53).

2.1.3.1.İntramembranöz Ossifikasyon (Zarlar arası Kemikleşme)

İntramembranöz ossifikasyon (zarlararası kemikleşme), matriksin bağ doku yardımı ile direkt olarak kalsifikasyonu sonucu gerçekleşmektedir (69). Öncelikle kemik oluşacak bölgeye mezenkim hücreleri nüfus ederler. Mezenkim hücrelerinin bu aktivasyonu intramembranöz kemikleşmeyi başlatmaktadır. Daha sonra mezenkim hücreleri osteoprogenitör hücrelere farklılaşırlar. Osteoprogenitör hücrelerin stoplazmaları asidik halden bazik hale geçtiği süreçte golgi aygıtıda daha belirgin hale gelir. Bu geçiş sürecinde osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşerek sonrasında kollajenler (ağırlıklı olarak Tip I kollajen molekülleri), kemik sialoproteinleri, osteokalsin ve kemik matriksinin diğer komponentlerini salgılanmasını sağlar (70). Osteoblastların etrafında kemik matriksi yerleşmeye başlamasıyla osteoblastlar osteositlere dönüşürler. Kemikleşme yapıları ortaya çıkmasıyla bu yapılar birleşerek süngerimsi kemik dokuyu oluştururlar. Süngerimsi kemik dokuda yapılanarak sert kemik dokusuna dönüşür. Bu süreçte mezenkim hücreleride kemik iliğinin oluşmasına katkı sağlarlar (Şekil 2.7) (36, 52).

Mandibula ve maksillanın bir kısmı ile kafatasının frontal, parietal, oksipital ve temporal kemiklerinde, sternumda, pelviste, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında intramembranöz ossifikasyon (zarlar arası kemikleşme) görülür (15, 38, 71). Bu mekanizma uzun kemiklerin kalınlaşmasına ve kısa kemiklerin büyümesine katkı sağladığı gibi kemikte meydana gelen defektlerin rejenerasyonunda ve kırıkların iyileşmesinde periosteal iyileşmeyi gerçekleştirir (47).



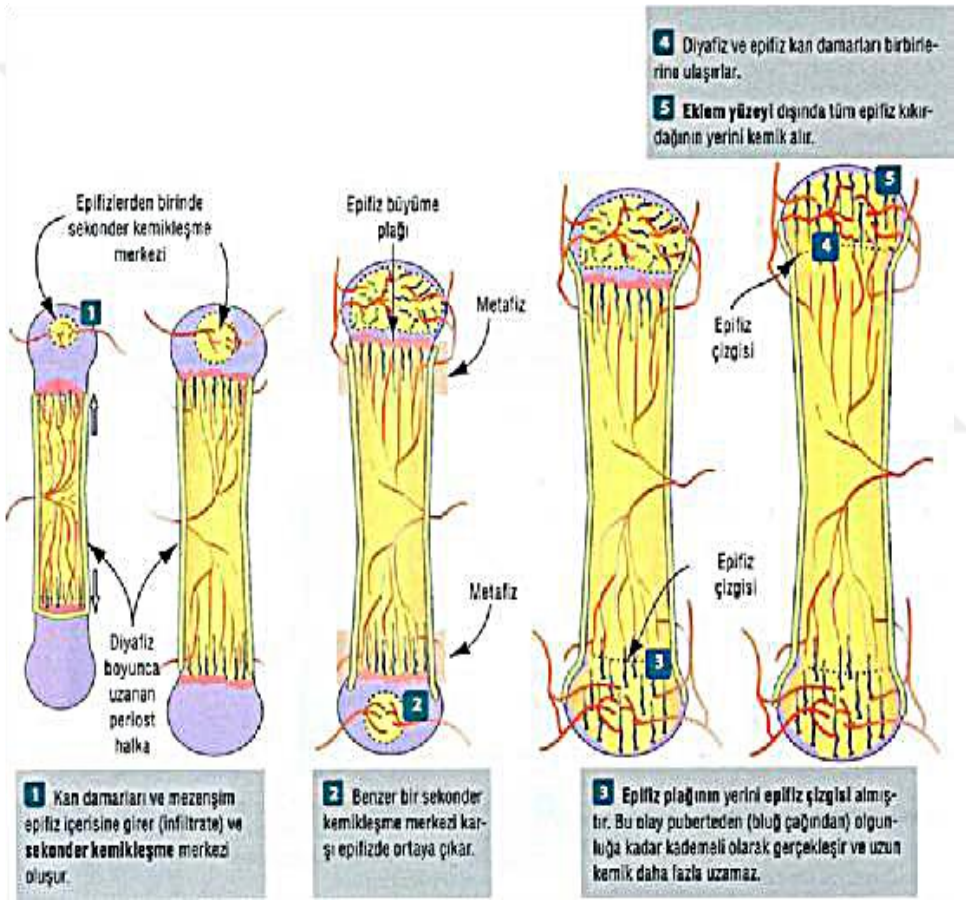
Şekil 2.7. İntramembranöz ossifikasyon. A) Mezenkimal hücrelerden kemik dokunun meydana gelmesi. B) Mezenkimal hücreler bölünerek ilk olarak osteoprogenitör hücrelere, ikinci olarak osteoblastlara dönüşmesi ve kemik matriksini oluşturması. C) Kalsiyum ve fosfor iyonlarının kan damarlarından osteoid dokuya taşınması, osteoblastlar sayesinde alkalen fosfataz salgılanarak kalsiyum fosfatın oratay çıkması ve kalsifikasyonu gerçekleştirmesi. Osteoklastların kemik dokuyu rezorbe ederken osteoblastlar da yeni kemik lamellerini oluştururlar (52).

2.1.3.2.Endokondral Ossifikasyon (Kıkırdak Kemikleşme)

Endokondral Ossifikasyon (Kıkırdak Kemikleşme), embriyonik dönemde başlayıp büyüme ve gelişme dönemi tamamlanıncaya kadar geçen süreçte iskelet sistemindeki kıkırdak yapıların kemik dokuya evrilmesi sonucu gerçekleşmektedir (47). Bu ossifikasyon türü uzun ve kısa kemiklerin oluşumunda gözlenir. Endokondral ossifikasyonda süreç ilk önce kıkırdak doku oluşumu daha sonra intramembranöz ossifikasyonun başlamasıyla gerçekleşir. Kıkırdak doku, mezenkim hücrelerinin kondrositleri oluşturması ve oluşan kondrositlerin de yapılanması sonucu meydana gelir. Kıkırdak dokunun orta hattında silindirik yapılı boş kemik halkaları bulunur. Bu kemik halkalarının perikondriyumun iç kısmında intramembranöz ossifikasyon gerçekleşir. Bu sürecin devamında kıkırdak doku, hücrelerin büyümesi ve matriksin kalsifikasyonu gibi hücre ölümleri nedeniyle yıkımlanır. Daha sonra kıkırdak matriksi üç boyutlu bir yapı haline gelir ve osteoblastlar kalsifiye matriks içeren kıkırdak benzeri

bu dokuyu sararar birincil kemik katmanlarını oluşturur. Oluşmuş bu birincil kemik yapı eozinofilik, kalsifiye kıkırdak doku ise bazofiliktir. Kıkırdağımsı bu birincil kemik yapının distal ve proksimal bölgelerinde yani epifizlerinde ikincil kemik yapı şekillenmeye başlar. Birincil (primer) ve ikincil (sekonder) kemik yapı oluşumları merkezleri kemik iliği ile dolan boşlukları oluşturmaya başlarlar (37).

İkincil kemik yapılarının eklem kıkırdağı ve her iki epifizi diyafize bağlayan epifiz kıkırdağı olarak merkezlerindeki iki bölgede kıkırdak doku kalır. Bunlardan epifizer kıkırdak doku kemiklerin uzamasından sorumlu olduğu için büyüme bittiği zaman ortadan kalkarken, eklem kıkırdağı canlı yaşamının sonuna kadar kalır (Şekil 2.8) (25, 72).



Şekil 2.8. Endokondral ossifikasyonda ikincil kemik yapı oluşumu ve aşamaları (52).

Uzun kemiklerin epifizer bölgesindeki epifizer plaklarda kondrositlerin çoğalması ile kemik boyunun uzaması gerçekleşir. Kondrositler çoğalma sonucu irileşir ve matriksleri kalsifiye olarak ölürler. Kalsifiye olmuş matrikslerde osteoblastlar birincil kemik yapısını oluşturmaya başlar. Bunun sonucunda ortaya çıkan epifizer

plağın kalınlığı dengeli bir şekilde hem hücrelerin yıkımlanması hem de hücrelerin çoğalması ile olmaktadır (72).

2.1.3.3. Kemik İyileşmesi

Kemik; iskelet sistemi içerisinde yapılanmış, biyolojik olarak aktif, dinamik ve metabolik olarak hücrelerden oluşmuş bir yapıdır. Bu doku travma, enfeksiyon, patolojik veya tümoral durumlar ya da metabolik hastalıklar ile anatomik yapı bütünlüğü bozulduğunda kırık ve defekt alanları oluşur. Kemik doku meydana gelen kırık ve defektlerin iyileştirilmesi için çeşitli biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal mekanizmalardan etkilenir. Kemik iyileşmesi, sebep olan travmayı takiben hücresel, hümoral ve vasküler olayların sonucunda, hücreye yapı ve fonksiyon kazandıran bir doku yanıtı biçimidir. (73, 74).

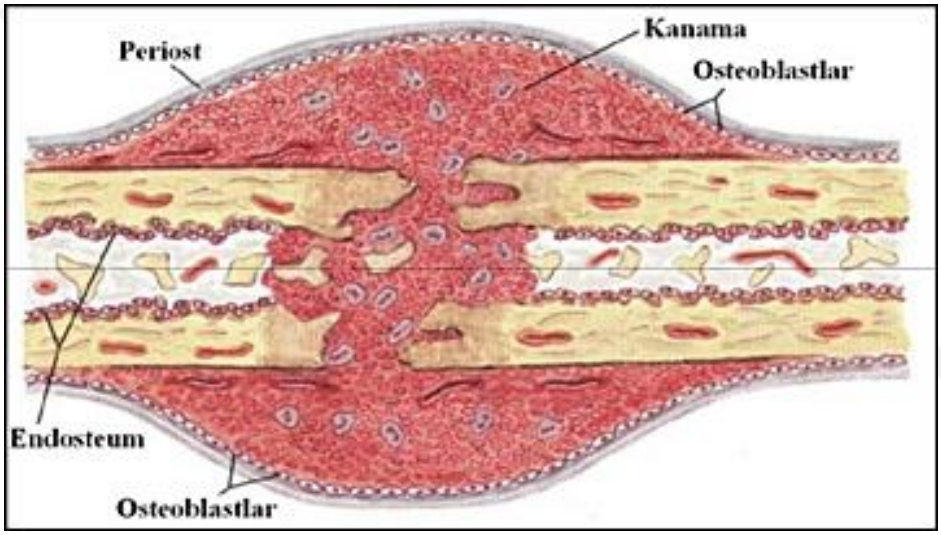
Kemik dokuda meydana gelen kırık ve defekt olguları sonrasında iyileşme, diğer dokulardan farklı özelliklerde gerçekleşir (75, 76). Esas olarak kemik iyileşmesinde bağ doku iyileşmesi olmaktadır. Yumuşak dokudaki iyileşme sürecine benzer olarak kemik dokudaki kırık ve defektlerin onarımında enflamasyon, fibroplazi ve remodeling safhaları gözlenir. Ancak yumuşak dokudan farklı olarak kemik dokuda remodeling ve onarım aşamalarında osteoblastlar ve osteoklastlar aktif rol oynamaktadır (77, 78).

Kemik iyileşmesi, primer iyileşme denilen birincil iyileşme ve sekonder iyileşme denilen ikincil iyileşme olarak iki alt başlıkta incelenmektedir. Primer iyileşme anatomik ve rijit bir fiksasyon sonrası görünen bir kallus olmaksızın intramembranöz kemikleşme ile olan iyileşme şeklidir. Sekonder iyileşme ise üç temel safhadan (Enflamasyon, Reperatif ve Remodeling safhası) oluşarak, kallus dokusuyla kıkırdak doku üzerinden kemikleşme ile gerçekleşir (76).

2.1.3.3.1. Enflamasyon Safhası

Kemik dokuda meydana gelen hasardan hemen sonra başlayan ve birkaç gün devam eden yangı safhasıdır (79, 80). Travma, patolojik oluşumlar, metabolik durumlar sonucu meydana gelen hasar sonucu periost, çevresel kaslar ve kan damarları zarar görür. Bunun sonucu olarak kan, lenf ve doku sıvılarıyla birlikte bölgede hematom oluşturur (Şekil 2.9). Hematom, hücresel faaliyetlerin başlamasını sağlayan interlökin

ve sitokinler gibi faktörler içermesiyle kemik iyileşmesinin erken dönemlerinde kritik bir öneme sahiptir. Fibroblastlar, endotelyal hücreler ve osteoblastlar, bu sitokinlerin salınımlarının devam etmesi ile defekt alanında köprüleme oluşturma faaliyetlerini başlatır (81). Bu faaliyetlerin başlaması ile trombositler de mezenkimal hücrelerin bölgeye göçünü sağlayarak, hücrelerin bölünerek çoğalması ve farklılaşmasında kilit rol üstlenen transform büyüme faktörü beta (TGF-β) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) salınımının gerçekleşmesine katkı sağlar. Makrofaj, monosit, lenfosit ve polimorfonükleer hücreler gibi yangı hücreleri ve fibroblastlar, prostaglandinlerin etkisi ile kemik dokuya doğru göç ederler. Bu süreçlerin sonucunda defekt bölgesinde granülasyon doku oluşumu, mezenkimal hücre ve vasküler doku göçü gerçekleşir (82).

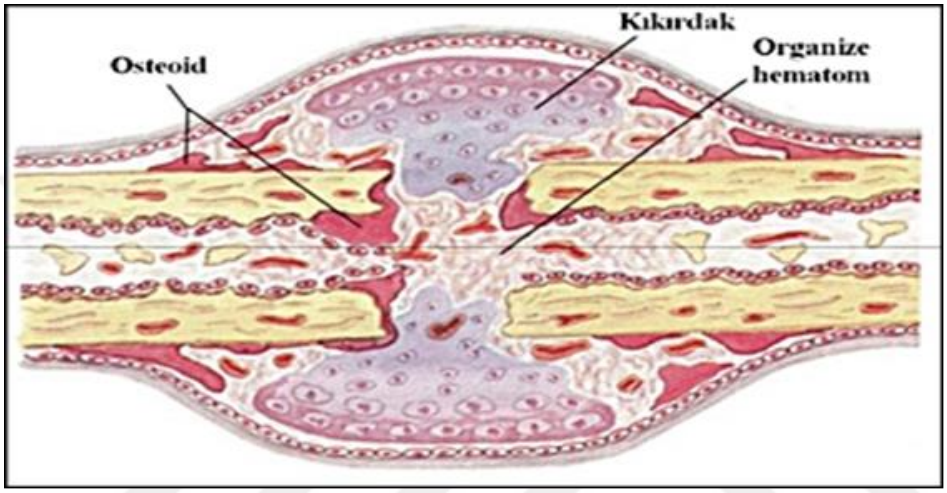


Şekil 2.9. Kırık iyileşmesinde enflamasyon safhası. Travmaya bağlı hematom oluşması, kırık hattındaki kemik dokunun yıkımlanması, yangı hücreleri (lökositler, makrofajlar, mast hücreleri) ve fibroblastlar hematomu infiltre ederek ve yıkımlanmış kemik dokuyu bölgeden uzaklaştırması (58).

2.1.3.3.2. Reperatif (Onarım) Safhası

Onarım (reperatif) safhası, enflamasyon safhasının sonunda oluşan artık maddelerin lökositler tarafından ortadan kaldırılması sonucu başlar. Bu safhada TGF-β (Transform Büyüme Faktörü Beta), makrofajlar tarafından salgılanarak fibroblastların defekt ve kırık bölgesine göç etmesini sağlar. Fibrinlerin fibroblastlara dönüşümü ve osteojenik hücrelerin farklılaşması sonucu granülasyon dokusu meydana gelir. Ayrıca bu safhada kollajen, glikozaminoglikan, mukoproteinler ve proteoglikanlar, fibroblastlardan ve mezenkimal hücrelerden sentezlenir (83).

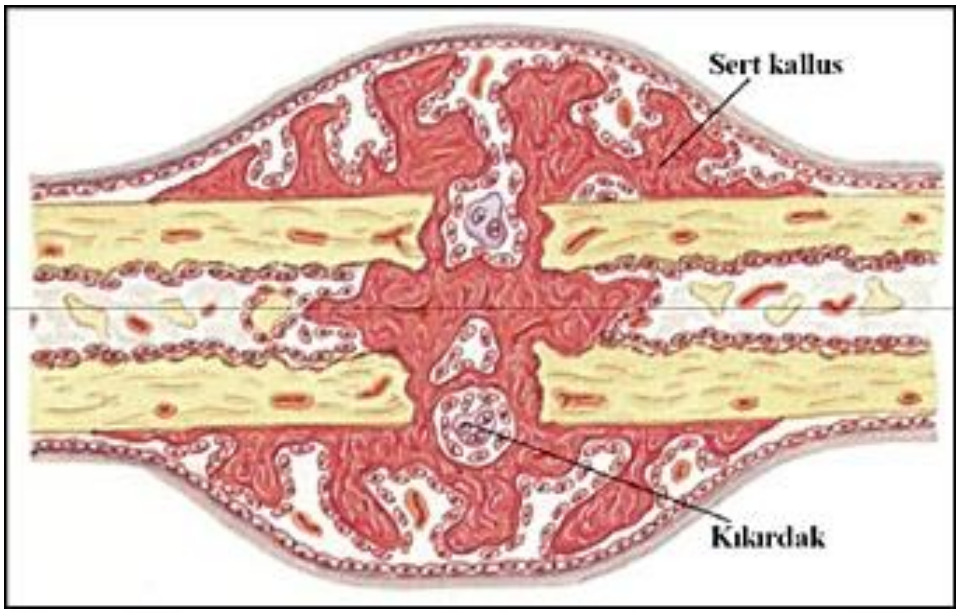
Kırık ve defekt bölgesindeki damarlaşma 2-3 günde oluşmaya başlayıp 7 günde kendini belli eder. Damarlaşmanın gelişimi yavaş olduğu için kemik dokuya yakın hüclerin beslenmesi iyi olduğundan osteoblastlar hızla oluşur ancak uzak yerlerdeki hücreler farklılaşarak kondroblastlara dönüşüp kıkırdak dokuyu oluştururlar (Şekil 2.10). Trabeküller, damarlaşmanın iyi olduğu alanlarda osteblastlar tarafından oluşturulur. Fibröz ve kıkırdak doku ilk 7-12 günde yumuşak kallusu meydana getirir (49).



Şekil 2.10. Kırık iyileşmesinde onarım safhasında gerçekleşen yumuşak kallus oluşumu. Damarlaşmanın şekillenmesi ile osteoprogenitör hücreler, preosteositler ve periost kaynaklı osteoblastlar ile endosteum gelişir. Yumuşak kallusu osteoid, kıkırdak ve kollajen karışımı oluşturur (58).

Osteoblastlar, tropokollajenleri oluşturur ve bunların hücre içine hareket ederek ile kollajen lifler meydana gelmesiyle osteoidin mineralizasyonu gerçekleşir. Damarlaşmanın artması ve osteoidinin mineralize olarak kalsifiye olması kallus doku oluşumu için gereklidir. Kırık ve defekt hattında kemik doku birikmesiyle fusiform (iğsi) yapıda bir kallus gözlenir (84).

Kıkırdak dokunun kondrositleri dönüşmesi ile ortaya alkalen fosfataz enzimi çıkar ve kıkırdak matriks kalsifiye olur. Kalsifiye olmuş doku içindeki kondrositler, beslenemediği için ölmesiyle yerleştiği alanlarda lakünalar meydana gelir. Lakünalar içerisine kan damarı ve kemik doku hücreleri yerleşir (89).



Şekil 2.11. Kırık iyileşmesinde onarım safhasında gerçekleşen sert kallus oluşumu. Oluşan yumuşak kallusun mineralize olması ile sert kallus oluşumu (58).

Kallus oluşumu, yaşlılarda gençlere göre yavaş olmakla birlikte kemik iyileşmesinin halen son safhası değildir, oluşan kallusun artık kısımlarının rezorpsiyonu ve trabeküller kemiğin stres hattı boyunca ilerlemesi ile remodelizasyon evresi başlar (Şekil 2.11) (81, 83).

2.1.3.3.3. Remodeling (Yeniden Şekillenme) Safhası

Kemik doku büyümesini tamamlayıp hayvan yetişkin yaşa gelse bile, kemik dokudaki yenilenme ömür boyu devam etmektedir. Kemik doku yeniden şekillenmeyi devamlı hale getirmeyi, biyomekanik ve metabolik reaksiyonlarla eski lamellar kemiğin yapısında çok az veya hiçbir değişiklik yapmadan yeni kemik dokunun yerine geçerek sağlar (61).

Remodeling, ağsı kemiğin ya da yaşla birlikte direnci ve dayanıklılığı azalan kemik dokunun önce rezorbe edilerek daha sonrada lamellar yapıda yeni kemik doku oluşumunun sağlandığı bir süreç olarak da ifade edilebilir. Kemik dokunun yeniden şekillenmesi, iskelet yapının mineral deposu gibi elektrolit dengeyi sağlamak amacıyla, ihtiyaç halinde kemik dokuya kalsiyum ve diğer iyonların giriş ve çıkışının düzenlenmesine imkan sağlar. Bu sayede yaşam boyu kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi ile küçük kırık ve defektlerin onarımında aktif rol oynamaktadır (41, 86).

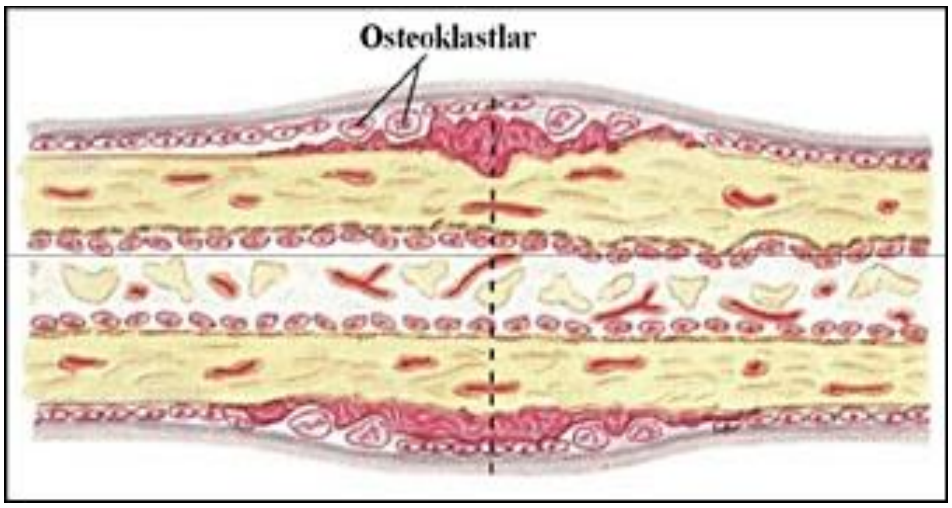
Kemik dokunun remodelasyon sürecini kapsayan kortikal ve spongiyoz kemikler gözlenen aktivasyon, rezorbsiyon, geri dönüşüm ve yapılanma gibi birbirinden farklı dört aşaması vardır (61).

Aktivasyon aşaması, inaktif veya hareketsiz kemik yüzeyinin yeniden şekillendirilecek yüzeye dönüştürüldüğü süreçtir. Bu aşamada kemik matriksinin açığa çıktığı ve osteoklastların bölgeye göç ettiği gözlenir (84, 87).

Rezorbsiyon aşamasında, osteoklastlar trabeküller kemiğin merkezinde yaklaşık 50 μm derinliğinde ve küçük tabak şeklinde bir defekt oluşturana kadar kemiği dokuyu rezorbe eder. Kortikal kemikte ise yaklaşık 2.5 mm uzunluğunda ve 200 μm çapında bir tünel oluşturmak için kemik dokuyu delerler. Bu aşamadan sonra, osteoklastlar kemik rezorbsiyon aktivitesini sonlandırırak bölgeden ayrılırlar (61).

Geri dönüşüm aşaması ise rezorbe edilen kemik dokunun yeniden şekillenmeye başladığını göstermektedir. Osteoblastlar, osteeoklastların oluşturduğu Howship lakünası olarak adlandırılan rezorbsiyon çukurlarının en iç kısımlarına kadar göç ederler (88, 89).

Yapılanma aşaması, osteoblastların osteoidleri kemikteki ilgili bölgeye bırakması ile kemik matriksinin mineralize olmasıyla başlar. Bu aşamanın ilk zamanları kemikte bulunanan toplam kalsiyumun %75'i depolanır ve kalan %25'i ise 1-2 ay içerisinde mineralizasyonun tamamlanması için kullanılır. Kısaca kemik dokunun yeniden yapılanmasında vücut hareketlerinin oluşturduğu kas kasılmalarından kaynaklanan gerilme ve çekme kuvvetleri, kalsiyum homeostazını sağlayan hormonlar ve büyüme faktörleri etkilidir (Şekil 2.12) (36, 90).



Şekil 2.12. Kırık iyileşmesinde yeniden şekillenme safhası. Sert kallus, osteoklastik ve osteoblastik aktivite sonucu lamellar kemiğe dönüşüp, normal kemik doku oluşturur (58).

