



**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN MANDİBULAR DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZİSİNDE  
DEMİNERALİZE KEMİK MATRİKSİ KULLANIMININ  
OLUŞAN KEMİK KALİTESİ VE KONSOLİDASYON SÜRESİNE OLAN  
ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. H. YÜCEL DEMİR**

**TEZ DANIŞMANI**

**YRD. DOÇ. DR. SELAHATTİN ÖZMEN**

**ANKARA - 2007**

## **İÇİNDEKİLER**

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>I. GİRİŞ</b>             | <b>1</b>  |
| <b>II. GENEL BİLGİLER</b>   | <b>6</b>  |
| <b>III. GEREÇ YÖNTEM</b>    | <b>32</b> |
| <b>IV. BULGULAR</b>         | <b>46</b> |
| <b>V. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> | <b>69</b> |
| <b>VI. ÖZET</b>             | <b>81</b> |
| <b>VII. KAYNAKLAR</b>       | <b>85</b> |

## ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yapılabilmesinde büyük katkıları olan, fikir aşamasından itibaren her basamakta bilimsel ve teknik bilgilerinden faydalandığım, tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Selahattin Özmen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında, değerli görüşlerini ve hoşgörülerini esirgemeyen bölümümüzün değerli hocaları, Sayın Prof. Dr. Cemalettin Çelebi'ye, Sayın Prof. Dr. Kenan Atabay'a, Sayın Prof. Dr. Seyhan Çenetoğlu'na, Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Osman Latifoğlu'na, Sayın Doç. Dr. Reha Yavuzer'e, Sayın Doç. Dr. Sühan Ayhan'a, Sayın Öğr.Gör. Dr. Serhan Tuncer'e, Sayın Uz. Dt. Ayşe Gülşen'e, yardımları ve işgücü ile çalışmanın yürütülmesine destek olan Dr. A. Tolga Eryılmaz'a, Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nın olanaklarından yararlanmamı sağlayan Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi Tıbbi ve Cerrahi Komisyonu üyelerine, kemik metabolizması ünitesinde, kemik dansitometri ölçümlerine ve yorumlanmasına destek olan Radyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayşegül Özdemir'e, histopatolojik değerlendirmelere ışık tutan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na ve Uzm. Dr. Neşe Lortlar Uçankuş'a, istatistiksel incelemelerdeki katkılarından dolayı Mehmet Gül'e, başta sayın Vet. Dr. Şeyda Diker olmak üzere çalışmamın gerçekleştirildiği Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nin tüm çalışanlarına ve desteklerini her zaman hissettiğim tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## GİRİŞ

Oral ve maksillofasiyal cerrahi ile uğraşan tüm cerrahlar maksilla ve mandibula üzerinde istenen değişimleri elde edebilmek için çeşitli cihazlar, greftler ve cerrahi teknikler kullanmışlardır. Elde edilen sınırlı başarılar, yeni yöntemlerin arayışını doğurmuştur.

Distraksiyon osteogenezis, osteotomi veya kortikotomi sonrasında vaskülarize kemik segmentlere uygulanan yavaş ve kademeli traksiyon ile segmentlerin birbirlerinden giderek ayrılıp, arasında yeni kemik oluşumunu sağlayan biyolojik bir süreçtir. Kırık iyileşmesinde önemli rol oynayan kemik segmentler arasında yer alan kallus dokusunun, yumuşak kallus döneminde, tekrarlayan distraksiyon ile, traksiyon aksına paralel, yeni kemik oluşumunun gerçekleşmesidir.<sup>70</sup>

Distraksiyon osteogenezis, kemik rejenerasyonu, ekstremitenin uzatılması, kemik deformitelerinin düzeltilmesi ve kemik defektlerinin doldurulması amacıyla, ortopedistler tarafından kullanılmaktadır.<sup>24,34,35</sup> Kraniyofasiyal cerrahların distraksiyon osteogenezis ile tanışması ve dentofasiyal traksiyon için kullanılması, 1940 yılından sonra Kazanjian, Crawford ve 1959'da Köle ve ark.'nın maxiller ve mandibuler patolojilere müdahalesi ile başlamıştır. Distraksiyon osteogenezisin temel prensipleri 2. Dünya Savaşındaki ekstremit travmalarının tedavisi sırasında geliştirilmiştir. Bu bilgi birikimi ile 1970'den itibaren Snyder, Michieli ve Miotti, Panikarovski, Karp ve McCarthy'nin çalışmaları sayesinde ve kraniyofasiyal distraksiyon osteogenezis ilerlemeye başlamıştır.<sup>18,40,52,56,65,76</sup>