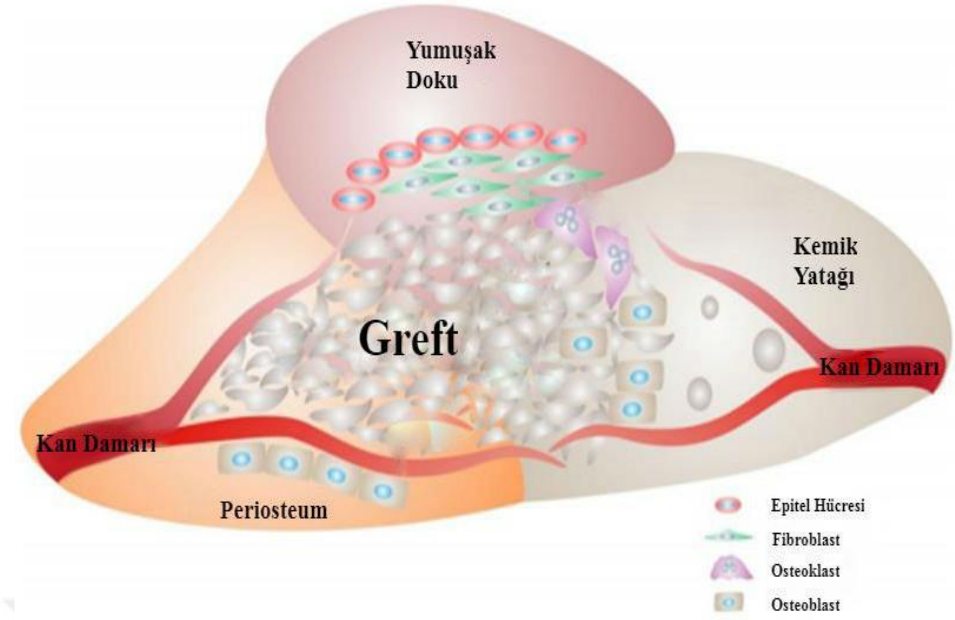
2.2. Transplantasyon

Canlı organizmanın hastalanması veya yaralanması sonucu ortaya çıkan hasarları onarabilme kabiliyeti vardır. Ancak zarar görmesi sonucu görevini yerine getiremeyecek duruma gelen dokuları ve organları yenileme çalışmaları bilim insanları için sürekli araştırma konusu olmuştur. Bu araştırmalarda organ naklide gerçekleştirildiği gibi, yapay maddeler ve cihazlar kullanılması uygun görülmüştür. Doku, organ veya biyomateryalin donörü tarafından verilen sağlıklı bölgesinin ya da bütününün alıcının hastalıklı veya işlevini yerine getiremeyen bölgeye yerleştirmek bir diğer deyişle bir vücuttan diğerine nakledilmesine transplantasyon denir (91, 92).

2.2.1. Kemik Greftleriyle Osteosentez

Transplantasyonda kan ilk sırada, kemik ikinci sırada gelmektedir (93). Tarihte 1668 yılında kemik grefti ile ilk osteosentez, Hollandalı bir cerrah olan Jop Van Meekeren tarafından savaş sırasında bir askerin kafatasındaki travmatik defektin bir köpeğin kafatasından alınan kemikle iyileştirilmesi ile yapılmıştır. Daha sonra klinik şartlarda ilk uygulama, Almanya'da 1820 yılında Philips Von Walter tarafından trepanasyon sırasında meydana gelen defektin otogreft ile iyileştirilmesi olmuştur. Tarihte ilk allogreft uygulaması ise 1880'de İskoçyalı William Macewen tarafından 4 yaşındaki bir erkek çocuğun humerusunda meydana gelen osteomyelitis olgusunu başka bir çocuğun tibiasından aldığı kemik doku ile iyileştirilmesi ile gerçekleşmiştir (94-96).

Kemik greftleri, travmaya bağlı meydana gelen kemik kırıkları, kistlerin meydana getirdiği defektlerin onarılması, kemikteki maddi kayıpların telafi edilmesi, doğuştan ortaya çıkan deformitelerin ve kemikteki tümör gibi patolojik olguların meydana getirdiği geniş defektlerin sağaltımında, kemik iyileşmesini hızlandırmak için kullanılan materyallerdir. Kemik greftlerinin temel görevi kemiğin kendini rejenere etmesini ve yeniden modellemesini sağlamaktır (Şekil 2.13) (98, 99).



Şekil 2.13. Kemik greftinin çevre dokularla ilişkisini gösteren şema (115).

Kemik defektlerinin kapatılmasında kullanılan kemik greftlerinde bulunması gereken özellikler;

- Dokularla tamamen uyumlu ve hareketsiz olmalıdır.
- Antijenik, karsinojenik ve toksik özellikte olmamalıdır.
- Kemik iyileşmesi sırasında revaskülarizasyon, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenezisi kolaylaştırmalıdır.
- Kolayca şekil verilebilmeli ve kemikteki defektte stabilite ve destek sağlamalıdır.
- Radyolusent bir görünüm vermeli ve uzun süre saklanabilmelildir (100, 101).
- Kolaylıkla steril edilebilmelidir (93, 102).

Kemik defektinin geniş olduğu durumlarda, kemiğin remodelizasyon safhasının yeterli gelmediği kırıklarda ve otojen kemik greftlerinin bir takım dezavantajı sonucu, kemik grefti veya kemik yerine geçecek materyaller ile ilgili bilimsel çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda cerrahi işlemlerde üstün özellikleri sayesinde geniş kullanım alanı bulan ve alternatif olarak geliştirilen, heterojen ve allojen kaynaklı değişik greft türleri ve alloplastik materyaller, bir çok deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılarak ve bir kısmı kemik defektlerinin ve kırıkların sağaltımı için kullanıma sunulmuştur (103, 104).

Kemik greftlerinin onarım süreci 3 şekilde olmaktadır. En önemli olan, ilki osteogenezisdir. Osteogenezis kemik hücrelerini içeren ve kemik hücrelerinin kemik doku yapımını oluşturduğu kısımdır. İkincisi osteoindüksiyondur. Bu kısımda ise mezenkim hücreleri osteoblastik hücrelere dönüşerek kemik dokuyu oluşturur. Üçüncü ise osteokondüksiyondur. Osteokondüksiyon kısmında kemik grefti yerleştirildiği bölgedeki kemik hücrelerine katılarak kemik dokunun büyümesini sağlar (105).

2.2.1.1.Osteogenesiz (Osteojenik Greftler)

Osteogenesiz, greft materyali içerisinde yaşayan osteoblast ve osteklast gibi hücrelerin nakil edildiği alanda yeni kemik formasyonu oluşturmasıdır (114). Kansellöz yapıdaki otogreftlerde osteogenesiz formasyonu kortikal otogreftlerden daha hızlı gerçekleşir. Çünkü kansellöz yapıdaki otogreftler; aktif geniş alanları içeren osteoblastlarca zengin ve transplantasyonu yapılmış greft materyalindeki hücrelerin hızlı şekilde çoğalmasını ve yaşamasını sağlayan revaskülarizasyon işlemini hızlı gerçekleştirmektedirler (109, 110).

Osteogenesiz, transplantasyonu takiben 5-6 gün sonra başlayarak 8 hafta boyunca devam eder (109). Otojen ve allojen greft materyalleri bir yıl gibi bir süreçte alıcının kemik dokusuyla bir bütün haline gelir (110). Kemik dokunun yeniden şekillenmesi için gerekli olan osteoprogentör hücreler, ortamda yeterli miktarda olduktan sonra osteoblastlara dönüşerek kemik yapımının sağlamaktadır. Osteoprogenitör hücreler, yaşam boyu çoğalabilme özelliğindedir. Kök hücre klonları oluşturma ve farklı hücrelere dönüşüp gelişerek kemik, ligament, tendon ve yağ dokusu gibi bağ doku hücrelerini meydana getirebilir (111, 112).

Taşıyıcı matriksler, yeni kemik formasyonun başlatmak için revaskülarizasyon ile osteoprogenitör hücrelerin migrasyonunu hızlandırır. Görevleri bittikten sonra hızlıca rezorbe olmaktadır (113). Bu taşıyıcı hücre matrikslerinin osteprogenitör hücrelerin osteoblastlara dönüşmesinde katkı sağladığı ayrıca hücrelerin yaşaması ve çoğalması için destek görevi gösterdiği bilinmektedir. Allogreftler, bu taşıyıcı hücre matriksleri en çok içeren greft materyalleridir. Ancak yetersiz immunite, enfeksiyon riski gibi nedenlerle alternatif olarak alloplastik greftler ve biyomateryaller ortaya çıkmıştır (114).

2.2.1.2. Osteoindüksiyon

Genç osteoblastların osteoindüktörlerin etkisi ile olgun osteoblastlara dönüşerek kemik doku oluşumunu devam ettirmesine osteoindüksiyon denilmektedir. Osteoindüksiyon, kemik doku oluşumunun erken dönemlerinde komplike bir yapıya sahiptir (115). Osteoindüksiyonda bu komplike sistem, büyüme faktörlerin spesifik etkisi ile PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü) ve FGF (fibroblast büyüme faktörü) fibroblastlarının ve osteoblastların oluşumunu stimüle ederek çözüme kavuşmaktadır. Kemik morfogenetik protein (BMP), osteoindüksiyonun ilerleyen safhalarında mezenkimal hücre farklılışması ve vasküler proliferasyonun oluşumunda görevlidir. Transform büyüme faktörü (TGF- β), vaskülarizasyon, hücre çoğalması ve matriks birikiminde etkili iken mezenkimal farklılaşmada etkisizdir (116).

2.2.1.3. Osteokondüksiyon

Osteokondüksiyon, yeniden şekillenecek kemik dokusu için vaskülarizasyon ve osteoprogenitör hücrelerin defekt bölgesine doğru göç etmesi için üç boyutlu iskelet çatıyı oluşturmaktadır. Kemik dokudaki defektin kenar yapılarında bulunan osteoblastlar, bu iskelet çatıyı kullanarak kemik oluşumunu başlatır. Osteokondüktif greftler, kemik oluşumunu aktive etmezler sadece bu süreçte yeni kemik doku oluşumuna katkı sağlayacak iskelet çatıyı oluştururlar (117, 118). Bu özellikteki greft materyallerinden bazıları kemik oluşumu başlayınca rezorbe olarak defekt bölgesinden ayrılırken bazıları ise rezrobe olmadan defekt bölgesinde kalmaya devem ederler (119). Sentetik kemik greftlerinden sadece hidroksiapatitler (HA) osteokondüktif etki göstererek kemik dokunun yeniden şekillenmesine katkı sağlarlar (46).

2.3. Greft Tipleri

Kemik greftleri yapılarına göre kortikal, kansellöz, kortiko-kansellöz olarak sınıflandırılırlar (106). Kemik greftleri uygulanan materyalin immünolojik kökenine göre otojen ve homojen kemik greftleri, ksenogreftler, alloplastik greftler ve kompozit greftler olarak sınıflandırılırlar (97, 107).

2.3.1. Otojen Kemik Greftleri

Otojen kemik greftleri, donör ve alıcının aynı hayvan olduğu greftlerdir (107). Kemik greftlerinin onarım süreçlerinden osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyonu içermektedir (120). Otojen kemik greftleri kemik greftleri içerisinde osteojenik hücreleri içeren tek greft olduğu için maddi kayıplı kemik kırıklarında ve kırıkların sağaltımında en etkili greft olarak tanımlanmıştır (121, 122).

Otojen kemik greftlerinin elde edildiği bölgeler kranium, tibia, fibula, ilium, humerus, kostalar, radius, scapula, krista iliaka, simfizis mandibula bölgesi, ramus mandibula, üst çene molar diş bölgesi, alt çene molar diş bölgesi, zigomatik ark ve ekzositozlar olarak sıralanmaktadır. Otojen kemik greftine miktar olarak fazla ihtiyaç olduğu zaman, humerus, tibianın proksimal metafizi, krista iliaka ve kostalar öncelikli tercih edilmektedir (122, 123).

Otojen kemik greftlerinin avantajları; erken damarlaşma sağlama, düşük maliyet, uygulandığı bölgede alerjik reaksiyon oluşturmama, kemik onarım süreçlerinden üçünü birden içermesi ve hızlı osteojenik özellikleridir. Dezavantajları ise verici olarak kullanılan hayvanın tekrar operasyona alınması, operasyon sonrası şiddetli ağrı görülmesi, hayvanın anesteziye alınma zorunluluğu, greftin alındığı bölgede gelişebilecek komplikasyonlar ve enfeksiyon riski olarak sıralanabilmektedir (124, 125).

2.3.2. Homojen Kemik Greftleri (Homogreft)

Aynı türden hayvanlar arasında genetik benzerliğin olduğu ya da olmadığı durumlarda kullanılan greftlere homojen kemik greftleri denilmektedir. izogreft veya allogreft olarak iki alt başlıkta incelenmektedir (16).

2.3.2.1. İzogreft

İzogreftler veya singenosioplastik greft, alıcı ve verici hayvanlar arasında kan bağı olduğu durumlarda nakil için alınan greftlerdir (107, 126).

2.3.2.2. Allogreft

Allogreftler, donörün ve alıcının aynı türden olduğu ancak genetik olarak hiçbir benzerliklerinin olmadığı canlı hayvanlardan veya kadavralardan elde edilerek nakil edilen greftlerdir. Otogreftlerden sonra en sık tercih edilen greft çeşididir (127).

Allogreftler kalça kırığı meydana gelmiş insanlardan çıkarılan kemiklerin birtakım işlemlerden geçirilerek kemik bankalarında saklanmasıyla da elde edilmektedir (128). Doğmasal travmatik olgularda, dejeneratif ve tümoral kökenli kemik defektlerinin sağaltımında ve artroplasti operasyonlarında mekanik destek amacıyla sıkça kullanılmaktadır (67, 129).

Allogreftler osteojenik özellikleri yoktur ancak osteoindüksiyon özelliğe sahiptirlar. Kemik grefti olarak kullanıldığında kemik formuna dönüşmesi uzun zaman almaktadır (127, 128).

Allogreftlerin de diğer kemik greftleri gibi avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu greftlerin avantajları; hazır olarak kemik bankalarından temin edilebilir, hasta hayvan donör olarak kullanılmadığı için buna bağlı anestezi ihtiyacı azalır, komplikasyonlar ve kan kaybı riski daha az görülür (107, 125, 130). Allogreftlerin dezavantajları ise yabancı canlıdan alınan grefte karşı vücutta immun yanıt oluşabilmektedir. Donör olarak kullanılan hayvandan alınan greftler aracılığıyla diğer hayvana çeşitli bulaşıcı hastalıklar geçebilmektedir (119). İmmun yanıt oluştuğu zaman ana kemikle birleşip kemik formunu alması uzamaktadır, bu durumda iyileşmeyi geciktirmektedir (107). Allogreftlerde donör ile alıcı arasındaki doku uyuşmazlığını ortadan kaldırmak için çeşitli işlemler yapılmaktadır (131, 132). Bu işlemler 4 ana başlıkta sınıflandırılmaktadır (97).

2.3.2.2.1. Dondurulmuş Kemik

Bu tarz allogreftler, ortopedik tedavide osteokondral yapıyı desteklemesi için kullanılırlar (107). Dondurma işlemi, -80 ^{0}C'de steril şartlarda yapılmaktadır. Bu sayede kemik grefti uzun süre saklanabilmektedir. Kontrollü yapılan dondurma işleminde dokunun enzim sisteminde hasar meydana gelmediği bildirilmektedir (126). Genellikle kemik onarıma katılırlar ancak kraniyofasiyal iskelette etkinliğinin sınırlı olduğu bildirilmiştir (125).

2.3.2.2.2. Dondurulmuş Kurutulmuş (Liyofilize) Kemik (FDBA)

Dondurulmuş kurutulmuş kemik greftleri önce çok düşük derecelerde soğutularak sonra yavaş yavaş ısıtılıp kemik dokunun dehidrate olmasıyla elde edilen materyallerdir (133). Bu greftler, kemik dokudaki alveolar defektlerin ve kronik fistüllerin sağaltımında osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon aktivasyonu sağlayarak başarı ile kullanılmaktadır (107, 134).

2.3.2.2.3. Demineralize Dondurulmuş- Kurutulmuş Kemik (DFDBA)

Bu greft yüksek konsantrasyondaki hidroklorid asit içeren banyo kaplarından geçirilirilip kemik dokunun mineral matriksini uzaklaştırarak elde edilmektedir (97). Ancak bu greftlerin sağaltım amacıyla kullanılmalarına ilişkin tartışmalar devam etmektedir (107).

2.3.2.2.4. Solventlerle Dehidrate Edilmiş Kemik

Günümüzde kullanılan kemik greftlerine alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Donör olarak seçilmiş kadavralardan kemik elde edilerek Sodyum hidroksit (NaOH), Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve aseton gibi solventlerle ve ilave güçlü alkalilerle dehidrate edilir. Bu yöntemle virüsler yok edilmektedir. Bu greftlerin sterilizasyonu gama ışınları ile yapılmaktadır. Greftlerin iyileşmesi osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon ile yapılmaktadır. Klinik uygulama kolaylığı, partikül migrasyonu, doku reddi ve enfeksiyon gibi komplikasyonların olmaması nedeniyle olumlu sonuçlar vermektedir. Yapılan çalışmalarda yeterli kemik iyileşmesi sağladığı vurgulanmaktadır (97).

2.3.3. Heterojen Kemik Greftleri (Ksenogreftler)

Ksenogreftler farklı tür donör ve alıcı arasında doku nakledilmesi olarak ifade edilmektedir. Ksenogreftlere sığırdan insana doku transplantasyonu örneği verilebilir (135, 136).

Heterojenik kemik greftleri sığır, fare, domuz, at gibi memeli hayvanlardan ve mercan dış iskeletinden elde edilebilmektedir. Memeli hayvanlardan en çok bu amaçla sığır kemikleri kullanılmaktadır (129, 137-139). Bu amaçla sığır kemiği çeşitli organik

çözücüler içerisine koyulmaktadır ve tüm organik bileşenleri yok edilerek, deproteinize edilmektedir. Geriye kalan inorganik bileşenler ve poröz hidroksiapatit partikülleri yapı itibariyle insan kansellöz kemiğine benzediğinden dolayı tercih sebebi olmaktadır (147). Sığır kemiğindeki organik bileşenlerin yok edilmesiyle BSE hastalığı riskide ortadan kalkmaktadır (107).

Mercanlardan elde edilen kalsiyum karbonat, pörözitesi %50'ye yakın olduğu ve yüzeyin karbonat fazına dönüşmesine gerek olmadığı için diğer kemik greftlerine göre daha hızlı olarak kemik formasyonunu başlatır (138, 141).

Ksenojen greftlerin granül şeklindeki formları kemik defektleri ve kist operasyonları sonrası bölgede meydana gelen defektlerin sağaltımında kullanılmaktadır (129, 142).

2.3.3.1. Demineralize Edilmiş Kemik

Kemikte demineralizasyon işlemi ile minerallerin ortadan kaldırılarak kemikteki nonkollegen proteinlerin ortaya çıkarılmasıyla elde edilmektedir. Kist operasyonları sonrası ve kemikteki üç duvarlı defektlerin tedavisinde kullanılmaktadır (107).

2.3.3.2. Proteini Çıkarılmış Kemik

Kemiğin organik kısmı çıkarılarak doymamış kalsiyum apatit kristallerinden oluşan inorganik, proteinsiz materyallerdir (107).

2.3.4. Kompozit Greftler

Kompozit greftler, otojen kemik greftleriyle, allogreft veya alloplast greftlerin birleştirilmesiyle, farklı greft kombinasyonlarından oluşan greft materyalleridir. Yapılan çalışmalarda kompozit greftlerin kemik doku üzerinde iyileştirici etkisi olduğu görülmüştür. Bu çalışmalar doğrultusunda birden fazla farklı greft materyalinin birleştirilerek sağaltımda kullanılabileceği görüşü ortaya çıkmıştır. Özellikle hidroksiapatit (HA) ve otojenöz kemik dokuyla kombinasyonu son yıllarda cerrahi işlemlerde tercih edilmektedir (143, 144).

2.3.5. Alloplastik (Sentetik, Biyomateryaller) Greftler

Alloplastik greftler yapay yollardan elde edilen sentetik yapıdaki greft materyalleridir. Bu greftler kemik dokunun inorganik yapısına benzemektedir ve osteoindüktif özellikleri bulunmamaktadır. Alloplastik greftler özellikle kemiklerdeki büyük defektlerin kapatılmasında yapısal destek görevi görmektedir (135). Ayrıca travmatik, doğmasal ve gelişimsel defektlerin sağaltımında başarıyla kullanılan çeşitleri bulunmaktadır (107). Alloplastik greftlerin avantajları; sentetik yapıda olduğu için hayvanlarda hastalık oluşturma riskleri olmaması, operasyon süresinin kısa olması, donör ihtiyacın olmaması ve sentetik yapıda olduğu için ihtiyaç duyulduğu kadar elde edilebilmesi şeklinde sıralanabilir. Ancak nadir durumlarda canlı organizmada allerjik ve doku reddi gibi dezavantajı vardır (8, 129).

Alloplastik greftler seramik, metalik ve polimer kökenli olarak üç sınıfa ayrılabilirler (97). Bu sınıflar içerisinden kemiğin inorganik yapısına en çok benzeyen sınıf seramiklerdir. Seramikler bu özelliğinden dolayı daha çok tercih edilmektedir. Seramik yapılı alloplastik greftlerden kalsiyum fosfat seramikleri üzerinde birçok araştırma yapılmaktadır (135). Kalsiyum fosfat seramikler içerisinden trikalsiyum fosfat (TCP) ve hidroksiapatit (HA) üzerinde araştırmalar eski tarihlere dayanmaktadır (67, 97). Alloplastik greftin bir çeşidi olan metaller ise canlı organizmaya ve kemik dokuya uyumlu greftlerdir ancak anatomik ihtiyaca göre üretilmiş çeşitlerinin bulunma güçlüğü kullanım alanını kısıtlamaktadır. Polimerler ise son yıllarda gözenekli formlarının üretilmesiyle kemik defektlerinin kapaltılmasında kullanım alanı bulmaktadır (107).

2.3.5.1. Polimerler

Polimerler, yapıları itibari ile partikül, jel, kök ve enjekte formlarında bulunabilen greft materyalleridir. Bu formlara poliglikolik asit, polilaktik asit, silikon, polietilen, poliüretan, polimetilmetakrilat ve proplast örnek verilebilir. Poliglikolik asit ve polilaktik asit gibi rezorbe olan, polimetilmetakrilat gibi de rezorbe olmayan türleri mevcuttur. Rezorbe olabilen türleri sütur ve fiksasyon matertallerinin üretiminde kullanılmaktadır (145, 146). Rezorbe olabilen polimerler greft olarak kullanıldığında molekül ağırlığı yüksek olduğu durumlarda yıkımlanması 3 yıl sürerken, düşük molekül ağırlığında kullanıldığında bu süre 4-5 aya kadar düşmektedir. Ayrıca yıkımlanma

süresini, hastanın yaşı, metabolizması ve defektin bulunduğu konum ile büyüklüğü etkilemektedir (145).

2.3.5.2. Metaller

Metalik biyomateryallerin kemik üzerine binen kuvvet mekanizmasına karşı direnci oldukça yüksektir. Metallerin, ağır yapılı olması, korozyona uğrayabilmeleri ve biyouyumluluğunun düşük olması dezavantajları arasında sayılabilir (148, 149). Günümüzde ilk kullanıma başlanılan biyomateryal paslanmaz çelik olup, ortopedik cerrahide plaklarda, vidalarda, kalça çivilerinde daha düşük maliyeti, daha kolay işlenmesi ve daha kolay temin edilebilmesi nedeniyle kullanılmaktadır (149). Kobalt-krom alaşımları içeren biyomateryellar çok iyi korozyon ve aşınma direncine sahiptir ancak yüksek elastikiyet yapılı oldukları için kullanım sonrası stres kırıklarına bağlı kemik kayıpları ortaya çıkabilmektedir (148, 149). Titanyum ve alaşımları en iyi biyomateryaller olarak ifade edilmektedir. Avantajları; çok iyi biyomekanik özellikte olması, toksikasyon ve alerjik reaksiyon oluşturmaması, doku içinde renk değiştirmemesi ve küçük boyutlarda rahatlıkla üretilebilmesidir. Dezavantajları ise pahalı bir materyal olması, üretimlerini zor olması ve özellikle sürtünme direncine karşı düşük yapılı olduğu için artroplasti ortopedisinde kullanım alanını kısıtlaması olarak sıralanabilir (150).

2.3.5.3. Seramikler

Kalsiyum sülfat (paris alçısı), alüminyum, zirkonyum, biyoaktif cam ve cam seramikler, kalsiyum fosfat bileşikleri (Hidroksiapatit (HA) ve Trikalsiyum fosfat (TCF) vb) seramik greftler grubu içerisinde yer almaktadır. Seramikler, enjekte edilebilir, hızlı ve yavaş rezorbe olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır (90, 151-153).

Osteokondüktif özellikte olan seramiklerin diğer sentetik greftler gibi yangılanma aktivitesi, yapısal içerikleri, boyut ve yüzey özellikleriyle alakalı birçok klinik ve klinik öncesi çalışma yapılmıştır (154). Örnek olarak Hidroksiapatit (HA), Trikalsiyum fosfat (TCF) ve kalsiyum sülfatın in vivo olarak yapılan testlerde biyouyumlu, osteokondüktif olduğu ve alerjik bir reaksiyon oluşturmadığını gözlenmektedir (155). Kemik dokuda meydana gelen defekt ve kırık olgularında

seramikler kullanıldığı zaman, seramik ile kemik arasında birbirleri içerisine göç eden bir mekanizması olduğu bilinmektedir. Bu mekanizma sırasında kemik doku seramik içine porlar şeklinden mikro defektler oluşturarak ilerler. Bu ilerleme seramikleri zayıflatır gibi düşündürse de aksine osteokondüktif yüzey miktarını arttırdığı için kemik ve seramik arasındaki bağlanma kuvvetini güçlendirerek iyileşmeyi hızlandırmaktadır (156).

Sentetik seramik kemik greftleri, biyouyumluluk ve fizikokimyasal mekanizma ile kemiğe bağlanıp mekanik dayanıklılık sağlamaları açısından allograftlere ve otogreftlere karşı güçlüdür (157, 158). Seramik kemik greftlerinin avantajları; yüksek derecede saflık, istenildiği kadar elde edilebilmesi, konakçı kemik doku ile güçlü temas oluşturma kapasitesi, nonallerjik ve kemik dokunun yeniden şekillenmesinde çatı iskeleti oluşturmasıdır. Dezavantajı ise defekt veya kırıkta uygulandığı miktarı doğru ayarlanmadığı zaman mekanik desteği zayıf olmaktadır (158).

Sentetik seramikler yaygınca omurga artrodezinde, kemik kisti tedavisi sonrası oluşan defektlerin kapatılmasında, tibia-fibula osteotomilerinde ve periodontal kemik defektlerinin sağaltımında kullanılmaktadır (159, 160).

2.3.5.3.1. Kalsiyum Sülfat (Paris Alçısı)

Kalsiyum sülfat alloplastik greft materyali olarak kullanılan ilk seramiktir. 17. yüzyılda bandaja sertlik kazandırmak amacıyla harici olarak kullanılmaya başlanmış olup daha sonra ilk kez 1892 yılında Dreesmann tarafından kemik grefti olarak kullanılmıştır (107, 161). Kalsiyum sülfat yapay olarak üretilen ve kemik içermeyen bir materyaldir ve 100 yılı aşkın süredir ortopedi operasyonlarında ve doku rejenerasyonunda destek görevi görmesi amacıyla güvenle kullanılmaktadır (162, 163). Doğada yaygın olarak bulunan bir mineral olan Gypsium'un 160˚C'de 4 saat ısıtılması ile elde edilen kalsiyum sülfat, paris alçısı olarak da adlandırılmaktadır. Bu işlem aynı zamanda bakteriyel inaktivasyonu sağlayarak hastalık riskini de azaltmaktadır (164, 165). Gypsum'un ısıtılması ile oluşan hemihidratı paris alçısı $2CaSO_4H_2O$ formülü ile gösterilmektedir (134, 166). Kalsiyum sülfatın alfa ve beta olmak üzere iki formu bulunmaktadır (167).

Kalsiyum sülfat materyalinin avantajları şu şekilde sıralanabilir (134, 165- 174);

- Fizyolojik ve hücresel aktiviteleri etkileyerek kemik üzerinde olumlu sonuçlar meydana getiren biyoaktif bir maddedir.
- Ortopedik ve periodontal operasyonlarda biyouyumluluk derecesi oldukça yüksektir.
- Kalsiyum sülfatın toz kısmı su ile karıştırıldığında ekzotermik bir reaksiyon oluşturarak CaSO4 2H2O'ya dönüşür ve sertleşir. Bu özelliği kolay manipule edilebildiğinin bir göstergesidir.
- Diğer kullanılan kemik greft materyallerinin bir çoğundan ucuz ve raf ömrü uzundur.
- Kemik grefti olarak kullanılan kalsiyum sülfatın normal kemik dokuya benzer yapı gösterdiği rapor edilmiştir.
- Dokularda yangısal reaksiyon oluşturmamaktadır.
- Poröz bir yapısı olduğu için sıvı alışverişine imkan vererek membran greft olarak kullanılan flebin nekroze olmasına engel olur.
- Peltier tarafından yapılan bir çalışmada kemik hücrelerinin ve kan damarlarının büyümesine yardımcı olan osteokondüktif bir materyal olduğu bildirilmiştir.
- Kalsiyum sülfat, kemik iyileşmesinde mineralizasyonun erken dönemlerinde kalsiyum kaynağı olarak kullanılabilmektedir.
- Kemik dokudaki greft alanının damarlaşmasına bağlı olarak 4 ile 7 hafta arasında rezorbe olur.
- Kemik dokuya etkisinin yanı sıra iyileşme döneminde yumuşak dokuda bakterilerin aktivasyonunu engeller.
- Bakteriyel inaktivasyon özelliği ile özellikle pirmer yara kapanmalarının zor olduğu durumlarda yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniği (YDR) için alternatif olabileceği belirtilmiştir.
- Son yıllarda özellikle inatçı osteomyelitis olgularında lokal olarak tek başına veya antibiyotik, steroid vb ilaçlarla kombine edilerek güzel sonuçlar alındığı rapor edilmektedir.

Kemik grefti olarak kalsiyum sülfat, uzun ve kısa kemiklerde meydana gelen osteomyelitis olgularında ve periodontolojide periodontal defektlerin iyileştirilmesinde, maksilla ve premolar dişlerin üstünde yer alan maksiller sinüste oluşan defektlerde sinus augmentasyonu tekniği amacıyla, diğer kemik greftlerine bariyer desteği olması için

membran materyali olarak, kemikte çökme olduğu durumlarda kret augmentasyonu (kemik ilavesi) tekniği amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (174- 177).

2.4. WNT/ß- katenin Sinyal Yolağının Kemik Oluşumu Üzerine Etkileri

Farelerdeki meme karsinomlarında int-1 geni en sık hasara uğrayan gen olarak tanımlanmıştır. Bunun üzerine int-1 geni üzerine yoğunlaşılan çalışmalarda, diğer aile üyelerinden olan int-2 ve int-3 arasında bir benzerlik olmadığı ve int-1 geninin salgıladığı glikoproteinin Drosophila wingless genine benzer olduğu rapor edilmiştir. Bu araştırma ve incelemeler sonucunda winglesstype kısaltması olan 'Wnt', int-1 geni ailesinin sembolu olarak kullanılmaktadır (178- 180).

β-katenin, GSK3-β enzimi molekülleri Wnt sinyal mekanizmasının hücre içi olaylarından sorumludur. T hücre faktörü (TCF) ve Lenfoid güçlendirici- bağlayıcı faktör (LEF) Wnt β-katenin sinyal yolağı için hücresel cevabın oluşumunu sağlayan transkripsiyon faktörleridir (182, 183). β-katenin miktarı sitoplazmada yükseldikçe, bu moleküller hücre çekirdeğine geçmeye başlayarak TCF ve LEF'e kenetlenir. Bu etki ile Wnt β-katenin hedef genlerinden DNA'dan RNA'ya genetik bilginin aktarımı başlar ve ilgili hücresel yanıtlar meydana gelir (183, 184).

Tüm dokularda hücresel kökenli onarımların uyarılması ve doku hasarlarına erken yanıt oluşturulması için Wnt/β-katenin sinyal yolağının aktivasyonuna ihtiyaç vardır. Bu yolağın sinyal aktivasyonunu gerçekleştiremediği zaman rejenerasyon etkinliği olumsuz etkilenmektedir (185). Kemik dokuda meydana gelen kırık olgularında rejenerasyonu %84 oranında azalttığı ve nonunion meydana geldiği rapor edilmiştir. Ayrıca farelerde yapılan çalışmalarda eksik diş oluşumu, diş köklerinde zayıflama ve gerileme bildirilmiştir (186, 187).

Mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) farklılaşmasıyla oluşan osteoprogenitör hücrelerin osteoblast ve kondrositlere dönüşümünde temel mekanizmanın Wnt/β-katenin sinyal yolağında bulunan β-kateninin çekirdekte lokalize olması olduğu gösterilmiştir (188- 191).

Kemik doku ile yapılan çalışmalarda Wnt sinyalinin kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir. (192). Chen ve Long tarafından yapılan bir çalışmada, osteoblast ve osteoklast aktivitesini düzenlenmesinde doğrudan etkili olan β-katenin araştırılmıştır. Yapılan araştırma doğrultusunda, kemik doku oluşumunun erken dönemimde β-katenin eksikliği sonucu osteoblastlarda kusurlar şekillendiği ve bunun sonucu olarak kusurlu

embriyonik kemik doku ortaya çıktığı rapor edilmektedir (193). Ayrıca yapılan bir başka çalışma ile Wnt/β-katenin sinyal aktivitesi ile hem olgun hem de genç osteoblastik aktivitede artış gözlenirken, osteoklast aktivitesinde ve kemikte lizis olgularında azalmalar gözlenmiştir (194, 195).

Wnt/β-katenin sinyal yolağının aktivasyonu ile osteoklastik aktivitede yavaşlama, kemik hacim ve youğunluğunda artış, aşırı kemik sementi meydana gelmesi, kemik doku artışını gösteren parametrelerde yükseliş, dentin dokuyu ilgilendiren periodontal yapıların etkinliğinde artış gözlenmiştir. (188, 196-,199). Bu yapılan çalışmalar ışığında Wnt/β-katenin sinyal yolağının aktivasyonu ile dentin ve kemik dokuda tedavi amacıyla kullanılabileceği fikrini oluşturmuştur (200). Zaugg ve ark. tarafından fare azı dişleri üzerinde yapılan bir çalışmada pulpa hasarında glikojen sentez kinaz (GSK-3) inhibitörü ilaçlar kullanılarak Wnt/β-katenin sinyal yolağını aktive ederek dentin dokunun onarımını sağladıkları bildirilmektedir (201).

2.5. Tideglusib

Tideglusib, Tiadiazolidinon ailesi içerisinde NP031112 kodu ile ifade edilen PPAR-γ aktivasyonuna aracılık eden nöroprotektif bir ajandır. İlk kez 2007 yılında in vitro ve in vivo çalışmalarda araştırma konusu olmuştur. Tideglusib, GSK-3β inhibitörü etkisiyle aktif β katenin aktivasyonunu başlatan bir ajandır (203).

Tideglusib ile ilgili yapılan çalışmalar öncelikle alzheimer ve progresif supranükleer palsi (PSP) hastalığının tedavisinde kullanılması üzerine olmuştur. Demansın en yaygın görülen formu olan alzheimer hastalığı, Tau hipotezi ile açıklanmaktadır. Bu hipotez ile Tau proteinlerinde meydana gelen anormalliklerin hastalığı başlattığını öngörülmektedir. Bu anormalliğin sonucu olarak, sinir hücresi gövdesinin içinde nörofibriler yumaklar oluşur, mikrotübüller parçalanır, hücre iskeletinin yapısı bozulur ve sonucunda nöronun transportu gerçekleşmez. Nöronlar arasındaki iletişimin kopması sonucu amiloid ß varlığında hücre ölümleri başlamaktadır (17, 204). Domínguez vd. 2012. Tideglusib, Wnt/ß katenin yolağında önemli düzenleyici rolü olan ve GSK-3ß aktivitesini baskılamakla görevli bir ajandır (20, 205). Yapılan çalışmalarda GSK-3ß' nın aşırı aktivasyonu sonucu, hafıza bozukluğu, Tau hiperfosforilasyonu, artan amiloid ß üretimi ve lokal mikroglial aracılı yangısal reaksiyonlar ortaya çıktığı tespit edilmiştir. GSK-3ß'nın sebep olduğu bu reaksiyonlar alzheimer hastalığının ortaya çıkış mekanizması ile benzerlik göstermesi GSK-3ß

supresyonuna katkı sağlayan ajanların bu hastalığın tedavisinde kullanılabileceği sonucunu çıkarmıştır (202). Tideglusib, GSK-3ß antagonisti olan ilaçlardan biridir.

GSK-3ß doku iyileşme mekanizması üzerine önemli bir yapısı olduğu için tideglusibin dentin dokudaki periodontal hücrelere etkinliği araştırıldığında, yüksek dozda uygulamanın hücrede toksik etkiye sebebiyet vermediği normal dozda uygulandığı zamanda ise dentin dokudaki fibroblastların ve osteoblastların aktivasyonunu arttırdığı rapor edilmektedir (206), fare permolar dişlerindeki pulpa hasarının iyileştirilmesi için tideglusib kullanıldığında Wnt/β-katenin sinyal yolağını aktivite ederek, dentin dokunun onarımı görülmektedir (201). Kalvaryal kemikte yapılan öncül bir çalışmada tideglusibin otojen ve ksenojen kemik greftleriyle kullanımlarının kemik morfogenetik protein (BMP-2) ve vasküler endoteliyal büyüme fakörü (VEGF) salınımı üzerine pozitif etkisi bildirilmektedir (21).

Kemik doku ile dentin doku arasındaki moleküler, yapısal ve iyileşme mekanizması açısından benzerlik bulunmaktadır (22). Tideglusibin ağırlıklı olarak dentin dokudaki iyileştirme üzerine etkinliği araştırılmıştır. Kemik doku üzerindeki etkinliği hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Bu yapısal benzerlikten yola çıkılarak aynı iyileştirme etkisini kemik dokuda da gösterebileceği düşüncesindeyiz. Ancak tideglusibin farklı tip kemik greftleriyle bu iyileştirme üzerindeki etkinliğinin nasıl olacağı yönünde araştırmalar devam etmektedir. Yapılan literatür taramalarında tideglusibin alloplastik kemik greftleriyle kemik doku üzerinde etkisi hakkında literatüre ulaşılamamıştır. Yapılan çalışmada kemik grefti kullanımının zorunlu olduğu durumlarda greft seçimine yardımcı olmak, alternatif ilaç ile kemik grefti kombinasyonun kemik iyileşmesi üzerine etkinliğini araştırmak ve bu konuda gerçekleştirilecek çalışmalar için araştırmacılara yardımcı bir kaynak oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla tideglusib ve kalsiyum sülfat uygulamalarının gerçekleştirilmesi ve kemik rejenerasyonuna sağladıkları yarar klinik, radyolojik ve histolojik karşılaştırmalarının yapılması amaçlanmıştır.

2.6. Hipotez

Çalışmamızın hipotezi; literatür verilerde dentin dokusu ve kalvaryal kemikteki defektlerin iyileşmesinde olumlu etkisi görülen ve toksisite göstermediği bildirilen tideglusibin gerek dentin gerekse kalvaryal kemik yapısı ile benzerlik gösteren ekstremite kemiklerindeki maddi kayıplı defektlerdeki etkileri kliniklerde rutin olarak

kullanım alanı bulan kemik greftleri ile karşılaştırılacaktır. Elde edilen değerler klinik, radyolojik ve patolojik yönden incelenerek sonuçları rapor edilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı doktora tezi olarak planlanan bu çalışma, Harran Üniversitesi Hayvan Deneyi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HRÜ-HDAM) gerçekleştirilmiştir. Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Hrü-Hadyek) tarafından 11.12.2020 tarih, 2020/06 oturum no, ve 01-17 karar ile "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" esaslarına göre uygun bulunarak onaylanmıştır. Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi (BAP) tarafından 21090 proje numarası ile araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanları ve Protokol Dizaynı

Çalışmada denek olarak 16 adet, 4-5 aylık, erkek Yeni Zelanda tavşanı kulanıldı. Tavşanlar Harran Üniversitesi Hayvan Deneyi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (HRÜ-HDAM) temin edildi. Tavşanların bakım ve beslenmeleri aynı merkezde gerçekleştirildi. Tavşanlar çalışma süresince 20-24 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde barındırılarak ad-libitum su ve standart tavşan yemi verildi. Tavşanlar rastgele ve her grupta 8 adet olacak şekilde, 30 ve 60 günlük izleme süreleri olmak üzere 2 ana gruba ayrıldı. Tüm operasyonlar Harran Üniversitesi Hayvan Deneyi Uygulama ve Araştırma Merkezi Operasyon Salonu'nda yapıldı. Radyografiler, Hasvet 838 HF50 70KV - 50mA veteriner taşınabilir DR röntgen cihazı ile yapıldı ve dijital olarak değerlendirildi.

3.2. Greft Materyalleri

Çalışmada tideglusib (SML 03399- 50 mg, z96% (HPLC) Sigma Aldrich, USA) granül formda ve kalsiyum sülfatın (Merck 102161 Calcium Sulfate Dihydrate Precipitated For Analysis Supelco® 500 gr, GERMANY) ince alçıtaş tozu formundaki steril ticari preparatları kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan greft materyalleri. **A)** Tideglusib (Sigma Aldrich). **B)** Kalsiyum Sülfat (Supelco®).

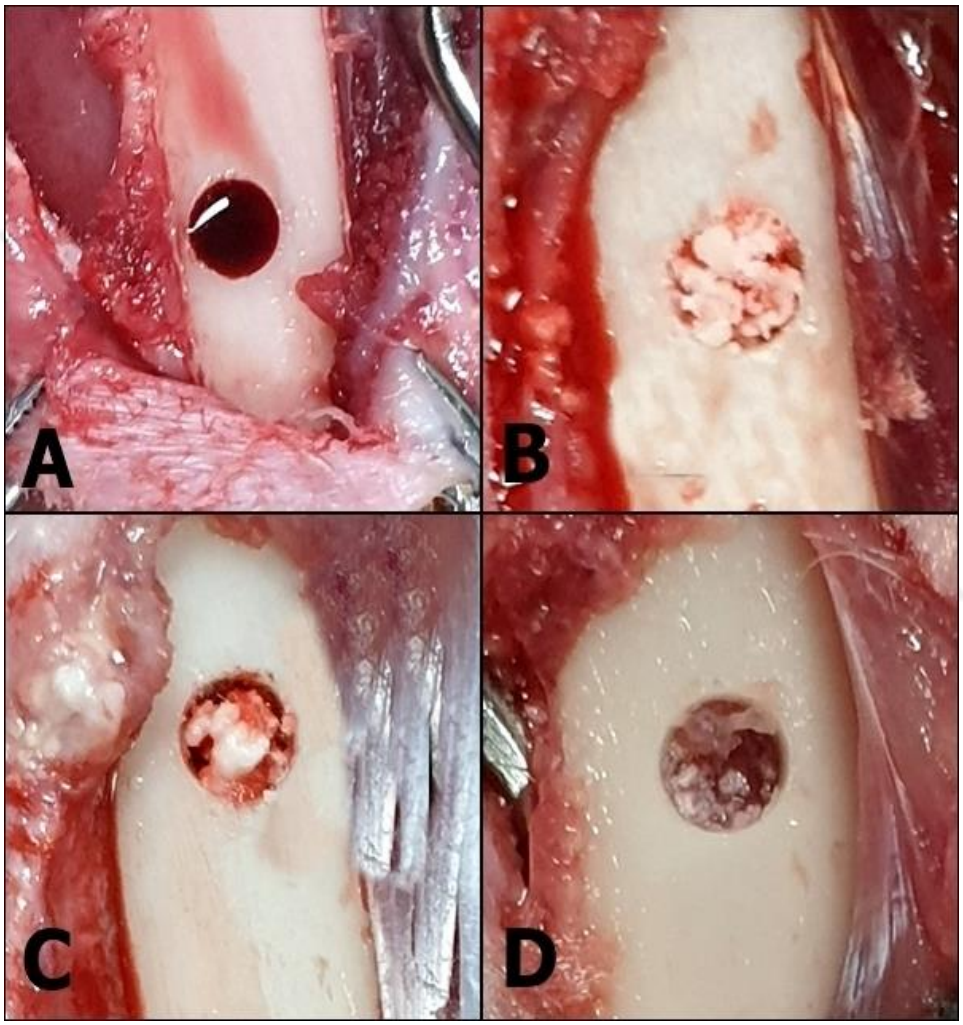
3.3. Anestezi

Anestezi protokolü olarak, 5 mg/kg Xylazine Hydrochloride (Rompun, Bayer, 23,32 mg/ml) kas içi enjeksiyonundan 10 dakika sonra, 35 mg/kg Ketamin Hydrochlorur'ün (Ketasol, İnterhas, 50 mg/ml) kas içi enjeksiyonu uygulandı.

3.4. Operatif Prosedür

Operasyon yeri olarak seçilen sol ve sağ tibianın proksimal medial yüzlerinde, deri tıraş edilerek %10'luk povidon iodine solüsyonu ile antisepsisi gerçekleştirildi. Tibianın medial yüzü üzerinde subkutan fasia ile derinin longitudinal ensizyonu ve kasların küt diseksiyonu sonrasında tibia açığa çıkarılarak bölgedeki damar ve sinirlerin korunmasına dikkat edilerek periost ensize ve ekarte edildikten sonra, 3.5 mm çapındaki frezler ve tur motoru (mikromotor) yardımıyla aralarında 1 cm mesafe olacak şekilde 3.5 mm çapında medullar kanala ulaşan ikisi sağ ikisi sol tibiada toplam 4 adet unikortikal defekt oluşturuldu. Defektler oluşturulurken bölge sürekli olarak steril

serum fizyolojik ile ıslatılıp kemikteki aşırı ısınma engellenerek olası bir kemik nekrozunun önüne geçilmeye çalışıldı. Aynı işlemler tüm tavşanlara uygulanarak ve her tavşanda 4 adet olmak üzere toplam 64 adet kemik defekti elde edildi. Her bir tavşandaki defektlerden biri boş bırakılırken (kontrol grubu), diğer defektlere ise sırasıyla tideglusib+kalsiyüm sülfat, kalsiyum sülfat ve tideglusib doldurulduu (Şekil 3.2). Postoperatif izleme süreleri ve defekt grupları Tablo 3.1'de ifade edilmiştir.



Şekil 3.2. Operasyon sonrası kemik defektlerinin görünümü. A) Kontrol defekti, B) Tideglusib+Kalsiyum Sülfat, C) Kalsiyum Sülfat, D) Tideglusib.

Tablo 3.1. Postoperatif izleme süreleri ve greft materyallerinin uygulandıkları defekt sayıları.

	Postoperatif İzleme Süreleri		
Gruplar	**30.Gün**	**60.Gün**	**Toplam**
Kontrol	8	8	16
Tideglusib	8	8	16
Kalsiyum Sülfat	8	8	16
Tideglusib+ Kalsiyum Sülfat	8	8	16
Toplam	**64**	**64**	**64**

Operasyon bölgesinde periost ve deri 3/0 numara PGA (3/0 PGA keskin 75 cm KATSAN cerrahi iplik) kullanılarak kapatıldı. Tüm deneklere postoperatif 5 gün süreyle 400.000 IU penisilin/streptomisin kas içi uygulandı ve operasyon yaralarının pansumanları her gün kontrol edilerek gerekli yara bakımları gerçekleştirildi.

3.5. Klinik Muayeneler

Tavşanların anesteziden uyanma süreci ve postoperatif yara bakımları düzenli olarak takip edildi. Bir komplikasyon oluşmadığı gözlenerek postoperatif 10. günde deri dikişleri alındı. Postoperatif süreçteki topallık ile ilgili klinik gözlemler rapor edildi.

3.6. Radyolojik Muayeneler

Klinik muayeneleri ve topallık durumları gözlem altında tutularak radyolojik muayene ve değerlendirmeler operasyon sonrası, 15, 30, 45 ve 60. günlerde tibiaların medio-lateral olarak alınan radyografileri modifiye Lane ve Sandhu radyolojik skorlama kriterlerine göre değerlendirildi (207). Bu skorlama yöntemi doğrultusunda oluşturulan kemik defektlerindeki iyileşme skorlamasında defekt bölgesinde yeni kemik formasyonunun varlığı ve yokluğu durumuna göre %25, %50, %75 veya %100'ünün dolup dolmadığına bakıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Modifiye Lane ve Sandhu radyolojik skorlama kriterleri (207).

Defekt Bölgesindeki Yeni Kemik Formasyonu Oluşumu (%)	Skor
Yok	0
%25	1
%50	2
%75	3
%100	4

3.7. Histolojik Muayeneler

Çalışmada 30 ve 60 günlük izleme gruplarındaki deneklerden sekiz adedi 30. günde, kalan sekiz adedi ise 60. günde 5 mg/kg Xylazine Hydochloride (Rompun, Bayer, 23.32 mg/ml) enjeksiyonundan 10 dakika sonra 200 mg/kg dozunda Thiopental Sodium (Pental Sodyum 0.5 g İ.E. ULUGAY, İstanbul) intraperitoneal olarak uygulanarak ötenazi edildikten sonra tibiaları alındı.

Sakrifikasyon sonrası tibianın greft bölgelerini içeren kemik bölümü histolojik incelemeler için alındı. Alınan kemik dokuları %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna konularak tespit edildi. Greft bölgesini içeren kemik örnekleri yaklaşık 10 hafta boyunca %10'luk Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) solüsyonunda dekalsifiye edildi. Solüsyon her hafta değiştirilerek dokulardaki dekalsifikasyon kontrol edildi. Esnekliğin oluştuğu belirlenen dokular greft uygulanan kısımlarından ikiye ayrılarak küçültme işlemi yapıldı. Küçültülen dokular 24 saat süre akarsuda yıkandıktan sonra rutin doku takibi işleminden geçirilerek parafin bloklar haline getirildi. Parfin bloklardan 5 mμ kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere Hematoksilen-Eosin (H&E) ve Masson's Trichrome (208) boyamaları yapılarak ışık mikroskobunda (Olympus BX51) incelendi.

Mikroskobik incelemede, Olympus DP–73 dijital görüntüleme sistemi yardımı ile oluşan yeni kemik dokusunun kalınlığını ölçüldü. Ayrıca aşağıdaki Tablo 3.3'de belirtilen kemik iyileşmesi ile ilgili Emery ve arkadaşlarının bildirdiği metod ile histolojik skorlama parametrelerine göre değerlendirme yapıldı (209).