Distraksiyon osteogenezis sürecinin içinde bir takım evreler bulunmaktadır. Bu evreler, sürecin doğru işleminde rejenerasyon faktörleri ile beraber önemli role sahiptirler.<sup>34,35</sup>

**1) Latans Evresi:** Kemiklerin kesilmesinden distraksiyon evresine kadar olan süreçtir. Bu evrede osteotomi veya kortikotomi bölgesinde kallus oluşumu başlar. Bölgeye hücrel ve iyileşme faktörlerinden zengin bir göç olur. Literatürde 0 ile 14 gün arasında değişen latans evreleri bildirilmesine rağmen en çok uygulanan latans süreleri 3 ile 5 gündür.<sup>81</sup>

**2) Distraksiyon Evresi:** Distraksiyon evresi başladığında kemiğin çevre yumuşak dokusu subakut faza geçmiş olur ve distraksiyon mesafesinde bulunması gereken çoğu hücre ve yapısal eleman yerini almıştır. Distraksiyon döneminde iki ayrı parametre karşımıza çıkmaktadır. **Sıklık (rhythm)**, gün içinde eşit miktarda yapılan distraksiyon işlemi sayısıdır. **Oran (rate)** ise; birbirlerinden uzaklaşan kemik yüzeylerin veya uzayan kallus dokusunun günlük milimetre cinsinden uzama veya uzaklaşma miktarıdır. Distraksiyon evresinin süresi hedeflenen uzama veya iyileşmesi amaçlanan kemik defektinin uzunluk miktarına göre değişmektedir.

**3) Konsolidasyon Evresi:** Distraksiyon evresinin bitimi ile distraktör cihazının çıkarılması arasındaki evredir. Bu evrede, uzatılan kemik segmentler arası mesafede yeni kemik oluşumu takip edilir. Deney hayvanlarında bile bu süre minimum 3 ile 4 hafta civarında seyredir. Klinik uygulamalarda, kraniyofasiyal cerrahide 12 haftaya kadar çıkan süreyi kısaltma çabası, birçok bilimsel çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır. Bu evre için net bir zaman belirtilmemekle beraber mineralizasyonun radyolojik yöntemlerle takip edilerek evrenin sonlandırılması önerilmiştir.<sup>58</sup>

Distraksiyon osteogenezis sürecini etkileyen biyolojik ve mekanik birçok faktör mevcuttur. Kemik stabilizasyonu veya distraktör cihazının stabilitesi, osteotomi tekniği ve rejenerasyonu etkileyen mekanik faktörlere örnek gösterilebilir.<sup>2,53,70</sup>

## Tarihçe

Ondokuzuncu yüzyılda alt ve üst çeneye ait ilkel osteotomiler ve eksternal fiksasyon sistemleri uygulanmıştır. Yirminci yüzyıl başlarında ilk kez Codivilla tarafından femur uzatma amaçlı eksternal traksiyon uygulandı.<sup>18</sup> Benzeri uygulamalarla ortopedi alanında, sabit traksiyon ve eksternal fiksasyon ile pek ilerleme sağlanamadı. Aynı dönemde yüz bölgesinde yapılan uygulamalar distraksiyon osteogenezisten çok, osteotomileri yaptıktan sonra yapılan ilerletmenin sabit traksiyonda stabilizasyonu şeklinde idi. Gerek ekstremiteler gerek fasiyal cerrahide sabit traksiyon ile eksternal stabilizasyon, fibröz ‘union’, ‘nonunion’, gecikmiş iyileşme ve eklem kontraktürü gibi komplikasyonlar nedeniyle uzun süre tercih edilmedi.<sup>18</sup> Distraksiyon osteogenezis kavramının esası olan, giderek artan veya kademeli traksiyon ise ilk kez Gavril Ilizarov tarafından 1954 yılında uygulanmaya başlandı.<sup>34</sup> Ilizarov, eksternal fiksatörlerle yaptığı düzenekle, kortikotomi sonrası günde 1 mm kortikotomi mesafesini açtı ve kemik aralıkta rejenerasyonu gösterdi.<sup>1,2,3,8,34,35,52</sup> Dünya çapında kabul gören bu yöntem ilk kez 1972 yılında kraniyofasiyal bölgede deneysel bir çalışma ile uygulandı. Snyder ve ark. köpek mandibulasında eksternal fiksatörle distraksiyon osteogenezis gerçekleştirdiler.<sup>76</sup> 1976 yılında Michieli ve Miotti aynı deneyi intraoral distraktörle gerçekleştirdiler.<sup>56</sup> Daha sonra Panikarovski, 1982’ de distraksiyon osteogenezisin histolojik dinamiğini değerlendiren ve 41 köpek üzerinde yaptığı deneysel çalışmayı yayınladı.<sup>65</sup> 1989 yılında McCarthy ve ark. ilk klinik uygulamayı eksternal distraktör kullanarak hemifasiyal mikrozomi ve Nager’s sendromlu 4 vakalık bir seri ile gerçekleştirdiler.<sup>52</sup> Kraniyofasiyal distraksiyon osteogenezis mandibulada yapılan uzatma ve genişletme sonuçlarının gösterildiği yayınlarla tam bir ivme kazandı ve kullanımı arttı.