Tablo 3.3. Kemik iyileşmesi ile ilgili histolojik skorlama parametreleri (209).

Parametre	Skor
Yalnız fibröz doku	**1**
Çok miktarda fibröz az miktarda kıkırdak doku	**2**
Baskın kıkırdak doku az miktarda fibröz doku	**3**
Baskın kıkırdak ve az miktarda trabeküler kemik doku	**4**
Eşit miktarda immatür kemik ve kıkırdak doku	**5**
Baskın trabeküler kemik ve az miktarda kıkırdak	**6**
Kompakt kemik doku	**7**

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler, IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama ± standart sapma, en küçük değer (min), en büyük değer (max), ortanca (medyan), 25. yüzdelik, 50. yüzdelik ve 75. yüzdelik değerleri olarak verildi. Nicel değişkenlere ait verilerin normal dağılımı Shapiro Wilk normalite testi ile değerlendirildi. Sayısal değişkenler için gruplar arası karşılaştırmalar verilerin normal dağılması durumunda iki grup için, bağımsız örneklem t testi, ikiden daha fazla alt kategoriye sahip bağımsız grupların karşılaştırmaları Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) sonucu fark bulunması durumunda, grup varyansları homojen olduğu durumda Tukey çoklu karşılaştırma testi olarak kullanıldı. Verilerin normal dağılmaması durumunda iki grup için, Mann-Whitney U testi ile ikiden fazla grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Testi kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Greft Materyallerine Ait Bulgular

Greft materyallerinin steril olarak paketlenmiş ticari preparatlar halinde olup, tideglusibin granül formunda ve açık kemik renginde olduğu diğer greft materyali olan kalsiyüm sülfatın ise parlak beyaz renkte ince alçıtaşı tozu formunda olduğu gözlendi.

4.2. Klinik Bulgular

Deneysel çalışma süresince defektlerin oluşturulmasında ve greft materyallerinin defekt alanlarına yerleştirilmesinde, postoperatif ağrı ve anesteziden uyanma aşamalarında herhangi bir komplikasyon ile karşılaşılmadı. Postoperatif süreçteki yara bakımları ve pansuman işlemleri düzenli olarak gerçekleştirildi. Operasyon sonrası 10. günde operasyon yara hattının komplikasyonsuz bir şekilde iyileştiği gözlendi ve bu doğrultuda dikişler uzaklaştırıldı. Hayvan deneyleri ünitesi bünyesinde bulunan özel tavşan kafeslerinde barındırılan tavşanlarda operasyondan sonraki ilk 7 günde herhangi bir iştahsızlık ve genel durum bozukluğu meydana getirmeyen, zamanla azalan hafif bir topallık meydana geldi ve 7 gün sonunda normal yürüdükleri gözlendi.

4.3. Radyolojik Bulgular

Radyolojik bulgular, postoperatif ile 15, 30, 45, 60. günlerde tibia kemiğinin medio-lateral pozisyonda alının grafilerinin incelenmesi ile değerlendirildi.

4.3.1. Postoperatif Radyolojik Bulgular

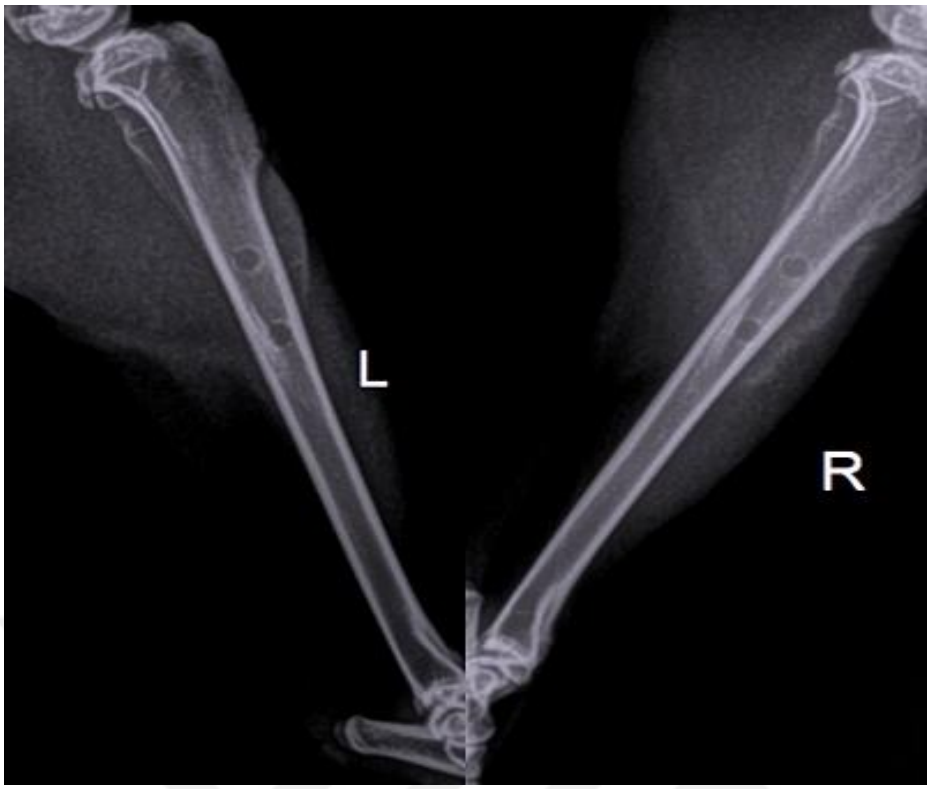
Postoperatif radyolojik bulgularda oluşturulan tüm defektler belirgin olarak gözlendi. Ancak tideglusib, kalsiyum sülfat ve tideglusib+kalsiyum sülfatlı defektlerin bulunduğu radyolojik incemelerde defekt bölgeleri normal kemik dansitesinden daha az yoğun kontrastta bulunmaktaydı.



Şekil 4.1. Postoperatif radyografik görünüm. **L)** sol proksimal defekt kontrol grubu, sol distal defekt tideglusib+kalsiyum sülfat grubu, **R)** sağ proksimal defekt kalsiyum sülfat grubu, sağ distal defekt tideglusib grubu.

4.3.2. Postoperatif Onbeşinci Gündeki Radyolojik Bulgular

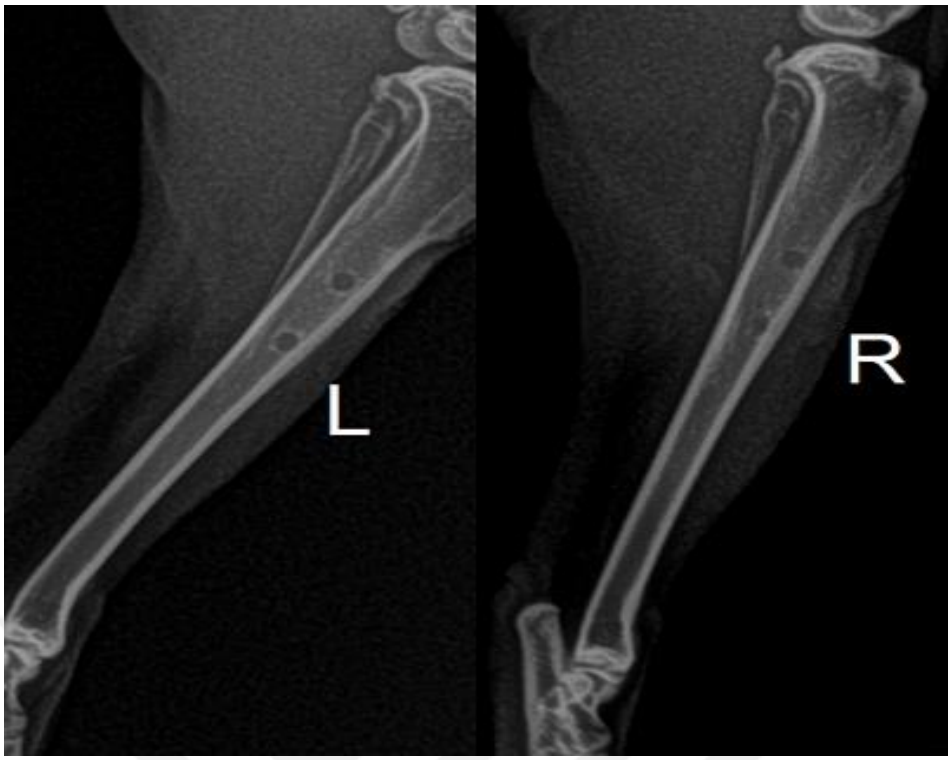
Postoperatif ilk radyografik veriler ile onbeşinci gün elde edilen radyografik görüntüler arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 4.2. Postoperatif 15. gündeki radyografik görünüm. **L)** sol proksimal defekt kontrol grubu, sol distal defekt tideglusib+kalsiyum sülfat grubu, **R)** sağ proksimal defekt kalsiyum sülfat grubu, sağ distal defekt tideglusib grubu.

4.3.3. Postoperatif Otuzuncu Gündeki Radyolojik Bulgular

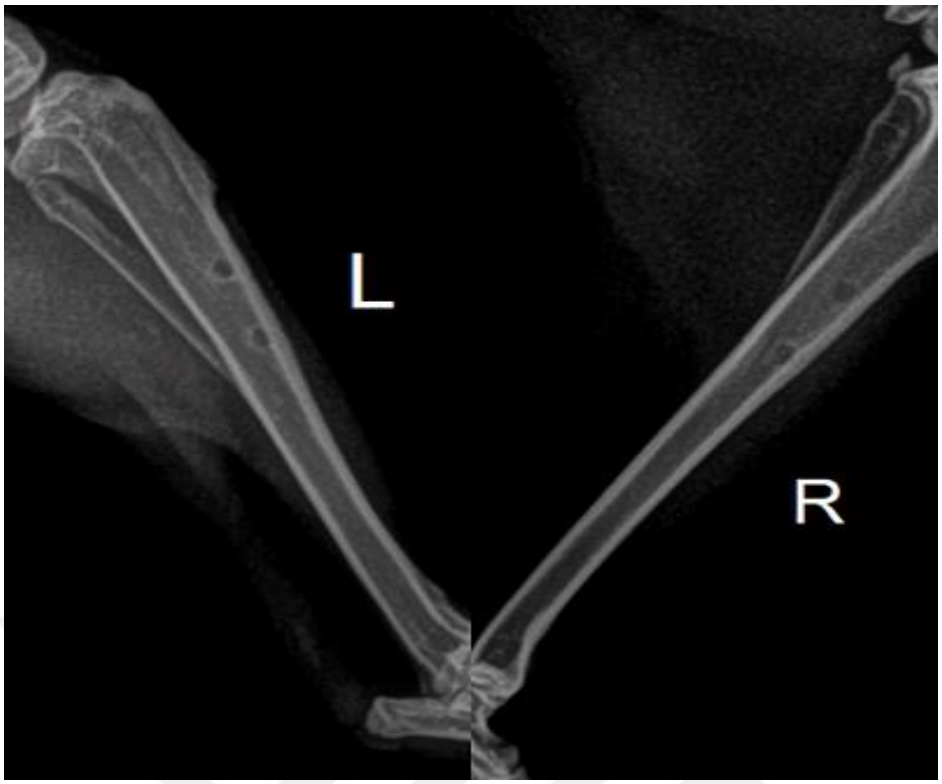
Postoperatif otuzuncu günde elde edilen radyografik veriler doğrultusunda yeni kemik oluşumu kontrol grubunda %25, tideglusib ve kalsiyum sülfatı içeren defekt gruplarında yaklaşık %50, tideglusib+kalsiyum sülfat grubunda ise %50-75 olarak belirlendi.



Şekil 4.3. Postoperatif 30. gündeki radyografik görünüm. **L)** sol proksimal defekt kontrol grubu, sol distal defekt tideglusib+kalsiyum sülfat grubu, **R)** sağ proksimal defekt kalsiyum sülfat grubu, sağ distal defekt tideglusib grubu.

4.3.4. Postoperatif Kırkbeşinci Gündeki Radyolojik Bulgular

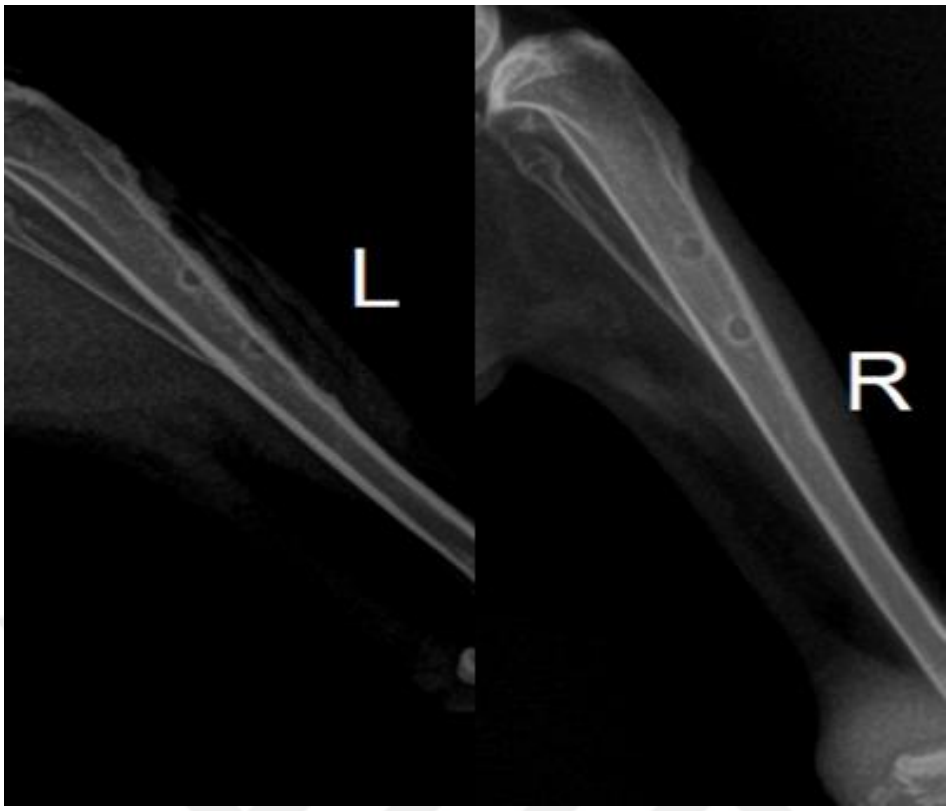
Postoperatif kırkbeşinci günde elde edilen radyografik veriler doğrultusunda yeni kemik oluşumu kontrol grubunda %25-50, tideglusib ve kalsiyum sülfatı içeren defekt gruplarında yaklaşık %50-75, tideglusib+kalsiyum sülfat grubunda ise %75-100 olarak belirlendi.



Şekil 4.4. Postoperatif 45. gündeki radyografik görünüm. **L)** sol proksimal defekt kontrol grubu, sol distal defekt tideglusib+kalsiyum sülfat grubu, **R)** sağ proksimal defekt kalsiyum sülfat grubu, sağ distal defekt tideglusib grubu.

4.3.5. Postoperatif Altmışıncı Gündeki Radyolojik Bulgular

Postoperatif altmışıncı günde elde edilen radyografik veriler doğrultusunda yeni kemik oluşumu kontrol grubunda %50, tideglusib ve kalsiyum sülfatı içeren defekt gruplarında yaklaşık %75, tideglusib+kalsiyum sülfat grubunda ise yaklaşık %100 olarak belirlendi.



Şekil 4.5. Postoperatif 60. gündeki radyografik görünüm. **L)** sol proksimal defekt kontrol grubu, sol distal defekt tideglusib+kalsiyum sülfat grubu, **R)** sağ proksimal defekt kalsiyum sülfat grubu, sağ distal defekt tideglusib grubu.

Radyolojik değerlendirmeler amacıyla 30. ve 60. günde elde edilen radyografik veriler kullanıldı. Olgulara ait radyografik değerlendirmeler tablo 4.1'de ifade edilmiştir.

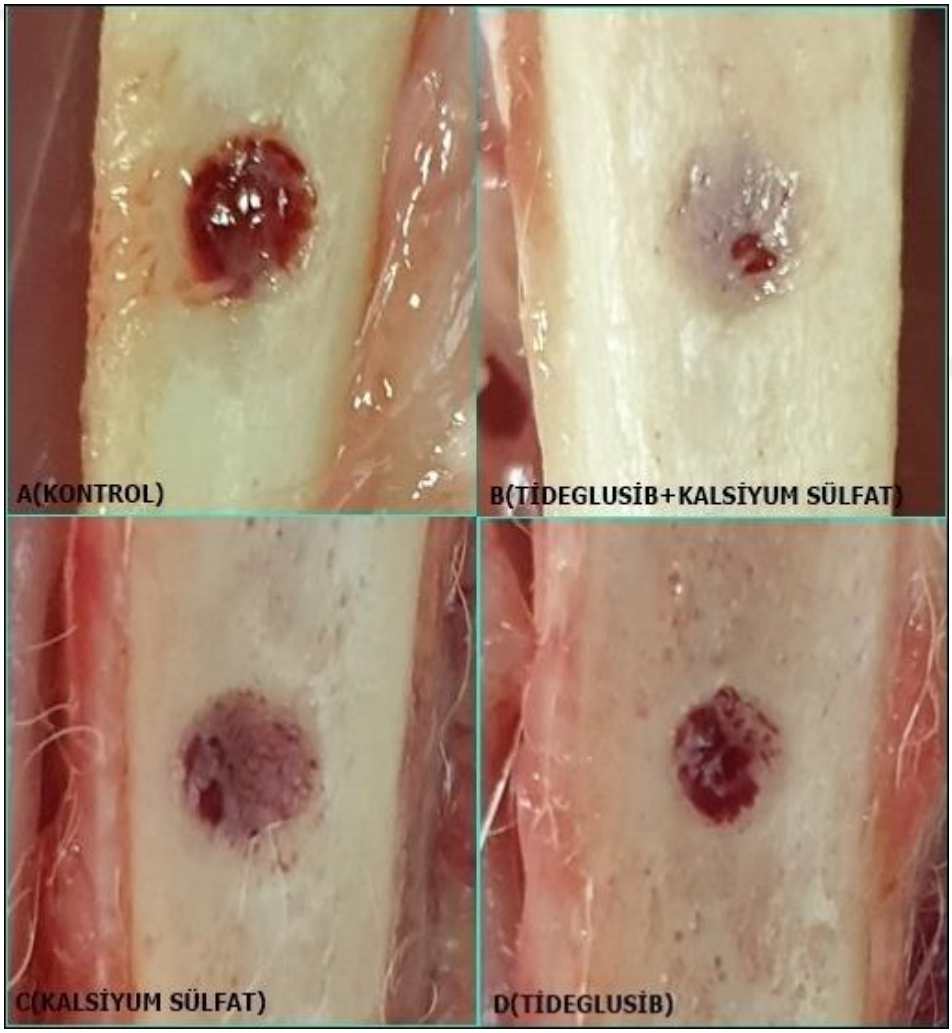
Tablo 4.1. Modifiye Lane ve Sandhu skorlama kriterlerine (207) göre defektlerin 30. ve 60. günlerdeki radyolojik değerlendirmeleri.

Gün	n	Kontrol	Tideglusib+ Kalsiyum Sülfat	Kalsiyum Sülfat	Tideglusib	P
30.gün	8	1.12±0.23[c]	3.37± 0.35[a]	2.37± 0.51[b]	2.56± 0.62[b]	,000
60.gün	8	2.25± 0.26[c]	3.87± 0.23[a]	3.12± 0.23[b]	3.37± 0.23[b]	,000
P		,000	,002	,005	,004	

[a, b, c] Aynı satırdaki gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir.

4.4. Makroskobik Bulgular

Makroskobik bulgular doğrultusunda, otuz günlük süre sonunda yapılan kemik defektlerinin incelenmesinde kontrol grubunda defektlerin tam olarak kapanmadığı gözlendi. Bu süre sonundaki tideglusib ve kalsiyum sülfatlı defektlerde kontrol grubuna göre daha çok kemik oluşumu alanlarına rastlanıldı ve benzer kemik iyileşmesi gözlense de bazı kalsiyum sülfatlı defektlerin merkezlerinde küçük boşluklu alanlar bulunmaktaydı. Tideglusib ve kalsiyum sülfatın kombine edilerek kullanıldığı defekt alanlarında diğer gruplara göre daha çok yeni kemik oluşumları gözlendi ve bazı olgularda defektlerin büyük kısmı kapanarak çok az boşluklu alanlara rastlanıldı.



Şekil 4.6. 30. güne ait defektlerin postoperatif makroskobik görüntüsü. A) Kontrol defekti, B) Tideglusib+Kalsiyum Sülfat, C) Kalsiyum Sülfat, D) Tideglusib.

Altmış günlük süre sonunda yapılan incelemelerde kontrol grubunu içeren alanlarda tam olarak yeni kemik oluşumu ile doldurulamadığı gözlendi. Kalsiyum sülfatlı defekt alanlarında ise 1 adet olguda yeni kemik oluşumunda diğer defekt alanlarına göre 2 mm çaplarında boşluk gözlendi. Kalsiyum sülfatlı diğer defekt alanlarında ise kemik oluşumunun büyük kısmının tamamlandığı gözlendi. Tideglusib içeren defektli alanlarda ise yeni kemik oluşumunun büyük kısmı tamamlanmıştı ve 4 adet olguda defekt alanının tamamının dolduğu dikkati çekti. Tideglusib ve kalsiyum sülfatın kombine edildiği olgularda ise defektlerin yeni kemik oluşumu ile tamamen doldurulduğu ancak 2 adet olguda bazı defekt izlerinin belirlenebildiği gözleniyordu.

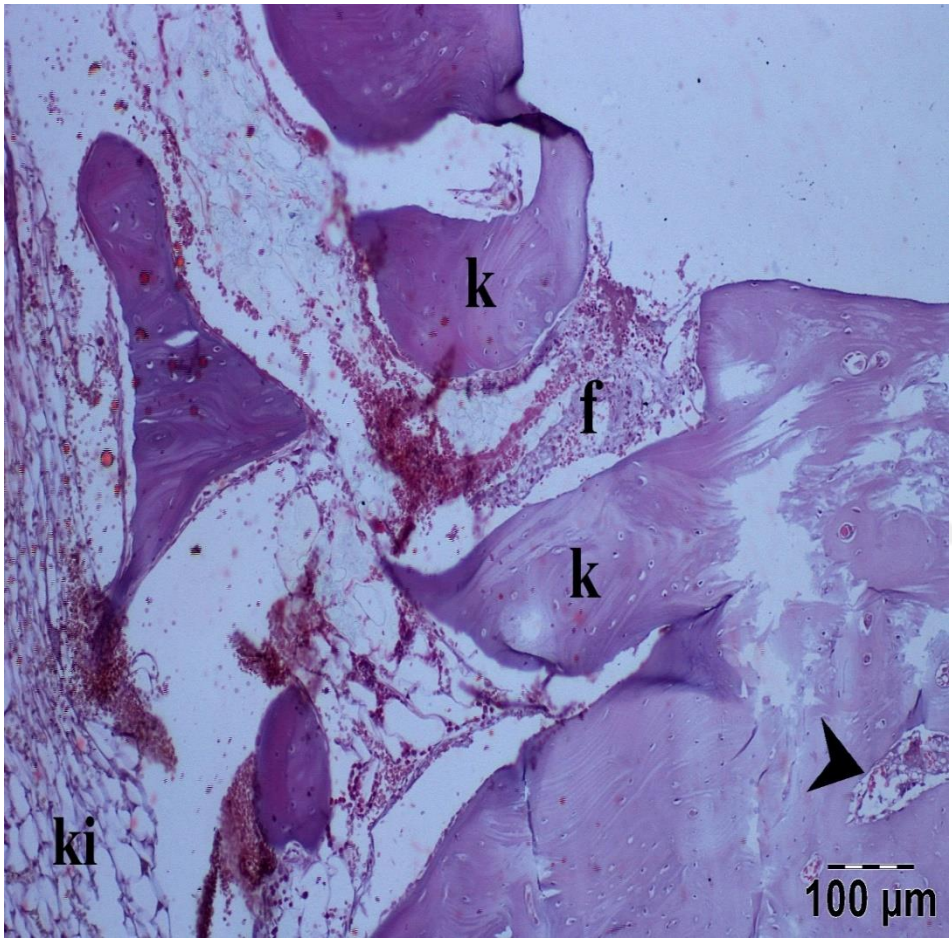


Şekil 4.7. 60. güne ait defektlerin postoperatif makroskobik görüntüsü. A) Kontrol defekti, B) Tideglusib+Kalsiyum Sülfat, C) Kalsiyum Sülfat, D) Tideglusib.

4.5. Histolopatojik Bulgular

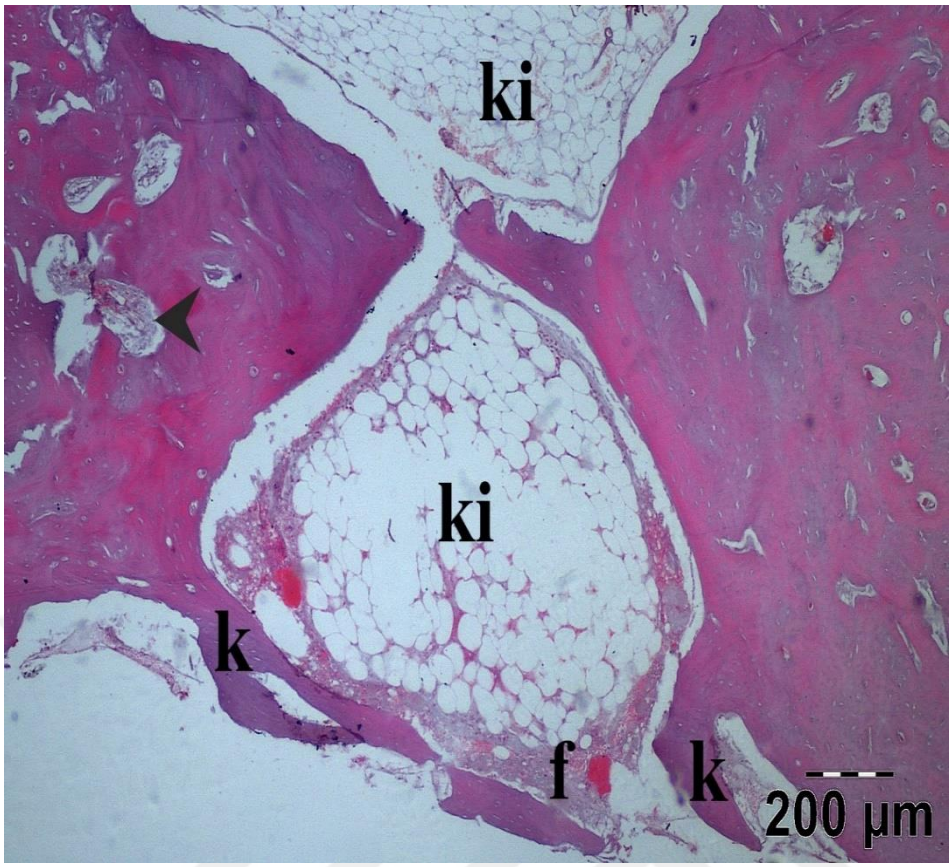
4.5.1. Otuz Günlük Gruplardaki Histolojik Bulgular

30. Gün Kontrol grubu: Defekt bölgesinin üst kısmında çok az miktarda fibröz bir dokunun olduğu, ancak özellikle defekt bölgesinin iki ucundan itibaren kıkırdak dokunun oluştuğu görüldü. Kıkırdak doku çevresinde küçük adacıklar şeklinde sıralanmış aktif osteoblastların varlığı dikkati çekti (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 30. gün kontrol grubu, **k:** kıkırdak, **f:** fibröz doku, **ki:** kemik iliği, **ok başı:** osteoblast, H&E x10.

30. Gün Kalsiyum Sülfat grubu: Defekt bölgesinin iki ucundan itibaren ise belirgin kıkırdak dokunun oluştuğu ve yer yer kıkırdak doku arasında daha az miktarda fibröz dokunun olduğu görüldü. Kıkırdak doku çevresinde küçük adacıklar şeklinde sıralanmış aktif osteoblastların varlığı dikkati çekti (Şekil 4.9).



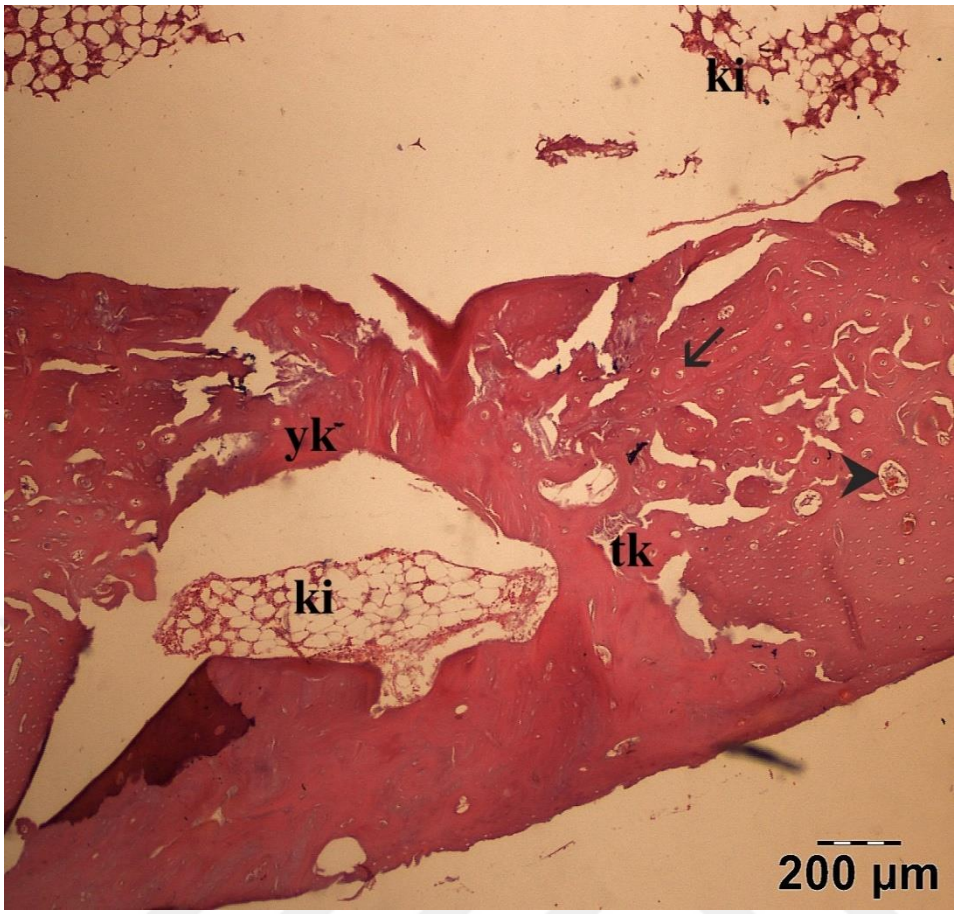
Şekil 4.9. 30. gün Kalsiyum Sülfat grubu, **k:** kıkırdak, **f:** fibröz doku, **ki:** kemik iliği, **ok başı:** osteoblast, H&E x4.

30. Gün Tideglusib grubu: Defekt bölgesinin iki ucunun kıkırdak doku ve yeni kemik dokusu ile birleştiği görülmekle birlikte birkaç hayvanda yeni kemik oluşumu ve kıkırdak dokuya ilave olarak daha az miktarda fibröz dokunun da olduğu görüldü. Özellikle defekt uçlarının tam olarak birleşmediği bölgelerde küçük adacıklar şeklinde sıralanmış osteoblastların varlığı gözlendi (Şekil 4.10).

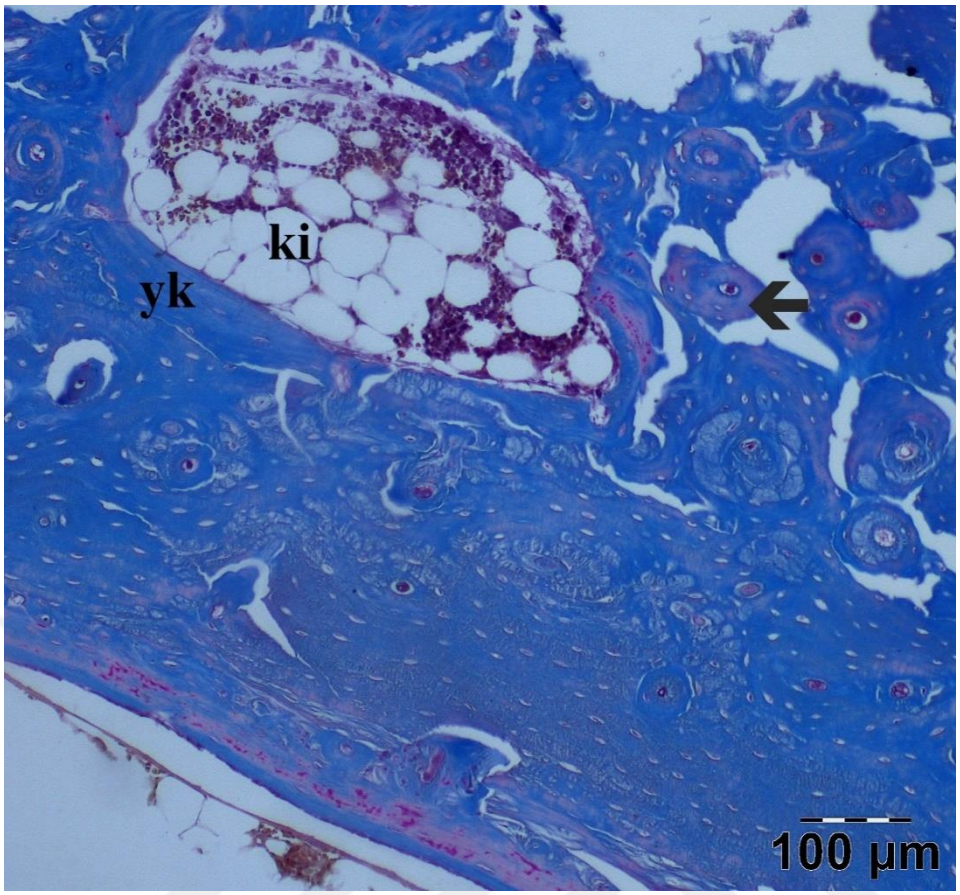


Şekil 4.10. 30. gün Tideglusib grubu, **k:** kıkırdak, **yk:** yeni kemik, **ki:** kemik iliği, **ok başı:** osteoblast, H&E x4.

30. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu: Defekt bölgesinin nerdeyse tama yakın oranda kapandığı görüldü. Örneklerin çoğunda defekt bölgesinde yeni kemik doku oluşumu baskınken daha az sayıdaki örnekte trabeküler kemik ile birlikte küçük odaklar halinde kıkırdak dokunun varlığı tesbit edildi. Yeni kemik doku ile trabeküler kemik oluşumu arasında kısmen yeni kemik iliğinin şekillendiği alanlar ile sıralanmış küçük aktif osteoblast adacıkları dikkati çekti. Kompakt kemiğe doğru yeni kemik oluşumlarının oluştuğu alanlarda Haver's kanallarının kısmen şekillenmeye başladığı saptandı (Şekil 4.11, Şekil 4.12).



Şekil 4.11. 30. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu, **yk:** yeni kemik, **tk:** trabeküler kemik, **ki:** kemik iliği, **ok başı:** osteoblast, **ok:** Havers kanalı, H&E x4.



Şekil 4.12. 30. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu, **yk:** yeni kemik, **ki:** kemik iliği, **ok:** Havers kanalı, Masson's Trichrome x10.

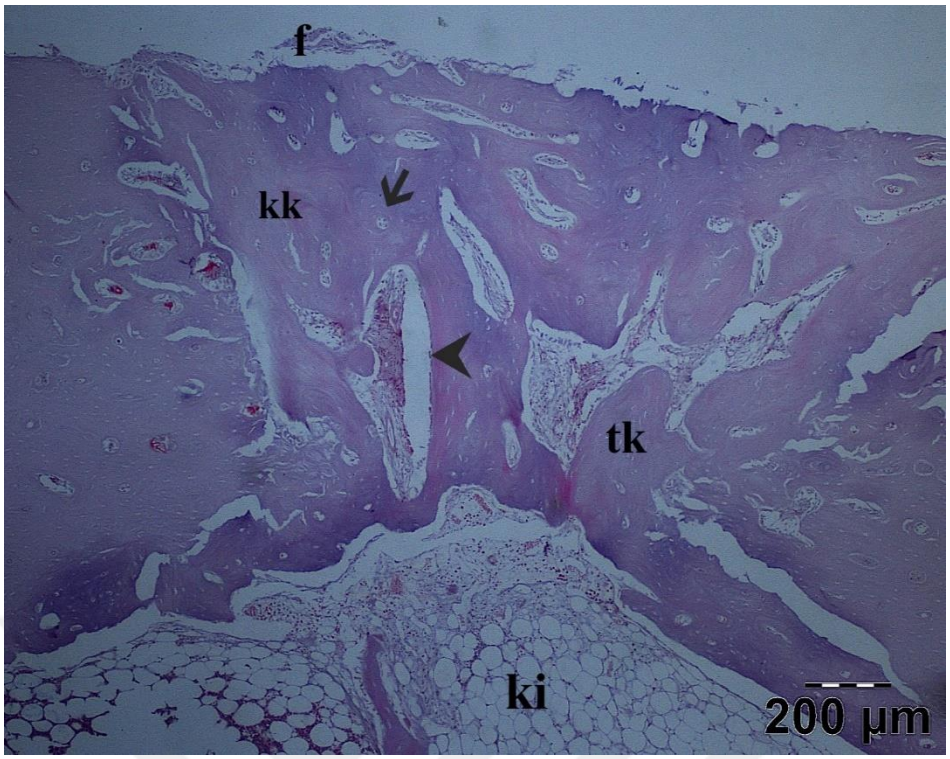
4.5.2. Altmış Günlük Gruplardaki Histolojik Bulgular

60. Gün Kontrol grubu: Defekt bölgesinin iki ucunun ince bir yeni kemik dokusu ile birleştiği ve bu bölgenin altında ise daha baskın olarak trabeküler kemiğin varlığı dikkati çekti. Birkaç hayvanda yeni kemik oluşumu ve kıkırdak dokuya ilave olarak daha az miktarda fibröz dokunun da olduğu görüldü. Özellikle defekt uçlarının tam olarak birleşmediği bölgelerde kısmen yeni kemik iliğinin şekillendiği alanlar ile küçük adacıklar şeklinde sıralanmış aktif osteoblastların varlığı gözlendi (Şekil 4.13).

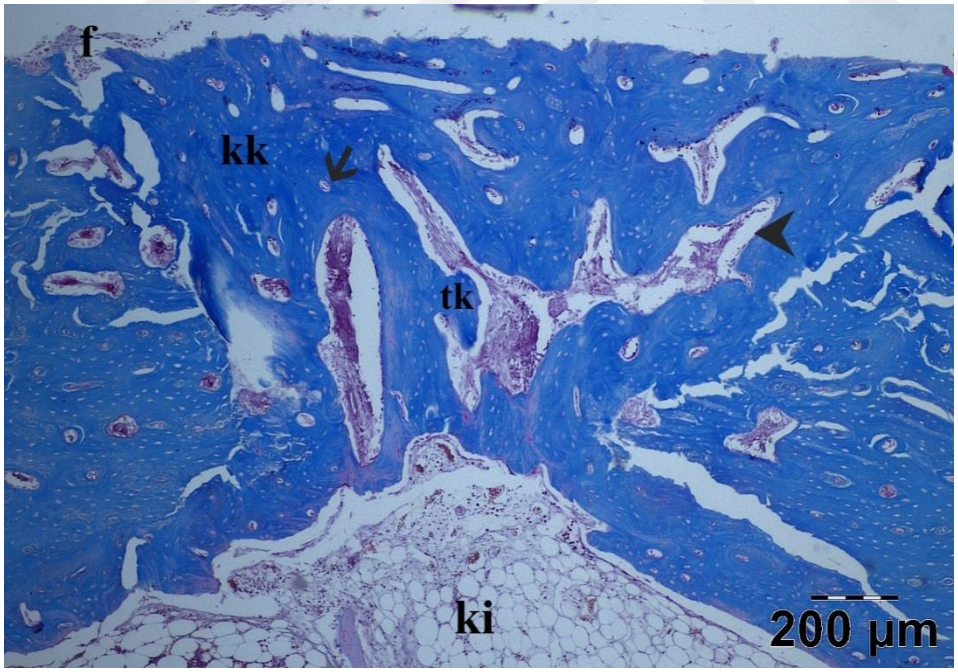


Şekil 4.13. 60. gün Kontrol grubu, **yk:** yeni kemik, **tk:** trabeküler kemik, **f:** fibröz doku, **ki:** kemik iliği, **ok başı:** osteoblast, H&E x4.

60. Gün Kalsiyum Sülfat grubu: Yer yer üzeri çok ince fibröz bir kapsülle kaplı alanın hemen altındaki defekt bölgesininde tama yakın düzeyde bir kapanmanın gerçekleştiği gözlendi. Birleşen bölgede eşit oranda yeni ve trabeküler kemik dokunu yer aldığı görüldü. Yeni ve trabeküler kemik arasında gelişi güzel dağılmış içi kemik iliği ile dolu olup, kemik iliğini çevreleyen sıralanmış halde aktif osteoblast adacıkları mevcuttu. Kompakt kemiğe yakın yeni kemik oluşumunun olduğu alanlarda Haver's kanallarının kısmen şekillenmeye başladığı görüldü (Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16).



Şekil 4.14. 60. gün Kalsiyum Sülfat grubu, **f:** fibröz doku, **kk:** kompakt kemik, **tk:** trabeküler kemik, **ki:** kemik iliği, **ok:** Havers kanalı, **ok başı:** osteoblast, H&E x4.

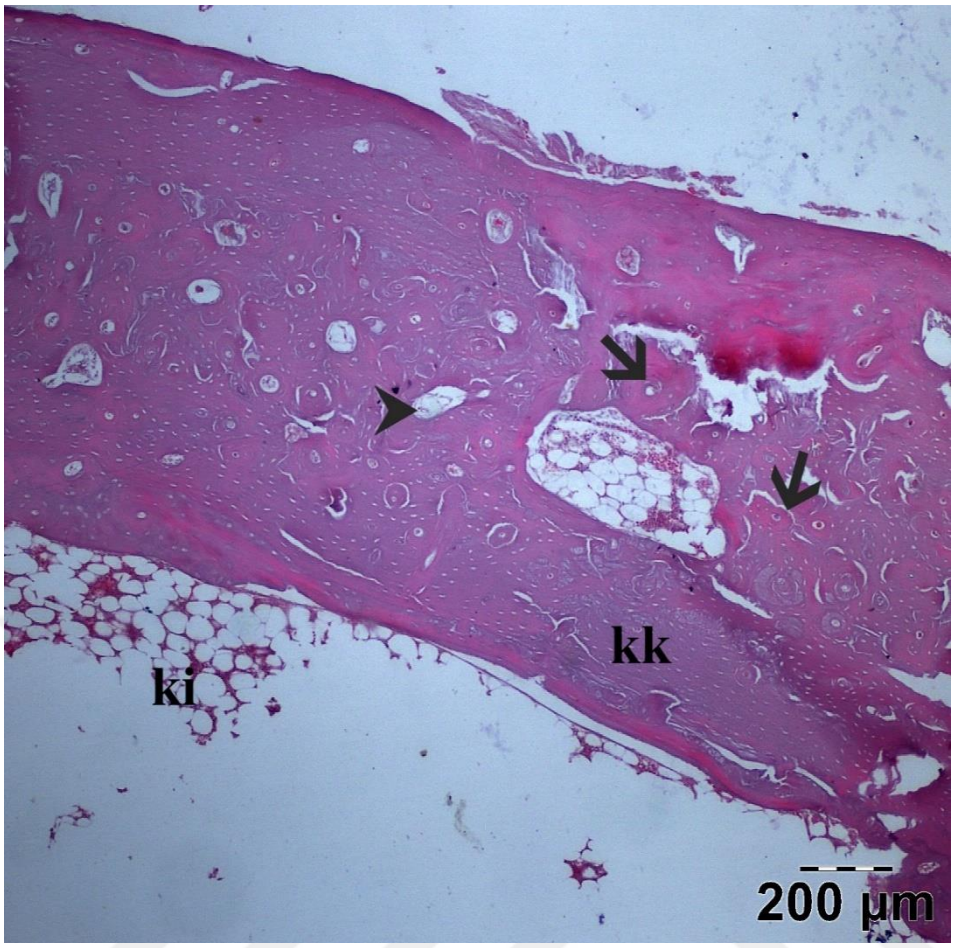


Şekil 4.15. 60. gün Kalsiyum Sülfat grubu, **f:** fibröz doku, **kk:** kompakt kemik, **tk:** trabeküler kemik, **ki:** kemik iliği, **ok:** Havers kanalı, **ok başı:** osteoblast, Masson's Trichrome x4.



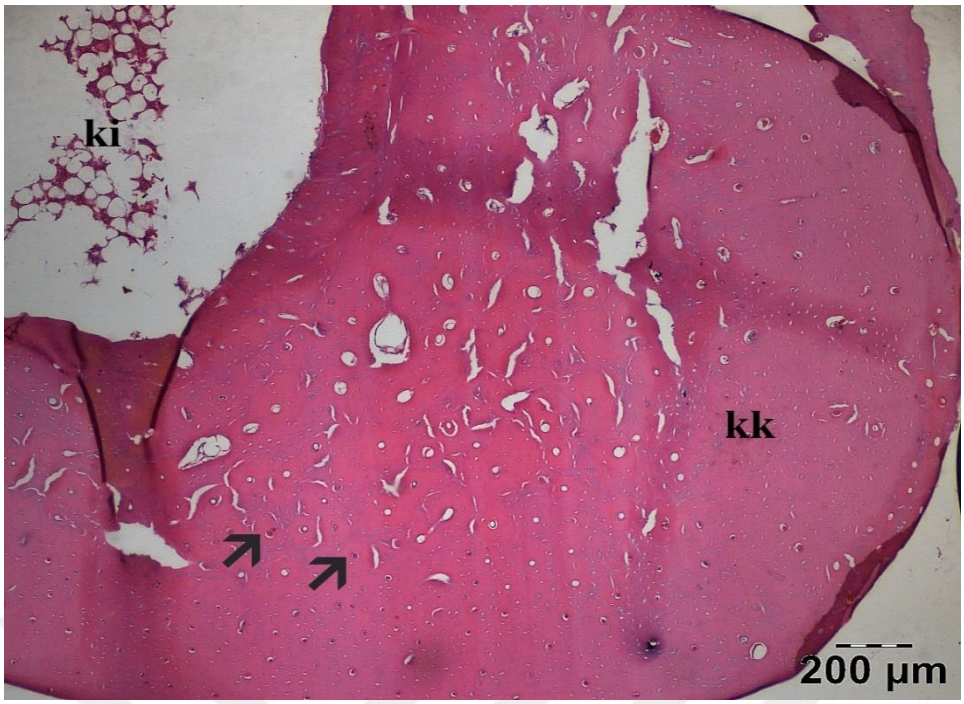
Şekil 4.16. 60. gün Kalsiyum Sülfat grubu, **ok:** osteoblast, Masson's Trichrome x40.

60. gün Tideglusib grubu: Defekt onarımının neredeyse tam düzeyde şekillendiği tespit edildi. Kompakt kemik yapısının daha geniş bir alanı kapsadığı görülmekle birlikte çok az sayıda ve daha küçük alanı kapsayacak şekilde aktif osteoblastla çevrelenmiş içi kemik iliği ile dolu adacıklar mevcuttu. Kompakt kemik içerisinde çok sayıda Haver's kanalının şekillendiği dikkati çekti (Şekil 4.17).

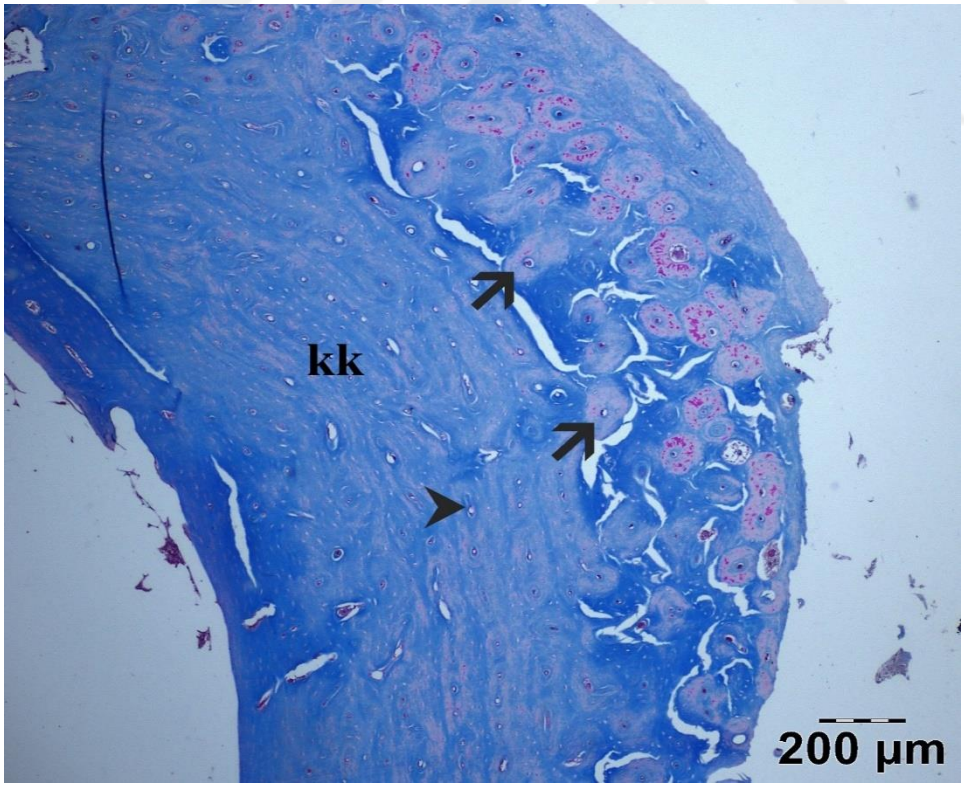


Şekil 4.17. 60. gün Tideglusib grubu, **kk:** kompakt kemik, **ki:** kemik iliği, **ok:** Havers kanalı, **ok başı:** osteoblast, H&E x4.