O dönemden günümüze yapılan onlarca çalışmada, uygulanan tekniğin bilinmeyen biyolojik işleyişi, klinik uygulamalardaki ortaya çıkan sıkıntı ve komplikasyonlar ve cihazlardaki teknolojik gelişmeler incelendi. Bahsettiğimiz evrelerde devreye giren hücresel elemanlar mediatörler ve kemik iyileşmesine olan katkıları halen araştırılmaktadır. Cihazlar için kullanılan metal hammaddeler daha hafif ve inert malzemelerden yapılmış olup intraoral ve ekstraoral formlar geliştirilmiştir. Aynı zamanda çok yönlü ilerleme sağlayan çok yönelimli (multidirectional) distraktörler üretilmiştir.<sup>18</sup>

Klinik kullanımda karşılaşılan sorunlar; enfeksiyon, cihazın doğru yerleştirilmemesi veya cihazın gevşek yerleştirilmesi ve buna bağlı aksial deviasyonlar, yetersiz kemik iyileşmesi, hipertrofik rejenerasyon, rejenerasyon hattında kırılma, hasta uyumsuzluğu, uzun süren distraksiyon ve konsolidasyon dönemi, cerrahi esnasında karşılaşılan problemler, çevre yumuşak doku, kaslar ve eklemlerde olan değişikliklerdir.<sup>15</sup> Sorunların çözülmesine yönelik klinik ve deneysel çalışmalar devam etmektedir. Bu sorunlar içinde konsolidasyon evresi veya tüm distraksiyon osteogenezis sürecinin uzun olması, tedavinin dezavantajlarından biridir. Özellikle mandibulaya yerleştirilen eksternal veya internal distraktörün konsolidasyon döneminde, 3 ay boyunca takılı kalması hastaya, sosyal ve fiziksel olarak sorun çıkarmaktadır. Konsolidasyon döneminde kemik rejenerasyonunu hızlandırmak ve süreyi kısaltmak için çeşitli büyüme faktörleri (BMP, TGF vb.), elektrik stimülasyonu, ultrasonik dalgalar veya çeşitli farmakolojik ajanlar denenmiştir.<sup>4,8,10,11,13,57,62,64,72,90</sup> Tüm tedavi süresini azaltmak için latans ve distraksiyon evrelerinin süreleri değiştirilmiş ve konsolidasyon evresinde oluşan kemik kalite ve kantitesi incelenmiştir.<sup>17,21,63,69,85</sup> Ancak bu uygulamaların yaygın klinik kullanımı gerçekleşmemiştir. Demineralize kemik matriksi (DKM) ise statik

kemik defektlerinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar yayınlanmıştır.<sup>73,87</sup> Literatürde, distraksiyon osteogenezis sürecinde DKM sadece tavşan tibiasında yapılmış bir çalışmada kullanılmış ancak kraniyofasiyal bölgede kullanımına rastlanmamıştır.<sup>27</sup>

Bu çalışmada, osteojenik potansiyeli artıran,<sup>27,73</sup> osteoindüktif etkili faktörler içeren, kullanıma hazır demineralize kemik matriksi (SureFuse®) kullanımının distraksiyon mesafesinde oluşan kemik yoğunluğuna ve kemik oluşumunun hızlanmasına olan etkisinin histolojik ve kemik dansitometrik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Klinikte başka amaçlarla, yaygın olarak kullanılan DKM'nin konsolidasyon döneminin başında uygulanmasına bağlı biyolojik sürecin hızlanacağı ve oluşan kemiğin kemik yoğunluğunun eş zamanlı distraksiyon yapılan ve DKM uygulanmayan kemik iyileşmesine göre daha fazla olacağı düşünülmektedir.