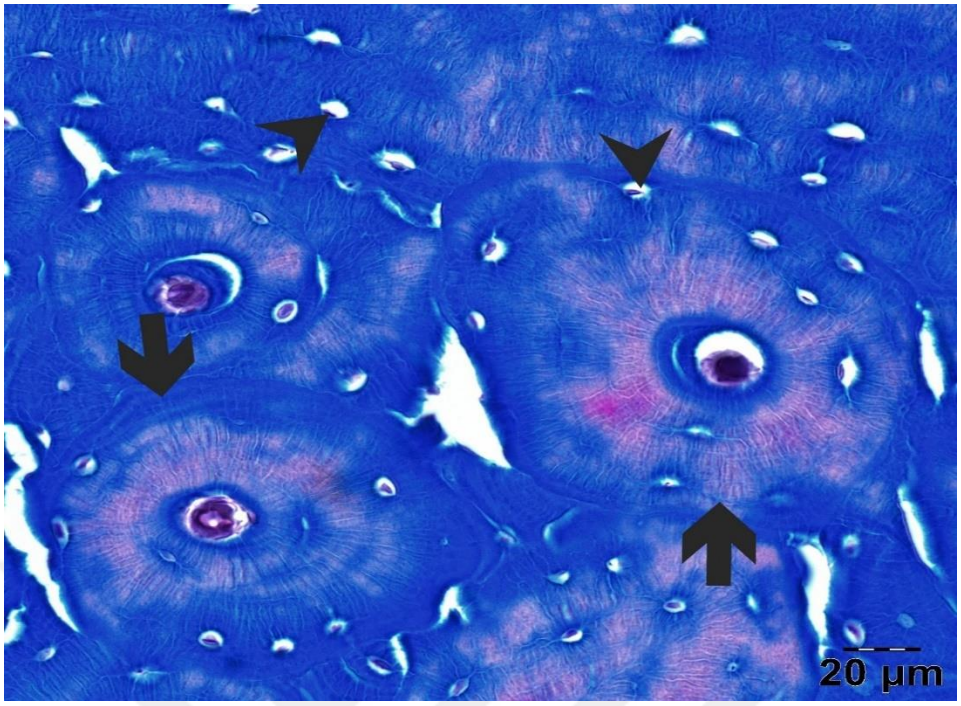
60. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu: Defekt bölgesinde iyileşme sürecinin sona erdiği ve kompakt kemik oluşumunun tamamlandığı görüldü. Diğer gruplara göre belirgin olarak iyileşme bölgesinin daha kalın olduğu belirlendi. Kompakt kemiğin normal kemik dokusunda yer alan Haver's ve Volksman's kanalı, osteosit yapılarını içerdiği gözlendi (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20).



Şekil 4.18. 60. gün Tideglusib+Kalsiyum Sülfat grubu, **kk:** kompakt kemik, **ki:** kemik iliği, **ok:** Havers kanalı, H&E x4.



Şekil 4.19. 60. gün Tideglusib + Kalsiyum Sülfat grubu, **kk:** kompakt kemik, **ki: ok:** Havers kanalı, **ok başı:** osteosit, Masson's Trichrome x4.



Şekil 4.20. 60. gün Tideglusib + Kalsiyum Sülfat grubu, **ok:** Havers kanalı, **ok başı:** osteosit, Masson's Trichrome x40.

Greft uygulanan defekt bölgesinin 30. ve 60. günlere ait dokularının mikroskobik incelemesinde iyileşen defekt bölgesi kalınlıklarına ait rakamsal ölçüm değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Defektlerde oluşan kemik iyileşmesinin modifiye histolojik skorlama kriterlerine (209) göre 30. ve 60. günlerdeki değerlendirmeleri Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.2. 30. ve 60. gün iyileşen defekt bölgesinin rakamsal ölçüm değerleri.

Hayvanlar	**30. Gün Gruplar**			
	Kontrol (sol)	**Tideglusib+ Kalsiyum Sülfat (sol)**	**Kalsiyum Sülfat (sağ)**	**Tideglusib (sağ)**
1	63,75 µm	996,71 µm	331,42 µm	365,34 µm
2	59,66 µm	1034,56 µm	286,92 µm	436,84 µm
3	71,94 µm	1068,38 µm	303,21 µm	643,04 µm
4	53,36 µm	750,69 µm	269,54 µm	509,24 µm
5	72,41 µm	707,06 µm	286,73 µm	654,99 µm
6	69,58 µm	869,62 µm	315,34 µm	458,52 µm
7	51,72 µm	986,35 µm	270,83 µm	473,48 µm
8	47,99 µm	1126.97 µm	233,58 µm	388,74 µm
Hayvanlar	**60. Gün Gruplar**			
	Kontrol (sol)	**Tideglusib+ Kalsiyum Sülfat (sol)**	**Kalsiyum Sülfat (sağ)**	**Tideglusib (sağ)**
1	924,64 µm	1316,36 µm	1027,35 µm	1152,28 µm
2	739,08 µm	1220,13 µm	1122,86 µm	1175,21 µm
3	875,39 µm	1113,49 µm	1074,23 µm	1020,54 µm
4	921,18 µm	1431,70 µm	1148,74 µm	1056,89 µm
5	923,64 µm	1199,63 µm	1098,32 µm	1107,38 µm
6	854,72 µm	1196,77 µm	1066,90 µm	1039,74 µm
7	796,45 µm	1379,86 µm	1128,91 µm	1154,32 µm
8	873,26 µm	1475,92 µm	1096,71 µm	1098,72 µm

Tablo 4.3. Modifiye histolojik skorlama kriterlerine (209) göre defektlerin 30. ve 60. günlerdeki değerlendirmeleri.

Gün	n	Kontrol	Tideglusib+ Kalsiyum Sülfat	Kalsiyum Sülfat	Tideglusib	P
30.gün	8	61.70±9.60[c]	991.53±151.53[a]	286.82±30.37[b]	466± 107.49[b]	,000
60.gün	8	874.32±66.5[c]	1268.24±128.88[a]	1097.51±38.95[b]	1103.05±57.56[b]	,000
P		,001	,001	,001	,001	

[a, b, c] Aynı satırdaki gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir.

5. TARTIŞMA

Kemik defektleri, canlı yaşamını olumsuz etkileyen ve klinisyenlerin sağaltımda zorlandığı günümüzde çok önemli yer tutan problemlerinden biridir (3). Hasarlı kemik dokusunun iyileştirilmesi için kullanılan sağaltım yöntemlerinden birisi de kemik grefti uygulamasıdır (3, 98). Kemik greftleri, kırık, kistik ve patolojik durumlar sonucu meydana gelen kemik defektlerinin iyileştirilmesini hızlandırmak, kemikteki maddi hasarlı kayıpların onarılması, doğmasal olarak meydana gelen kemik doku problemlerinin iyileştirilmesi ve geniş defektlerin sağaltımı amacıyla kemiğin kendini rejenere ederek yeniden modellemesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (210, 211). Çeşitli nedenlerle anatomik doku bütünlüğü bozulan kemik dokuda iyileştirmeyi hızlandırmak ve kemiği güçlendirmek amacıyla birçok greft materyali ile biyouyumlu alternatif materyaller geliştirilerek bu konu üzerinde çalışmalar devam etmektedir (46, 151).

Günümüzde yaygın olarak değişik özellikte greft materyalleri klinik olarak kullanım alanına girmesine rağmen greft materyallerinden beklenen özellikleri tek başına taşıyan greft materyallerine henüz ulaşılamamış ve bu sahada çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Kalsiyum sülfat, alloplastik greft olup diğer alloplastik greftlere göre birçok avantajı bulunan bir materyaldir. Kalsiyum sülfat biyouyumlu, osteokondüktif, biyodegradasyon özellikte ve oda sıcaklığında işlenebilmektedir (214). Ayrıca greft olarak kullanıldığı zaman osteokondüktif kristalize yapısı sayesinde kemikteki kılcal damarlar ve perivasküler mezenkimal dokular kolayca invaze olabilirler. Hızlıca sertleşerek rezorbe olabilen kalsiyum sülfat bariyer membran görevi görerek atık epitel ve konjonktif hücrelerin greft materyali içerisine girmesine engel olabilirler. Bağ doku hücrelerinin çoğalmasına izin verir ve greft sahasında yumuşak dokuların hızla iyileşmesine katkı sağlarlar (215, 216). Kalsiyum sülfat, kemik doku ile ilgili hastalıklarda lokal antiyotikler veya büyüme faktörlerini içeren ilaçlarla birlikte rahatlıkla kullanılabildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (167, 217-219).

Tideglusib, GSK-3ß 'nın geri dönüşümsüz inhibitörü olan thiazolidinediodine ailesinin bir üyesidir. Bu ilaç GSK-3ß 'yı inhibi ederek WNT/ß Katenin yolağını aktive ederek kemik rejenerasyonuna katkı sağlamaktadır (204, 213). Tideglusibin otojen ve ksenojen greftler ile kombine edilerek osteogenezis üzerine etkinliğinin incelendiği bazı çalışmalar literatürlerde rapor edilmiştir (20, 212, 213). Çalışmamızda kalsiyum sülfat ile alzheimer ilacı olan tideglusib birlikte kullanılmıştır.

Yapılan çalışmada kemik grefti kullanımının zorunlu olduğu durumlarda greft seçimine yardımcı olmak, alternatif ilaç ile kemik grefti kombinasyonun kemik iyileşmesi üzerine etkinliğini araştırmak ve bu konuda gerçekleştirilecek çalışmalar için araştırmacılara yardımcı bir kaynak oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla tideglusib ve kalsiyum sülfat uygulamalarının gerçekleştirilmesi ve kemik rejenerasyonuna sağladıkları yarar klinik, radyolojik ve histolojik karşılaştırmalarının yapılması amaçlanmıştır.

Kemik iyileşmesinin klinik, histolojik ve radyolojik açıdan değerlendirildiği birçok çalışmada köpek, tavşan, domuz, koyun, kedi ve sıçan gibi deney hayvanları kullanılmaktadır (220, 221). Tavşanların deney hayvanı olarak kullanıldığı kemik iyileşmesi çalışmalarında izlenen fibröz ve kıkırdak dokular, kemik adacıkları, kapiller ve arteriyollerin insanlardaki mekanizması ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği klinik uygulamalar sonucu bildirilmiştir (222, 223). Kemik greftlerin tek başına ve kombine olarak kullanıldığı çalışmalarda tavşan modelinin tercih edildiği literatür verileri mevcuttur (224, 225). Mevcut çalışmada da deney hayvanı olarak tavşan kullanılması uygun görülmüştür.

Tibiada kemik defektleri oluşturularak yapılan çalışmalarda defektlerin 0.5-8 mm arasında olmasının ideal olduğu 4 mm ve üzeri defektlerin kırık oluşumlarına sebebiyet verilebileceği çalışmalarda rapor edilmiştir (5, 75). Bu çalışmada tavşanların her iki tibia kemiğinde ikişer adet 3.5 mm'lik unikortikal defektler oluşturulmuştur. Çalışma süresince herhangi bir kırık olgusu ile karşılaşılmamış olup, defekt boyutunun bu tür çalışmalar için uygun olduğu görülmüştür.

Greft materyalleri macun, granül, partikül ve toz formlarında olabilmektedir. Bu materyallerin uygulamalarında defekt alanlarında tutunma ve defekt şekline kolaylıkla uyum sağlaması istenilen özelliklerdir (30, 91, 94). Çalışmamızda kullanılan greft materyallerinden tideglusib granül, kalsiyum sülfat ise ince alçıtaşı tozu formundadır. Her iki materyalin operasyon süresi boyunca oluşturulan defekt alanlarına kolaylıkla yerleştiği, defekt alanının şeklini aldığı ve defekt alanındaki lokal kan ile etkileşime girerek defekt alanında tutunduğu gözlenmiştir. Greft uygulamasından sonra operasyon bölgesinin kas, fasia, deri altı bağ doku ve derinin greft materyali üzerine sağlam bir şekilde örtmesini sağlayacak basit ayrı dikişler ile kapatılmasının greftlerin defekt alanında kalmalarına yardımcı olduğu gözlenmiştir.

Bazı kaynaklarda (4, 8, 21, 92) bildirilen ve greft uygulamaları sonrası çoğunlukla gözlenen immun yanıt oluşma, doku reddi, postoperatif ölümler ve

toksikasyon gibi komplikasyonlar mevcut çalışmada, gözlenmemiş operasyon sonrası yaraların iyileşmesi süresince herhangi bir enfeksiyon ve komplikasyon ile karşılaşılmamıştır.

Kalsiyum sülfat ile yapılan bir çalışmada 14. ve 28. günlerde yabancı cisim reaksiyonu oluşturma yönünden incelenmiş ve istatiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmamıştır ($p>0.05$) (226). Oncu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise tideglusib kemik dokuya farklı dozlarda verilerek sitotoksisite yönünden değerlendirilmiş olup herhangi bir komplikasyon ile karşılaşılmadığı ifade edilmektedir (206). Sunulan bu çalışmada histopatolojik yapılan muayenelerde her iki greftin dokuya uyum sağladığı ve rezorbe olduğu görülmüştür.

Kemik iyileşmesinin araştırılması amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda tideglusib tek başına veya çeşitli greftler ile kombine edilerek incelenmiştir. Ratlarda yapılan bir çalışmada kalvaryal kemik üzerinde 5 mm çapında defekt oluşturulup tideglusib, otogreft ve jelatin sünger ile kombine edilmiştir. Koni ışınlı bilgisayarlı tomografi ile görüntüleme yapılarak her iki materyal ile kombine edilen tideglusibin kontrol grubuna göre iyileşmenin daha iyi olduğu ve istatistik açıdan önemli olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$). Aynı çalışmada kalvarial kemik defektlerinde tideglusib uygulamasının apoptozisi azaltarak ve osteoklastogenezi artırarak kemik mineral yoğunluğunu ve yeni kemik alanlarını arttırdığı rapor edilmektedir (228). İyilikçi ve ark. (21) tarafından kalvaryal kemikteki defektlerin iyileşmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada ksenogreft ve otogreftin tek başlarına veya tideglusib ile kombine edilerek kullanılmış, çalışma sonucunda incelenen tüm parametrelerde greftlerle birlikte tideglusib kullanılan gruplarda yeni kemik oluşumunda ciddi oranda bir artış olduğu ve tideglusibin greftlerin etkisini sinerjistik bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir. Comeau-Gauthier ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada tideglusib tek başına kullanılarak femur kemiğinde kortikal defekt üzerindeki etkinliği araştırılmış ve 7, 14 ve 28 günlük postoperatif değerlendirmeler yapılmış olup, 28. gündeki mikro bilgisayarlı tomografi ile değerlendirmelerde tideglusibin kontrol grubuna göre kemik iyileşmesini arttırdığı ve istatistik olarak anlamlı olduğu ifade edilmektedir ($p=0.04$) (227). Mevcut çalışmamızda tibia kemiğinde oluşturulan defekte tideglusibin tek başına kullanıldığı grupta radyografik değerlendirmede iyileşme üzerine etkinliğinin daha fazla olduğu gözlenmiş olup 30. 45. ve 60. Günlerde yapılan radyografik değerlendirmelerde, defektlerin yeni kemik olşumu ile doldurulması sırasıyla %50, %50-75 ve %75 olarak

gözlenmiştir. Radyoloijk olarak tideglusibin 30. ve 60. günde kemik iyileşmesine olumlu katkıları olduğu istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

Kalsiyum sülfat, özellikle son yıllarda kemik doku rejenerasyonlarında bariyer membran özelliği ile dikkati çeken, kemik ve dentin dokunun hem enfektif hemde enfektif olmayan olgularında güvenle kullanılmaktadır. Kalsiyum sülfat günümüzde kemik iyileşmesi amacıyla çeşitli greftlerle ve alternatif greft materyali ilaçlarla kombine edilebilmektedir (13, 162, 166, 167). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada tibia kemiğinde 1 cm'lik osteotomi operasyonu uygulanarak kalsiyum sülfat kitin yapılı bir madde olan kitosan ile ayrı ayrı ve kombine edilerek 2. 4. ve 6. haftalarda kemik iyileşmesi değerlendirilmiş ve radyografik olarak değerlendirilen bu çalışmada kemikteki kortikalizasyonun 6. haftada halen devam ettiği kalsiyum sülfat grubunun kitosan grubundan daha iyi olduğu ancak ikisinin kombine edildiği gruptaki iyileşmenin her iki gruptan daha iyi olduğu rapor edilmektedir (229).

Meng ve ark tarafından yapılan bir çalışmada tavşan radius kemiğinde 15 mm büyüklüğünde büyük defektler oluşturularak, polimetilmetakrilat adı verilen kemik çimentosunun kullanıldığı otolog kansellöz kemik grefti ile kalsiyum sülfatın kemik doku üzerine rejenerasyon etkinliği araştırılmış ve radyografik, spiral bilgisayarlı tomografi incelemeleri 4. 8. ve 12. haftalarda yapılarak Sandhu skorlama tekniği ile değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucu otolog kansellöz kemik grefti ve kalsiyum sülfatın kombine edildiği gruptaki defekt alanının 8. haftada %100 iyileşme gözlendiği bildirilmektedir (230). Clokie ve ark. tarafından deneysel olarak yapılan bir çalışmada kalvaryal kemikteki kritik boyutlu defektlerde kalsiyum sülfat ve demineralize kemik matriksinin 6. ve 12. haftalarda iyileşmesi üzerine etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda demineralize kemik matriksinin kalsiyum sülfattan daha etkili olduğu radyografik olarak 6. haftada defekt alanın %88.2'sinin 12. haftada ise %95.5'inin kapandığı bildirilmektedir (168). Sunulan çalışmada ise kalsiyum sülfat 30. 45. ve 60. günlerde alınan radyografilerde defekt alanlarında sırasıyla %50, %50-75, %75 oranlarında iyileşme göstermiştir. İstatistik değerlendirmelerin yapıldığı 30. ve 60. günlerde tideglusib ve kalsiyum sülfat arasında önemli bir fark görülmemiş ancak rakamsal olarak tideglusibin (2.56± 0.62, 3.37± 0.23) kemik iyileşmesinde kalsiyum sülfattan (2.37± 0.51, 3.12± 0.23) daha etkili olduğu olduğu gözlenmiştir.

Kalsiyum sülfatın kronik osteomyelitisin sebebiyet verdiği olgularda kullanıldığı bir çalışmada (174) kalsiyum sülfatın vankomisin ve kalsiyum fosfat ile kombinasyonları kullanılarak defektlerin iyileşmeleri değerlendirilmiştir. Kalsiyum

sülfat, vankomisin ve kalsiyum fosfat kombinasyonu grubunda 1, 3 ve 6. aylarda radyografik değerlendirmede ortalama yeni kemik oluşum yüzdesinin sırasıyla %20.5, %43.7, %75.2 ve sadece kalsiyum sülfatın kullanıldığı grupta 1., 3. ve 6. aylarda %15.4, %32.2, %49.7 olduğu bildirilmektedir (1. ayda P=0.001, 3. ayda P=0.025, 6. ayda P=0.000). Zhao ve ark. (231) tarafından yapılan bir çalışmada insanlarda büyük enfekte kemik defektlerinde kalsiyum sülfat ile otojen greft ve vankomisin kombinasyonun uzun süreli takibinde radyografik değerlendirmede tüm defektlerin tamamen iyileştiği rapor edilmektedir ($p<0.001$).

Yapılan başka bir çalışmada (232) ise laminektomi operasyonu sonrası kemik iliği aspirasyonu tekniği ile alınan kemik iliği tek başına ve kalsiyum sülfat ile kombine edilerek kullanılmıştır. Çalışma sonucunda füzyon testleri kalsiyum sülfat ve kemik iliği kombinasyonun diğer gruplara göre daha etkili olduğu ($p<0.05$) ve 3 aylık radyografik kontrollerinde 19 olguda %90.5 oranında defekt alanında füzyonun gerçekleştiği bildirmektedir.

Jiang ve ark rat tibiasında 3.5 mm çaplarında defekt oluşturarak kalsiyum sülfatın literatürlerde ağrı kesici, kan sulandırı bir ilaç olarak geçen aspirin ile kombinasyonun defektler üzerine etkisini araştıran bir çalışma gerçekleştirmişlerdir (233). Çalışmada, aspirinin kemik iliği mezenkimal kök hücreleri aktivasyonu sağlayarak osteogenezisi uyardığı bildirilmektedir. Çalışmanın radyografi ve mikro bilgisayarlı tomografi ile değerlendirmeleri 4. ve 12. haftada yapılarak aspirin ile kombine edilen kalsiyum sülfatın kontrol grubuna göre kemik volum/total volum skalasını önemli oranda yükseltiği ve istatistik olarak anlamlı olduğu rapor edilmektedir ($p<0.05$).

Sunulun çalışmada 30. ve 60. günde radyolojik olarak kalsiyum sülfat, tideglusib ve kalsiyum sülfat+tideglusib gruplarının kontrol grubundan anlamlı olarak farklı olduğu ($p=0,00$), kalsiyum sülfat ve tideglusib gruplarında kemik iyileşmesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken rakamsal olarak tideglusibin daha iyi iyileşme gösterdiği belirlenmiştir. Literatürle benzer olarak greft materyali ve alternatif greft materyali olarak kullanılan ilaçların kombine edildiği çalışmalarda (224, 226, 228, 229, 231, 236) diğer gruplara göre iyileşmenin daha iyi olduğu mevcut çalışmada da saptanmıştır. Yapılan çalışmada kalsiyum sülfat+tideglusib grubunun 30, 45 ve 60 günlük radyografik değerlendirmelerinde, defektlerin yeni kemik oluşumu ile doldurulması sırasıyla %50-75, %75-100 ve %100'e yakın olarak gözlenmiştir.

Mevcut çalışmada, kontrol grubunun operasyon sonrası alınan radyografik görüntüleri değerlendirildiğinde bütün olgularda defektler net bir şekilde gözlenmiş, 30. günde çok az bir kemik iyileşmesi gözlenmiş olup defekt alanının %25'inin kapandığı, 45. günde ise kemik iyileşmesinin belirli şekilde artarak defekt alanının %25-50 oranında kapandığı, çalışma sonunda 60. günde ise defekt alanlarının kenarından merkeze doğru küçülerek iyileşmenin gözlendiği ve defekt alanının %50'sinin kapandığı gözlenmiştir.

Kemik defektlerine uygulanan greftlerin iyileştirme kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerden biri histopatolojik muayenelerdir. Kemik hücrelerini, aktivitelerini ve kemik matriksinin doku üzerinde direkt olarak değerlendirilebildiği tek yöntem olup ayrıca kemik dokusunu değerlendirmede altın standart olarak kabul edilmektedir (25, 27). Bu muayene yönteminde farklı hafta ve aylarda takip süreleri bulunmaktadır. Tideglusibin çeşitli greft materyalleri ile etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada histopatolojik incelemeler için örnekler 4. haftada toplandığı belirtilmektedir (228). Kalsiyum sülfatın, alternatif greft materyali sayılan kitosan ile değerlendirildiği çalışmada ise 2, 4, ve 6. haftalarda histopatolojik değerlendirmeler yapılmıştır (229). Kemik dokunun rejenerasyonun 1. ve 2. haftalarda başladığı, 6. ve 8. haftalarda ise defekt alanlarının periferden merkeze doğru küçülerek dolduğu bilinmektedir (234). Sunulan bu çalışmada histopatolojik muayeneler için 30. ve 60. günler uygun görülmüştür.

Histopatolojik incelemeler sonucu kontrol grubunda 30. günde defekt bölgesinin üst kısmında çok az miktarda fibröz bir dokunun olduğu, kıkırdak doku çevresinde küçük adacıklar şeklinde sıralanmış aktif osteoblastların varlığının olması, 60. günde defekt bölgesinde daha baskın olarak trabeküler kemiğin varlığı ile birkaç hayvanda yeni kemik oluşumu ve kıkırdak dokuya ilave olarak daha az miktarda fibröz dokunun da olduğu görüldü. Özellikle defekt uçlarının tam olarak birleşmediği ve küçük adacıklar şeklinde sıralanmış aktif osteoblastların varlığının gözlenmesi daha önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir (21, 46, 168, 226, 229).

Tideglusibin kalvaryal defekt üzerindeki kemik iyileşmesi üzerine etkinliğinin incelendiği bir çalışmada, osteoblastların aktivitesini arttıran kolajen tip 1 ve osteokalsinin tideglusib içeren gruplarda kontrol gruplarına göre anlamlı derecede fazla olduğu rapor edilmektedir ($p<0.05$) (234). Sunulan çalışmada, 30. ve 60. gün histopatolojik incelemelerde tideglusibin tek kullanıldığı defekt alanındaki iyileşmenin kontrol grubundan daha iyi olduğu ($p<0.000$) ve kalsiyum sülfat (286.82±30.37,

1097.51±38.95) grubu ile kıyaslandığında iyileşme oranları arasında istatistik açıdan önemli bir fark olmasa da rakamsal olarak tideglusib grubunda (466± 107.49, 1103.05±57.56) daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bu durum radyolojik bulgulardan elde edilen sonuçlar ile de uyumluluk göstermektedir.

Tideglusibin otogreft ve ksenogreft ile birlikte kullanıldığı iyilikçi ve arkadaşları (21) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada rat kalvaryal kemikte defekt oluşturularak histomorfometrik analizler ile değerlendirme yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda otogreft ile kombine edilen tideglusibin ksenogreft kombinasyonuna göre daha iyi iyileşme gösterdiği, kontrol ve ksenogreft gruplarına kıyasla osteoblast sayısında daha fazla artış sağladığı ($p<0.05$) ve çalışmanın sonuçlarına göre tideglusibin BMP-2 salınımını önemli ölçüde arttırdığı bildirilmektedir. Sunulan çalışmada, tideglusib ile alloplatik bir greft olan kalsiyum sülfat kombinasyonun diğer defekt gruplarına göre daha iyi iyileşme sağladığı 30 günlük histopatolojik incelemede küçük aktif osteoblast adacıklarının olduğu, 60 günlük incelemede ise kompakt kemiğin normal kemik dokusunda yer alan Haver's ve Volksman's kanalı ile osteosit yapılarını içerdiğini gözlenmiştir.

Hing ve ark tarafından yapılan bir çalışmada (235) yeni zelanda tavşanlarının femur eklem yüzeylerinde 4.8 mm osteokondral defektler oluşturarak kalsiyum sülfatın içinde olduğu üç farklı seramik kemik greftinin kemik rejenerasyonu üzerine karşılaştırılması yapılmıştır. Kalsiyum sülfat, trikalsiyum sülfat ve kalsiyum fosfat gruplarını içeren çalışma 1, 3, 6, ve 12. haftalarda histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. 1. haftada yüzeysel fibrokartilanöz yapıların, 3. haftada merkezi alanda yüzeysel fibroz dokunun, 6. haftada olgun kemik dokunun ve sayıca artmış fibröz dokuların varlığı ve 12. Haftada defekt alanın kansellöz olgun kemik ile dolduğu bildirilmiştir. Kalsiyum sülfatı içeren defektlerde kemik dolumunun 3. haftada %80'den fazla, 12. haftada ise tamamen kapandığı rapor edilmektedir. Mevcut çalışmada ,Hing ve arkadaşlarından farklı olarak 30 günlük histopatoloijk incelemelerde kalsiyum sülfat grubunda kısmen rezorbsiyon gözlenirken, 60 günlük incelemelerde ise tama yakın rezorbsiyona uğradığı gözlenmiştir. Bu farklılığın oluşmasında, defekt çapları, hayvan yaşı ve eklem yüzeyi bölgesindeki hücre yapıları sebebiyet verdiği düşünülmektedir.

Kalsiyum sülfatın alternatif greft materyali ile kombinasyonunu içeren bir çalışmada (236) hiperlipidemi tedavisinde kullanılan ilaçlardan biri olan simvastatin ile inorganik sığır kemik grefti, hidroksiapatit ve kollajen sünger kullanılmıştır. Çalışmada tavşan femurlarında defektler oluşturularak 4 ve 8. haftalarda histopatolojik olarak

değerlendirilmiştir. Yeni kemik oluşumu 4. haftada sığır inorganik kemik grefti+kalsiyum sülfat grubunda yüksek iken 8. haftada simvastatin+kalsiyum sülfat grubunda yüksek bildirilmektedir. Çalışma sonucunda kolesterol tedavisinde kullanılan bir ilaç olan simvastatinin kemik defektlerinde lokal olarak güvenle kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Yang ve ark tarafından yapılan başka bir çalışmada (237) kalsiyum sülfat, tavşanlarda unilateral femur kondiler defektler oluşturarak poli amino asit (PAA) adı verilen kanser tedavisinde bağışıklık sistemini desteklemek amacıyla kullanılan bir ilaç ile kombine edilerek 4, 8, 12 ve 16. haftalarda histolojik çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Çalışmada western blot tekniği ile değerlendirme sonucunda KS+PAA grubunun kontrol grubuna göre BMP-2 ve VEGF oluşumlarını önemli ölçüde arttırarak kemikleşmenin ve kemik iliği oluşmasına katkı sağladığı bildirilmiştir.

Mevcut çalışmamızda, kalsiyum sülfat + tideglusib grubunun oluşturduğu defekt alanındaki yeni kemik oluşumu yönünden iyileşmenin histopatolojik değerlendirilmesinde diğer gruplara göre daha iyi olduğu gözlenmiş, 30. günde yapılan değerlendirmede defekt bölgesinin nerdeyse tama yakın oranda kapandığı ve kompakt kemiğe doğru yeni kemik oluşumlarının oluştuğu alanlarda Haver's kanallarının kısmen şekillenmeye başladığı ($p<0.001$), 60. günde ise defekt bölgesinde iyileşme sürecinin sona erdiği ve kompakt kemik oluşumunun tamamlandığı gözlendi ($p<0.001$).

Sunulan bu çalışmada 30. ve 60. günlerde elde edilen radyolojik ve histolojik bulgularda grupların kendi içlerinde yapılan karşılaştırmalardaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Radyolojik bulguların önemliliği kontrol, kalsiyum sülfat+tideglusib, kalsiyum sülfat ve tideglusib gruplarında sırasıyla $p<0.001$, $p<0.002$, $p<0.005$ ve $p<0.004$ olarak belirlenmiştir. Histolojik bulgulardan elde edilen verilen önemi ise kontrol, kalsiyum sülfat+tideglusib, kalsiyum sülfat ve tideglusib gruplarında $p<0.001$ olarak saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, elde edilen bulgular ve literatür verilerinin değerlendirilmesi yapıldığında, kemik defektlerinin onarım süresini hızlandırarak iş gücü, zaman ve ekonomik kayıpların en aza düşürülmesi amacıyla tideglusibin tek başına veya kemik greftleri ile kombine edilerek kemik defektlerinin onarımında kullanılabilecek güvenli bir alternatif greft materyali olduğu kanısına varılmıştır. Tideglusibin kemik oluşumu üzerine etki mekanizmasını değerlendirmek amacıyla daha çok in vivo çalışma yapılması kemik iyileşmesine olan katkılarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı düşüncesi ile mevcut çalışmanın daha sonra yapılacak çalışmalar için araştırmacılara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone Grafting, Orthopaedic Biomaterials, and The Clinical Need for Bone Engineering. Journal of Engineering in Medicine 2010; 224: 1329-43.
2. Shapino F. Bone Development and its Relation to Fracture Repair. The Role of Mesenchymal Osteoblasts and Surface Osteoblasts. European Cells and Materials 2008; 15: 53-76.
3. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tisue Engineering: Recent Advantages Challenges. Critical Reviews in Biomedical Engineering 2012; 40 (5): 363-408.
4. Can HN. Tavşanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerinde Değişik Greft Materyalleri ve Trombositten Zengin Fibrinin Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elâzığ; 2013.
5. Durmuş AS, Çeribaşı AO, Can HN. Koral ve demineralize kemik matriksinin kemik iyileşmesi üzerine etkileri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi 2016; 30(2): 131-6.
6. Bulut S, Durmuş AS, Köm M, Çobanoğlu B. Köpeklerde femur ve tibia diyafizinin deneysel maddi kayıplı kırıklarında ulna distalinin segmental kortikal otogref olarak kullanımı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2001; 7(1): 77-85.
7. Kawcak CE, Trotter GW, Power BE, Park RD, Turner AS. Comparison of Bone Healing Demineralized Bone Matrix and Autogenous Cancellous Bone in Horses. Veterinary Surgery 2000; 29: 218-26.
8. Taşkaldıran A. Trombositten Zengin Plazma ve Trombositten Zengin Fibrin Yapılarının Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Hayvan Modelinde Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2013.
9. Laurencin CT, Freeman JW. Ligament Tissue Engineering: An Evolutionary Materials Science Approach. Biomaterials 2005; 26: 7530-6.
10. Nolff MC, Gellrich NC, Hauschild G, Fehr K, Bormann KH, Rohn K et al. Comparison of Two B-Tricalcium Phosphate Composite Grafts Used for Reconstruction of Mandibular Critical Size Bone Defects. Vet Comp Orthop Traumatol 2009; 22: 96–102.

11. Vertenten G, Gasthuys F, Cornelissen M, Schacht E, Vlaminck L. 2010. Enhancing Bone Healing and Regeneration: Present and Future Perspectives in Veterinary Orthopaedics. Vet Comp Orthop Traumatol 2010; 23: 153–162.
12. Moghadam HG, Sandor GK, Holmes HH, Clokie CM. Histomorphometric Evaluation of Bone Regeneration Using Allogeneic and Alloplastic Bone Substitutes. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62: 202-13.
13. Szponder T, Mytnik E, Jaegermann Z. Use of Calcıum Sulfate As A Biomaterial in The Treatment of Bone Fractures in Rabbits- Preliminary Studies. Bull Vet Inst Pulawy 2013; 57: 119-122.
14. Audisio SA, Vaquero PG, Torres PA, Verna EC, Ocampo LN et al. Radiological Evaluation of Radial Bone Defects Treated With Demineralized Bone Matrix in an Experimental Rabbit Model. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 2015; 18(2): 132-9.
15. Köse İ. Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Sentetik Kemik Greftleri ile Kalsiyum Kanal Blokerleri ve β-2 Reseptör Antagonistlerinin Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diyarbakır 2012.
16. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi 2004; (3): 3-4.
17. Martinez A, Gi C, Perez DI. Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors in the next horizon for Alzheimer's disease treatment. Res Int J Alzheimer's Dis 2011.
18. Tolosa E, Litvan I, Hoglinger GU, Burn D, Lees A, Andres MV, et al. Investigators T. A Phase 2 Trial of The GSK-3 İnhibitor Tideglusib in Progressive Supranuclear Palsy. Mov Disord 2014; 29(4): 470-8.
19. Neves VCM, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. 2017. Promotion of Natural Tooth Repair by Small Molecule GSK3 Antagonists. Sci Rep 2017; (7): 1–7.
20. Duan P, Bonewald LF. The Role of the Wnt/B-Catenin Signaling Pathway in Formation and Maintenance of Bone and Teeth. Int J Biochem Cell Biol 2016; (77): 23-9.
21. İyilikci B. Tideglusib ile Karıştırılan Kemik Greftin Yeni Kemik Oluşumu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. Uzmalık Tezi. Pamukkale Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2020.

22. Gual-Vaqués P, Polis-Yanes C, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Marí-Roig A, López-López J. Autogenous Teeth Used for Bone Grafting: A Systematic Review. Med Oral Patol Oral y Cir Bucal 2018; 23(1): 112-9.
23. Mehrara BJ, McCarty JG. Repair and Grafting of Bone. In: Mathes SJ, ed. Plastic Surgery 2th ed, Vol. 1. Philedelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 639-718.
24. Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology. Temel Histoloji, Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 2006. p. 141-159.
25. Junueira LC. Junqueira's Basic Histology. 12th edition. 2010; Chapter 8 (Bone).
26. Doblare M, Garcia JM, Gomez MJ. Modelling Bone Tissue Fracture Healing: A Review. Engineering Fracture Mechanics 2004; 71: 1809-40.
27. Leslie PG, James L. Hiatt: Color textbook of Histology. 2th edition, W.B Saunders company; 2001. p. 129-155.
28. Wang X. Fundamental Biomechanics in Bone Tissue Engineering Synthesis Lectures on Tissue Engineering 4th ed. Morgan & Claypool Publishers; 2010.
29. Garg A. Bone Biology. Harvesting and Grafting for Dental Implants. Chigago: Quintessence Publishing Co; 2004.
30. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic Applications of Bone Graft & Graft Substitutes: A Review. Indian J Med Res 2010; 132: 15-30.
31. Martin RB, Burr DB. Mechanical adaptation in Structure Function and Adaptation of Compact Bone. New York: Raven Press; 1989.
32. Şirin Y. Kemik Defektlerine yerleştirilen farklı tipteki yapay kaynaklı kemik greft materyallerinin kemikleşmesinde hiperbarik oksijen uygulamasının etkilerinin incelenmesi. İÜ. Diş hekimliği Fak; 2005.
33. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of Histology. Philadelphia:Saunders: Elsevier; 2001.
34. Çankaya AB. Deneysel Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinde Sıvı Nitrojen ve Karbondioksit Gazı Uygulamasının Kemik İyileşmesi Üzerine Olan Etkilerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi. İÜ. Dişhekimliği Fak.; 2006.
35. Bruce MR, Burr DB, Sharkey NA. Skeletal Tissues Mechanics. New York: Springer; 1998.
36. Özer A. Temel Histoloji. 1.Baskı. Dora Basım Yayın Dağıtım; 2021.
37. Junqueira LC. Basic Histology Text & Atlas. Vol. Chapter 8. New York: The McGraw-Hill Co; 2007.

38. Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh JL. Bone and joint healing. In: Bucholz RW, Heckman JD (Ed). Fractures in Adults. Vol 1. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Co; 2001. p. 245-271.
39. Aydın BK. Pentoksifilin Kullanımının Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisinin Ratlarda İncelenmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Baltalimanı Metin Sabancı Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği. Uzmanlık Tezi. İstanbul: 2007; 2-36.
40. Junqueira LC, Carneiro J. Kemik İçinde: Temel Histoloji. Yener Aytekin, Seyhun Solakoğlu Editörler. 10. Baskı. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2006. p. 135-145.
41. Çay HF, Sezer N. Kemik Yapısı ve Kemik Döngüsü Üzerine Bir Derleme. Fiziksel Tıp 2002; 5(3): 177-184.
42. Desai B, Rogers ML, Chellaiah MA. Mechanisms of Osteopontin And CD44 as Metastatic Principles in Prostate Cancer Cells. Molecular Cancer 2007; 6(18): 1-16.
43. Gordjestani M, Dermaut L, De Ridder L, Thierens H, De Waele P, De Willy W et al. Osteopontin. and Bone Metabolism: A Histology and Scintigraphy Study in Rats. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 2005; 34(7): 794-9.
44. Gehron-Robey P, Boskey AL. The biochemistry of bone in Osteoporosis. Marcus E, Feldman D, Kelsey J. Eds. Academic Press. chap 4. San Diego; 1996.
45. Guyton AC, Hall JE.Tıbbi Fizyoloji. Nobel. 1996; (9): 901-2.
46. Efeoğlu C. Kemik Defektlerinde Otojen Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trikalsiyum Fosfat Uygulaması Deneysel Çalışma. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İzmir: 2003.
47. Schenk RK. Biology of fracture repair. In: Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG (Editors). Skeletal Trauma. Vol 1. 3rd Edition, Philadelphia: Saunders Co 2003:29-73.
48. Cowin SC. Bone Mechanics Handbook. Section 1. 2nd Edition, Boca, Raton, London, New York, Washington: CRC Pres 2001: 1-68.
49. Ozaki A. Role of Fracture Hematoma And Periosteum During Fracture Healing in Rats. Interaction of Fracture Hematoma And The Periosteum in The İnitial Step of The Healing Process. J Orthop Sci 2000; 5: 64-70.
50. Lian JB, Stein GS, Canalis E, Gehron-Robey P, Boskey AL. Bone formation: Osteoblast Lineage Cells, Growth Factors, Matrix Proteins And The Mineralization Process, in Primer on The Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral

Metabolism. 4th ed. Favus M. 1. chap. 3. Ed. Lippincotti Williams & Wilkins, Philadelphia; 1999. p. 79-86.

51. Korkusuz F, Korkusuz P, Özkul A. Identification of Substance P Receptors On Fibroblast-Like Cells Derived From The Periosteum: An in Vitro Cell Culture Study. Eklem Hastalık Cerrahisi 2006; 17: 94-100.
52. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R (Çeviren). 1. Baskı. Palme Yayıncılık. Ankara: 2006.
53. Sağlam M, Aştı RN, Özer A. Genel Histoloji. 6. Baskı. Yorum Matbaacılık. Ankara: 2001.
54. Boyne PJ. Tissue Transplantations. in: Textbook of Oral and Maxillofacial Surgery. Kruger GO. (ed) 6th ed. CV Moosby Cc. St.Louis: 1984. p. 296 - 332.
55. Iain H, Kalfas MD. F.A.C.S. Neurosurg Focus 2001; 10(4): Article 1.
56. Ogino Y, Ayukawa Y, Kukita T, Koyano K. The Contribution of Plateletderived Growth Factor, Transforming Growth Factor-B1, And İnsulin-Like Growth Factor-I in Platelet-Rich Plasma to The Proliferation of Osteoblast-Like Cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 724- 9.
57. Recker RR. Embryology. Anatomy and Microstructure of Bone. In Coe FI, Favus MJ. eds. Disorders of Bone and Mineral Metabolism. New York: Roven; 1992. p. 219-240.
58. Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Cowin SC (ed). Bone Mechanics Handbook. 2 th ed. CRC Press, Florida; 2001. p. 1- 68.
59. Leung MC, Ng GY, Yip KK. Effect of Ultrasound on Acute İnflammation of Transected Medial Collateral Ligaments. Arch Phys Med Rehabil 2004; 85: 963-6.
60. Themistocleous GS, Katopodis H, Sourla A, Lembessis P, Doillon CJ, Soucacos PN et al. Three-Dimensional Type I Collagen Cell Culture Systems for The Study of Bone Pathophysiology. In Vivo 2004: 18; 687-696.
61. Gehron-Robey P, Boskey AL. The Biochemistry of Bone, in Osteoporosis. Marcus E, Feldman D, Kelsey J, Eds. Academic Pres. chap.4. San Diego; 1996. p. 74-8.
62. Gorski JP. Is all bone the same? Distinctive Distributions and Properties of Non-Collagenous Matrix Proteins in Lamellar vs. Woven Bone İmply The Existence of Different Underlying Osteogenic Mechanisms. Crit Rev Oral Biol Med 1998; 9: 201-23.
63. Lian JB, Stein GS. Osteoblast Biology, in Osteoporosis. Marcus R, Feldman D, Kelsey I, Ed. Academic Press. chap. 2. San Diego; 1996. p. 23-7.

64. Lian JB, Stein GS, Canalis E, Gehron-Robey P, Boskey AL. Bone formation: Osteoblast Lineage Cells, Growth Factors, Matrix Proteins And The Mineralization Process, in Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 4th ed. Favus, M. 1. Ed. Lippincotti Williams & Wilkins. chap. 3. Philadelphia; 1999. p. 79-86.
65. Escarot-Charrier B, Glorieux FH, Vanderrest M, Pereira G. Osteoblasts İsolated From Mouse Calvaria İnitiate Matrix Mineralization in Culture. J Cell Biol 1983; 96: 639.
66. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiler EG. Investigation of Platelet-Rich Plasma in Rabbit Cranial Defects: A Pilot Study. J. Oral Maxillofac. Surg. 2002; 60 (10): 1176–81
67. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Quintessence Publishing Co. Coral Stream. Illionis Chapter 2. Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy; 1999. p. 17-55.
68. Puzas FJ, Lewis GD. Biology of Osteoclasts and Osteoblasts in Orthopaedics. In: Bronner F, Worrell RV. Ed. Principles of Basic and Clinical Science. Chapter 3. Boca Raton: CRC Press; 1999.
69. Rodan GA. Introduction to Bone Biology. Bone 1992; 13(1): 3-6, 1992.
70. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas With Correlated and Cell Molecular Biology. Fifth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Amerika; 2006.
71. Bul Ö. Kemik İliği Kökenli Osteoblastik Liyofilizatın Kemik Hasarlarında Kullanılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitü Müdürlüğü. Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara: 2011.
72. Durmuş AS. Köpeklerde Deneysel Maddi Kayıplı Femur Kırıklarında Koral ve Spongiyöz Otogreft Uygulamalarının Karşılaştırılması. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı. Elazığ: 2000.
73. Kafkas İH. Kemik İyileşmesinin Temelleri. Neurosurgical Focus 2001: vol 10.
74. Kocaelli HA. Korona Stimülasyonunun Ağız Cerrahisi Girişimlerinde İyileşme Sürecinin Etkisinin Deneysel Araştırılması. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul: 2000. p. 88.
75. Miclau III T, Bozic KJ, Tay B, Kim HT, Colnot C, Puttlitz CM, et al. Bone injury, regeneration and repair. In: Einhorn TA, O'Keefe RJ, Buckwalter JA, editors. 3rd ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2007. p. 331-48.

76. Brinker MR, O'Conner DP. Basic sciences. In: miller MD, editor. Review of orthopaedics. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p. 1-132.
77. Peterson LJ, Ellis III E. Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery: Surgical Reconstruction of Defects of the Jaws. chapter 28. 3rd ed. Mosby. USA: 1998.
78. Lindhe O, Brandt I, Christiansen JS, Ingebrigtsen K. Irreversible Binding of o,p'-DDD in İnterrenal Cells of Atlantic Cod (Gadus morhua). Chemosphere 2003; 50(9): 1249-53.
79. Marsell R, Einhorn TA. The Biology of Fracture Healing. Int. J. Care Injured 2011; 42: 551-5.
80. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL. Fracture Healing as A Post-Natal Developmental Process: Moleculer, Spatial and Temporal Aspects of İts Regulation. J Cell Biochem 2003; 88(5): 873-84.
81. Hall BK, Miyake T. Divide, Accumulate, Differentiate: Cell Condensation in Skeletal Development Revisited. The International Journal of Developmental Biology 1995; 39: 881-93.
82. Altunatmaz K. Kırık İyileşmesinin Biyolojisi ve Biyolojik Osteosentez. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2004; 30: 141-7.
83. Kılıçoğlu S. Serin: Mikroskobi Düzeyinde Kırık İyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2002; 55(2).
84. Brand RA, Rubin CT. Fracture Healing. In: Evants CMcM. Surgery of the Musculosketal System. 2th Edition, New York: Churchill-Livingstone: 1990. p. 93-114.
85. Khan SN. Bone Growth Factors: Orthop. Clin. North Am. 2000; 31(3): 375 88.
86. Frost HM. Skeletal Structural Adaptations to Mechanical Usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's Law: The Remodeling Problem. Anat Rec 1990; 226: 414-22.
87. Cruess RL. Healing of Bone, Tendon and Ligament. Fractures 2nd Edition. Lippincott Co. Philadelphia: 1984. p. 147-67.
88. Darwish AH. Zeolit ve Trombositten Zengin Plazma (TZP) Uygulamasının Deneysel Kemik Defektleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul: 2011.
89. Isogai Y, Akatsu T, Ishizuya T, Yamaguchi A, Hori M, Takahashi N, et al. Parathyroid Hormone Regulates Osteoblast Differentation Positively or Negatively Depending on The Differentation Stages. T Bone Miner Res 1996; 11: 1384-93.

90. Lanyon LE. Osteocytes, Strain Detection, Bone Modeling and Remodeling. Calcif Tissue Int 1993; 53: 102.
91. Urban C, Deutschmann A, Kerbl R, Lackner H, Schwinger W, Konigsrainer A, et al. Organ Tolerance Following Cadaveric Liver Transplantation for Chronic Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplantatıon 2002; 30(8): 535-7.
92. Öztopalan DF. Deneysel Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerinde Biyoaktif Cam ile Mineralize ve Demineralize Kemik Matriksinin Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ: 2017.
93. Okumuş Z, Yıldırım ÖS. The Cuttlefish Backbone: A New Bone Xenograft Material?. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29: 1177- 84.
94. Van Heest A, Swiontkowski M. Bone-graft substitutes. Lancet 1999; 353: 28-29.
95. Yavuz MS. Otojen Spongioz Kemik Grefti ve Kemik İliği ile Kombine Heterogreftin Deneysel Kemik Kavitelerinde Histopatolojik Olarak Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens. Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Erzurum: 2002.
96. De Boer HH. The History of Bone Graft. Clin Orthop 1988; 226: 292-8.
97. Tekmen P. Allojenik Kemik Grefti ile Maksiller Sinüs Augmentasyonu Uygulanan Atrofik Posterior Maksillada İmplant Biyomekaniği: Sonlu Eleman Analizi. Doktora Tezi. Ankara Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2010.
98. Santana RB, Trackman PC. Controlled Release of Fibroblast Growth Factor 2 Stimulates Bone Healing in An Animal Model of Diabetes Mellitus. Int J Oral Maxillofac Implants 2006; 21: 711-8.
99. Srouji S, Rachmiel A, Blumenfeld I, Livne E. Mandibular Defect Repair by TGF-Beta and IGF-1 Released From A Biodegradable Osteoconductive Hydrogel. J Craniomaxillofac Surg. 2005; 33: 79-84.
100. Atay MH, Yılmaz FR. İki Farklı Kemik Greftinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi. Dicle Tıp Derg 2005; 32(4): 172-8.
101. Gülsün B, Erol B, Yılmaz F. Sentetik Bir Kemik Alloplastı ile Ksenojenik Bir Kemik Greftinin Osteogenesis Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması. Türk Oral Maksillofas Cer Derg 1997; 1: 1-9.
102. Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors Affecting Bone Graft İncorporation. Clin Orthop Relat Res 1996; 324: 66-74.

103. Karaca İ, Çılbır Ö, Sabuncuoğlu B, Akbay C. Saf Mineralize Kemik Grefti Pyrostun Membranlı ve Membransız Uygulamalarının Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek Derg 1999; 2(2): 91-7.

104. Lane JM, Sandhu HS. Current Approaches to Experimental Bone Grafting. Orthop Clin North Am 1987; 18(2): 213.

105. Aral A. Enjekte Edilebilen Kalsiyum Fosfat Esaslı Greft Materyalinin Üst Çene Arka Bölgede Maksiller Sinüs Augmentasyonu İçin İmplantlar Etrafında Kullanılması: Koyunlar Üzerinde Yapılan Karşılaştırmalı Çalışma. Doktora Tezi. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2006.

106. Federıco HA. Bone Grafting in Oral İmplantology. U.K. Quintessence Publishing Co. Ltd; 2006.

107. Saraçoğlu D. Diş Hekimliğinde Kullanılan Greftler. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı. Bitirme Tezi. İzmir: 2014.

108. Crea A, Deli G, Littarru C, Lajolo C, Orgeas GV, Tatakis DN. Intrabony Defects, Open-Flap Debridement, and Decortication: A Randomized Clinical Trial. Journal of periodontology 2014; 85(1): 34-42.

109. Chin M, Toth BA. Distraction Osteogenesis İn Maxillofacial Surgery Using İnternal Devices: Review of Five Cases. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 1996; 54(1): 45-53.

110. Kramer FJ, Dempf R, Bremer B. Efficacy of Dental İmplants Placed İnto Fibula-Free Flaps for Chinorofacial Reconstruction. Clinical Oral İmplants Research 2005; 16(1): 80-8.

111. McAllister BS, Gaffaney TE. Distraction Osteogenesis for Vertical Bone Augmentation Prior to Oral İmplant Reconstruction. Periodontology 2000 2003; 33(1): 54-66.

112. Misch CM. Comparison of İntraoral Donor Sites for Onlay Grafting Prior to İmplant Placement. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 1997; 12(6).

113. Proussaefs P, Lozada J, Kleinman A, Rohrer MD. The Use of Ramus Autogenous Block Grafts for Vertical Alveolar Ridge Augmentation and İmplant Placement: A Pilot Study. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 2002; 17(2).

114. Urist M. Bone Transplants and İmplants. Fundamental and Clinical Bone Physiology 1980.

115. Sheikh Z, Sima C, Glogauer M. Bone Replacement Materials and Techniques Used For Achieving Vertical Alveolar Bone Augmentation. Materials 2015; 8(6): 2953-93.

116. Öztürk BY. Tavşan Tibialarında Oluşturulan Segmenter Kemik Defektlerinin Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Yüklenmiş Hidroksiapatit/Jelatin Matriks İle Tedavisi. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi. Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı. Ankara: 2010.

117. Goldberg VM. Natural History of Autografts And Allografts. Bone implant grafting: Springer 1992; 9-12.

118. Cornell CN. Osteoconductive Materials and Their Role as Substitutes for Autogenous Bone Grafts. Orthopedic Clinics 1999; 30(4): 591-8.

119. Moucha CS, Einhorn TA. Enhancement of Skeletal Repair. In: Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG. (Editors). Skelatal Trauma. Vol 1. 3rd Edition. Saunders Co. Philadelphia; 2003. p. 639-59.

120. Ho SKC, Pell SAF, Hu ZM, Sandor GKB, Clockie CML. Augmentation of Maxillar Sinüs: Comprasion of Bioimplants Containing Bone Morhogenetic Protein and Autogeneous Bone in A Rabbit Model. J Can Dent Assoc. 2010; 76: 1-7.

121. Schallhorn RG. Osseous in The Treatment of Periodontal Osseous Defect in Stahl. Periodontal Surgery. 1976; 16: 134-42.

122. Tuscan C, Yaltırık M. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Materyaller. 1. Baskı. İstanbul. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi. 2002; 6.

123. Mutlu MN. Sinüs Tabanı Yükseltilmesinde Dondurulmuş Kurutulmuş Allojenik Kemik Greftinin Kullanılması. Doktora Tezi. Selçuk Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1995.

124. Hammerle CH., Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal Dynamics of Healing in Rabbit Cranial Defects Using Guided Bone Regeneration. J Oral Maxillofac Surg 1995; 53(2): 167- 74.

125. Tanyel, C. Greft materyalleri. Dişhekimliği Dergisi 2008; 84: 28-33.

126. Türker M, Yücetaş Ş. Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti. Ankara: 1999.

127. Amini Z, Lari R. A Systematic Review of Decellularized Allograft and Xenograft-Derived Scaffolds in Bone Tissue Regeneration. Tıssue & Cell 2021; 69.

128. Lomas R. Chandrasekar,A. Board TN. Bone allograft in the UK: perceptions and realities. Hıp Internatıonal 2014; 23(5): 427-33.

129. Kökden A, Türker M. Oral ve Maxillofasiyal Cerrahide Kullanılan Kemik Greftleri ve Biyomateryaller. Cumhuriyet Dental Journal 1999; 2: 134-140.

130. Browaeys H, Bouvry P, De Bruyn H. A Literature Review on Biomaterials in Sinus Augmentation Procedures. Clin. Implant. Dent. Relat. Res. 2007; 9(3): 166-77.

131. Büyükakyüz N, Öztürk M. Oral İmplantolojide Estetik Problemlerin Sert ve Yumuşak Doku ile Çözülmesi. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2012; 1: 32-41

132. Baylas H. Mukogingival Sorunlar ve Cerrahisi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ders Notları 2011.

133. Kaya Y, Şahin S. Utilization of Demineralized Freezed Dried Bone Allografts in Periodontal Bone Defects and Recent Developments. Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2010; 34 (1-2): 37-45.

134. Misch, CE, Dietsh F. Bone- Grafting Materials in Implant Dentistry. Implant Dent. 1993; 2: 158-167.

135. Muschik M, Ludwig R, Halbhubner S, Bursche K, Stoll T. Beta-Tricalcium Phosphate as a Bone Substitute for Dorsal Spinal Fusion in Adolescent İdiopathic Scoliosis: Preliminary Results of a Prospective Clinical Study. Eur Spine J 2001; 10: 178-84.

136. Schwartz-Arad D, Levin L, Sigal L, Surgical Success of İntraoral Autogenous Block Onlay Bone Grafting for Alveolar Ridge Augmentation. Implant Dent 2005; 14(2): 131-8.

137. Durmuş AS, Ünsaldı E. Köpeklerde Deneysel Maddi Kayıplı Femur Kırıklarında Koral ve Spongiyöz Otogref Uygulamalarının Karşılaştırması. FÜ Sağ Bil Vet Derg. 2001; 15(1): 101-112.

138. Guillemin G, Meunier A, Dallant P, Christel P, Pouliquen JC, Sedel L. Comparison of Coral Resorpsion and Bone Apposition with Two Natural Corals of Different Porosities. J Biomed Mater Res. 1989; 23: 765-79.

139. Durmuş AS. Kemik Grefti Yerine Doğal Bir Biyoseramik: Deniz Mercanı. FÜ Sağ Bil Vet Derg. 2015; 29(2): 145-150.

140. Pirinç Ö. Kemik defektlerinin onarımında sistemik olarak uygulanan denosumab'ın etkinliğinin incelenmesi. İnönü Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi Ağız Diş Ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Ortak Doktora Tezi. 2015.

141. Yukna, R.A. Clinical Evaluation of Coralline Calcium Carbonate as a Bone Replacement Graft Material in Human Periodontal Asseaus Defects. J. Periodontol. 1994; 65. 177-185.

142. Tofe AJ, Watson BA, Bowerman MA. Solution and Cell Mediated Resorption of Grafting Materials. J Oral Implantol. 1991; 17: 345.

143. Laurencin C. Khan Y. El-Amin SF. Bone Graft Substitutes. Expert Review of Medical Devices 2006; 3(1): 49-57.

144. Matsuno T, Omata K, Hashimoto Y, Tabata Y, Satoh T. Alveolar Bone Tissue Engineering Using Composite Scaffolds for Drug Delivery. Japanese Dental Science Review 2010; 46 (2): 188-192.

145. Ashammakhi N. Chapeter 7. In: Topics in tissue engineering Ferretti P. 2nd Ed. Volume I (Electronic book). 2003. p. 1-46.

146. Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 2nd Ed. London: BC Decker Inc. 2004.

147. Özalp Y, Özdemir N. Biomaterials and Biocompatibility. J Fac Ank Phar 1996; 25: 51-75.

148. Gür AK, Taşkın M. Metalik Biyomalzemeler ve Biyouyum. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları Dergisi 2004; 2. 106-13.

149. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in Orthopaedics. J R Soc Interface 2008; 5: 1137-58.

150. Özkurt B, Tabak AY. Metallic Biomaterials and Metallosis. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi 2011; 10(2): 83-6.

151. Özeç İ, Yeler H. Bone Morphogenetic Proteinler ve Osteoindüksiyon. Cumhuriyet Üniv Diş Hek Fak Derg 2003; 6: 1.

152. Moore DC, Chapman MW, Manske D. The Evaluation of a Biphasic Calcium Phosphate Ceramic for Use in Grafting Long Bone Diaphyseal Defects. J Orthop Res 1987; 5: 356-65.

153. Salyer KE, Hall CD. Porous Hydroxyapatite as an Onlay Bone-Graft Substitute For Maxillofacial Surgery. Plast Reconstr Surg 1989; 84(2): 236-44.

154. Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. J Bone Joint Surg Am 1997; 79(4): 495-502.

155. Heise U, Osborn JF, Duwe F. Hydroxyapatite Ceramic as a Bone Substitute. Int Orthop 1990; 14(3): 329-38.

156. Balçık C, Şenköylü A, Koç N, Timuçin M, Korkusuz P, Korkusuz F. Segmenter Defekt İçeren Uzun Kemik Kırıklarının Tedavisinde Kullanılan Gözenekli Hidroksiapatit ve Kalsiyum Fosfat Seramik Bloklarının İn Vivo Uyumluluğu. J Arthroplasty & Arthroscopic Surgery 2003; 14: 39-44.

157. Grimm B, Blom AW, Miles AW, Turner IG. In Vitro Endurance Testing of Bone Graft Materials for İmpaction Grafting. Bioceramics 2002; 14: 375 8.

158. Nich C, Sedel L. Bone Substitution in Revision Hip Replacement. Int Ortho 2006; 30: 525-31.

159. Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, Legeros RZ, Raher S. Macroporous Calcium Phosphate Ceramic for Long Bone Surgery in Humans and Dogs. Clinical and Histological Study. J Biomed Mater Res 1990; 24(3): 379-96.

160. Oonishi H, Iwaki Y, Kin N, Kushitani S, Murata N, Wakitani S et al. Hydroxyapatite in Revision of Total Hip Replacements with Massive Acetabular Defects: 4- to 10-Year Clinical Results. J Bone Joint Surg Br 1997; 79(1): 87-92.

161. Dreesmann H. Über Knochenplombierung. Beitr Klin Chir 1892; 9: 804-10.

162. Sottosanti J. Calcium sulfate: A Biodegradable and Biocompatible Barrier for Quided Tissue Regeneration. Compend Contin Educ Dent 1992; 13: 226.

163. Pecora G, Adreana S, Margarone JE, Covani U, Sottosanti JS. Bone regeneration with a Calcium Sulfate Barrier. Oral Surg 1997; 84: 424.

164. Intini G, Andreana S, Margarone JE. Engineering a Bioactive Matrix by Modifications of Calcium Sulfate. Tissue Eng. 2002; 8: 997-1008.

165. Peltier LF. The Use of Plaster of Paris to Fill Defects in Bone. Clin. Orthop. Relat. Res. 1961; 21: 1-29.

166. Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, Hartjen C, Watson JT, Kim PT. The Use of a Surgical Grade Calcium Sulfate as a Bone Graft Substitute: Results of a Multicenter Trial. Clin. Orthop. Relat. Res. 2001; 382: 42-50.

167. Thomas MV, Puelo DA, Al-Sabbagh M. Calcium sulfate: A Review. J. Long Term. Eff. Med. Implants 2005; 15: 599-607.

168. Clokie CML, Mogdaham H, Jackson MT, Sandor GKB. Closure of Critical Sized Defects with Allogenic and Alloplastic Bone Substitutes. J. Craniofaciac. Surg. 2002; 3: 111-21.

169. Maragos P, Bissada NF, Wang R, Cole BP. Comparison of Three Methods Using Calcium Sulfate as a Graft/Barrier Material for the Treatment of Class II Mandibular Molar Furcation Defects. Int. J. Periodontics Restor. Dent 2002; 22: 493–501.

170. Li J, Rai S, Ze R, Tang X, Liu R, Hong P. Injectable Calcium Sulfate vs. Mixed Bone Graft of Autologous İliac Bone and Allogeneic Bone: Which is The Better Bone Graft Material for Unicameral Bone Cyst in Humerus?. Medicine 2020; 99(23).

171. Guarnieri R, Grassi R, Ripari M, Pecora G. Maxillary Sinus Augmentation Using Granular Calcium Sulfate: Radiographic and Histologic Study at 2 Years. J. Periodont. Rest. Dent. 2006: 26; 79-85.

172. Coetzee AS. Regeneration of Bone in the Precence of Calcium Sulfate. Arch. Otolaryngol. 1980; 106: 405-409.

173. Payne JM, Cobb CM, Rapley JW, Killoy W, Spencer P. Migration of Human Gingival Fibroblasts Over Guided Tissue Regeneration Barrier Materials. J. Periodontol. 1996; 67: 236-44.

174. Zhao Z, Wang G, Zhang Y, Luo W, Liu S, Liu Y et al. The Effect of Calcium Sulfate/Calcium Phosphate Composite for the Treatment of Chronic Osteomyelitis Compared with Calcium Sulfate. Ann Palliat Med 2020.

175. Aichelmann-Reidy ME, Heath C, Reynolds MA. Clinical Evaluation of Calcium Sulfate in Combination with Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft for the Treatment of Human İntraosseous Defects. J. Periodontol. 2004; 75: 340-7.

176. Pecora GE, De Leonardis D, Della Rocca C, Cornelini R, Cortesini C. Short-Term Healing Following the Use of Calcium Sulfate as a Grafting Material for Sinus Augmentation: A Clinical Report. Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 1998; 3: 866-73.

177. Andreana S, Cornelini R, Edsberg L, Naitella JR. Maxillary Sinus Elevation For İmplant Placement Using Calcium Sulfate with and Without DFDBA: Six Cases. Imp. Dent. 2004; 13: 270-7.

178. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A et al. A New Nomenclature for İnt-1 and Related Genes: The Wnt Gene Family. Cell 1991; 64(2): 231.

179. Nusse R, Ooyen A van, Cox D, Fung YK, Varmus H. Mode of Proviral Activation of a Putative Mammary Oncogene (İnt-1) on Mouse Chromosome 15. Nature 1984; 307(5947): 131-136.

180. Nusse R, Varmus HE. Many Tumors İnduced by the Mouse Mammary Tumor Virus Contain a Provirus İntegrated in the Same Region of the Host Genome." Cell 1982; 301(1): 99-109.

181. Dönmez HG, Demirezen Ş, Beksaç MS. WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. Deu Med J. 2011; 25(3): 189-199

182. Can A. Kök Hücre, Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Kitabevi, Ankara; 2014. p. 327-426..

183. Berridge MJ. Calcium Signalling Remodelling and Disease. Biochemical Society Transactions 2012; 40(2): 297-309.

184. Lien WH, Fuchs E. Wnt Some Lose Some: Transcriptional Governance of Stem Cells by Wnt/β-Catenin Signaling. Genes & Development 2014; 28(14): 1517-1532.

185. Whyte JL, Smith AA, Helms JA. Wnt Signaling and İnjury Repair. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2012; 4(8): a008078.

186. Zhang R, Yang G, Wu X, Xie J, Yang X, Li T. Disruption of Wnt/β-Catenin Signaling in Odontoblasts and Cementoblasts Arrests Tooth Root Development in Postnatal Mouse Teeth. International Journal of Biological Sciences 2013; 9(3): 228.

187. Kim JB, Leucht P, Lam K, Luppen C, Ten Berge D, Nusse R, et al. Bone Regeneration is Regulated by Wnt Signaling. Journal of Bone And Mineral Research 2007; 22(12): 1913-23.

188. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Cross Talk with the Osteoblastogenic Program. Cellular and Molecular Life Sciences 2009; 66(2): 236-253.

189. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. Scientifica 2013.

190. Cai SX, Liu AR, He HL, Chen QH, Yang Y, Guo FM et al. Stable Genetic Alterations of β-Catenin and ROR2 Regulate the Wnt Pathway, Affect the Fate of MSCs." Journal of Cellular Physiology 2014; 229(6): 791-800.

191. Zou L, Zou X, Li H, Tina M, Yuanlin Z, Lü N, et al. Molecular Mechanism of Osteochondroprogenitor Fate Determination During Bone Formation. Tissue Engineering, Springer; 2006. p. 431-441.

192. Case N, Rubin J. β-Cateni-A Supporting Role in the Skeleton. Journal of Cellular Biochemistry 2010; 110(3): 545-53.

193. Chen J, Long F. β-Catenin Promotes Bone Formation and Suppresses Bone Resorption in Postnatal Growing Mice. Journal of Bone and Mineral Research 2013; 28(5): 1160-9.

194. Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y. Regulatory Mechanism of Osteoclastogenesis by RANKL and Wnt Signals." Front Biosci 2011; 16(4): 21-30.

195. Nie B, Zhou S, Fang X, Li W, Wang Bguan S. Implication of Receptor Activator of NF-κB Ligand in Wnt/β-Catenin Pathway Promoting Osteoblast-Like Cell Differentiation. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences] 2012; 32(6): 818-22.

196. Glass II DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation. Developmental Cell 2005; 8(5): 751-764.

197. Rooker SM, Liu B, Helms JA. Role of Wnt Signaling in the Biology of the Periodontium. Dev. Dyn. 2010; 239: 140–147.

198. Morvan F, Boulukos K, Lacroix-Clement P, Roman SR, Suc-Royer I, Vayssiere B et al. Deletion of a Single Allele of the Dkk1 Gene Leads to an İncrease in Bone Formation and Bone Mass." Journal of Bone and Mineral Research 2006; 21(6): 934-945.

199. Han P, Wu C, Chang J, Xiao Y. The Cementogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells Via the Activation of Wnt/β-catenin Signalling Pathway by Li+ İons Released from Bioactive Scaffolds." Biomaterials 2012; 33(27): 6370-9.

200. Lu B, Green BA, Farr JM, Lopes FCM, Raay TJV. Wnt Drug Discovery: Weaving Through the Screens, Patents and Clinical Trials." Cancers 2016; 8(9): 82.

201. Zaugg L, Banu A, Walther AR, Chandrasekaran D, Babb RC, Salzlechner C. Translation Approach for Dentine Regeneration Using GSK-3 Antagonists." Journal of Dental Research 2020; 99(5): 544-51.

202. Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 Hypothesis of Alzheimer's Disease. J Neurochem 2008 Mar; 104(6): 1433-9.

203. Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Sanchez-Galiano S, Morales- Garcia J, Martinez A, Santos A, et al. NP031112, A Thiadiazolidinone Compound, Prevents

İnflammation and Neurodegeneration Under Excitotoxic Conditions: Potential Therapeutic Role in Brain Disorders." Journal of Neuroscience 2007; 27(21): 5766-76.

204. Domínguez JM, Fuertes A, Orozco L, del Monte-Millán M, Delgado E, Medina M. Evidence for İrreversible İnhibition of Glycogen Synthase Kinase-3β by Tideglusib. J Biol Chem 2012; 287(2): 893–904.

205. Li J, Xiang L, Jiang X, Teng B, Sun Y, Chen G, et al. Investigation of Bioeffects of G Protein-Coupled Receptor 1 on Bone Turnover in Male Mice. J Orthop Transl 2017; 10: 42–51.

206. Oncu B, Yilmaz A, Karademir B, Altunok EÇ, Kuru L, Ağralı ÖB. Cytotoxicity and Collagen Expression Effects of Tideglusib Administration on Human Periodontal Cells: An In-Vitro Study. Clinical and Experimental Health Sciences 2020; 10: 153-162.

207. Lane JM, Sandhu HS. Current Approaches to Experimental Bone Grafting. Orthop Clin North Am 1987; 18(2): 213-225.

208. Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition. Newyork: Blakiston Division. McGraw-Hill; 1968.

209. Emery SE, Fuller DA, Stevenson S. Ceramic Anterior Spinal Fusion. Biologic and Biomechanical Comparison in a Canine Model. Spine 1996; 21(23): 2173-2719.

210. Bauer TW, Muschler GF. Bone Graft Materials. An Overview of the Basic Science. Clin Orthop Relat Res. 2000; 371:10-27.

211. Chen K, Lin X, Zhang QI, Ni J, Xiao J, Wang Y, et al. Decellularized periosteum as a potential biologic scaffold for bone tissue engineering. Acta Biomater. 2015; 19: 46-55.

212. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, et al. Essential Role of B-Catenin in Postnatal Bone Acquisition. J Biol Chem 2005; 280(22): 21162–8.

213. Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Sasaki M, Yoshihara T, Morimoto S, Hirata M, et al. Acceleration of Bone Regeneration by Local Application of Lithium: Wnt Signal-Mediated Osteoblastogenesis and Wnt Signal-İndependent Suppression of Osteoclastogenesis. Biochem Pharmacol 2014; 90(4): 397–405.

214. Sacha Cavelier S, Tanzer M, Barthelat F. Maximizing the Strength of Calcium Sulfate for Structural Bone Grafts. J Biomed Mater Res. 2020; 108: 963–71.

215. Yahav A, Kurtzman GM, Katzap M, Dudek D, Baranes D. Bone Regeneration: Properties and Clinical Applications of Biphasic Calcium Sulfate. Dent Clin North Am. 2020 Apr; 64(2): 453-72.

216. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone Substitutes in Orthopaedic Surgery: From Basic Science To Clinical Practice. J Mater Sci: Mater Med 2014; 25: 2445–61.

217. Ostermann PA, Seligson D, Henry SL. Local Antibiotic Therapy for Severe Open Fractures. A review of 1085 Consecutive Cases. J Bone Joint Surg B 1995; 77: 93–7.

218. Keating JF, Blachut PA, O'Brien PJ, Meek RN, Broekhuyse H. Reamed Nailing of Open Tibial Fractures: Does the Antibiotic Bead Pouch Reduce The Deep İnfection Rate? J Orthop Trauma 1996; 10: 298–303.

219. Ferguson JY, Dudareva M, Riley ND, Stubbs D, Atkins BL, McNally MA. The Use of a Biodegradable Antibiotic-Loaded Calcium Sulphate Carrier Containing Tobramycin for the Treatment of Chronic Osteomyelitis: A Series Of 195 Cases. Bone Joint J 2014; 96(6): 829–36.

220. Sanrı M. Cerrahi Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinde Sığır Kaynaklı Anorganik Kemik Grefti ve Kanama Durdurucu Bitki Ekstresinin Kombine Kullanımının Kemik Rejenerasyonuna Etkisi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. Adana; 2013.

221. Kopaladze RA. The Experiments with Laboratory Animals from a Bioethical Point of Viewhistory, Modern Time, Perspectives. Usp Fiziol 2004; 35: 92-109.

222. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. The Vascularity of Atrophic Nonunions. Injury 2002; 33: 145-50.

223. Reed AA, Joyner CJ, Brownlow HC. Human Atrophic Fracture Non-Unions are not Avascular. J Orthop Res 2002; 20: 593-99.

224. Hua Chen, Xu Cui, Xuezhong Yu, XueZhong Tian, BoXun Zhang, Peifu Tang, et al. Effects of Chitosan-Coated Pressed Calcium Sulfate Pellets Combined With Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 on Bone Formation in Femoral Condyle-Contained Bone Defects. J Craniofac Surg 2010; 21: 188-197.

225. Elturki FF, Farid MH, Adawy HA. The Anticipated Effect of Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) Antagonist on Pulp Tissue Repair in Rabbits. ADJ-for Girls 2021; 8(4): 625-34.

226. Yalçın TY. Hemcon Dental Dressing ve Kalsiyum Sülfat Hemihidrattn Kanama Kontroluündeki Etkinliklerinin Klinik ve Histopatolojik Olarak İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. İstanbul; 2016.

227. Comeau-Gauthier M, Tarchala M, Luna JLR-G, Harvey E, Merle G. Unleashing β-catenin with a New Anti-Alzheimer Drug for Bone Tissue Regeneration. Injury 2020; 51(11): 2449-59.

228. Aysan AL, Çalışır M, Kızıldağ A, Özdede M, Özmen Ö. Effects of a Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitor Tideglusib on Bone Regeneration With Calvarial Defects. J Craniofac Surg 2020; 31: 1477–82.

229. Cho BC, Kim TG, Yang JD, Chung HY, Park JW, Kwon IC et al. Effect of Calcium Sulfate-Chitosan Composite: Pellet on Bone Formation in Bone Defect. The Journal of Craniofacıal Surgery 2005; 16(2).

230. Meng ZL, Wu ZQ, Shen BX, Li HB, Bian YY, Zeng DL, et al. Reconstruction of Large Segmental Bone Defects in Rabbit Using the Masquelet Technique with A-Calcium Sulfate Hemihydrate. Journal of Orthopaedic Surgery and Research 2019; 14: 192

231. Zhao Z, Wang G, Zhang Y, Luo W, Liu S, Zeng Z, et al. Induced Membrane Technique Combined with Antibiotic-Loaded Calcium Sulfate–Calcium Phosphate Composite as Bone Graft Expander for the Treatment of Large İnfected Bone Defects: Preliminary Results of 12 Cases. Ann Transl Med 2020; 8(17): 1081.

232. Niu CC, Tsai TT, Fu TS, Lai PL, Chen LH, Chen WJ. A Comparison of Posterolateral Lumbar Fusion Comparing Autograft, Autogenous Laminectomy Bone With Bone Marrow Aspirate, and Calcium Sulphate With Bone Marrow Aspirate. Spine 2009; 34(25).

233. Jiang Y, Qin H, Wan H, Yang J, Yu Q, Jiang M, et al. Asprin-Loaded Strontium-Containing A-Calcium Sulphate Hemihydrate/Nano-Hydroxyapatite Composite Promotes Regeneration of Critical Bone Defects. J Cell Mol Med. 2020; 00: 1–13.

234. Dumas A, Moreau MF, Gherardi RK, Basle MF, Chappard D. Bone Grafts Cultured with Bone Marrow Stromal Cells for the Repair of Critical Bone Defects: An Experimental Study in Mice. J Biomed Mater Res A 2009; 90(4): 1218-29.

235. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative Performance of Three Ceramic Bone Graft Substitutes. The Spine Journal 2007; 7: 475–90.

236. Papadimitriou K, Karkavelas G, Vouros L, Kessopoulou E, Konstantinidis A. Effects of Local Application of Simvastatin on Bone Regeneration in Femoral Bone Defects in Rabbit. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2015; 43(2): 232-37.

237. Yang XB, Li Y, Huang Q, Yang J, Shen B, Pei FX. Evaluation of a Biodegradable Graft Substitute in Rabbit Bone Defect Model. Indian Journal of Orthopaedics 2012; 46(3).