## GENEL BİLGİLER

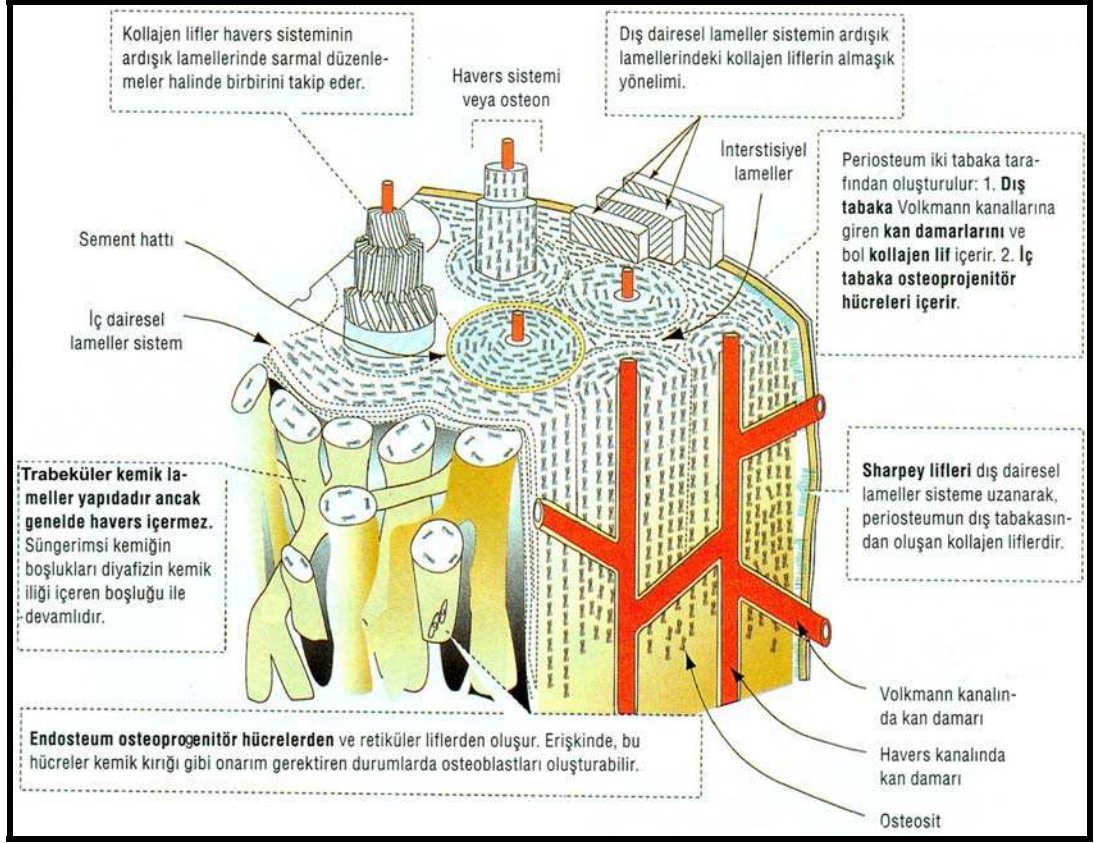
### KEMİK ANATOMİSİ

Kemikler, insan vücuduna yapısal destek sağlayan, aynı zamanda iç organları koruma işlevi olan, vücut hareketlerini sağlayan kasların yapıştığı, kalsiyum depolayan ve içerisindeki kemik iliği ile hematopoetik organ gibi davranabilen kompleks organ sistemidir.<sup>54</sup>

Kemikler morfolojik olarak ‘non-lameller’, kortikal ve kansellöz kemik olarak üçe ayrılır. ‘Non-lameller’ kemik embriyonik dönemde, kırık iyileşmesinde ve hiperparatiroidizm gibi bazı patolojik süreçlerde görülür.

Kortikal kemik, kompakt veya lameller kemik olarak da adlandırılır. Yassı kemiklerin iç ve dış tabakalarını, uzun kemiklerin dış yüzünü oluşturur. Korteks kemiğin düz, sert ve güçlü dış kısmıdır. Paralel ve konsantrik lamellar bir yapıya sahip olup lakünaların çevrelediği Haversian ve Volkmann kanal sistemini (osteon) içerir. Bu kanal sistemi, kemiğe besleyici vasküler yapıların girişini ve dağılımını sağlar (**Şekil 1**). Korteksin dış yüzeyini kemik beslenmesi ve iyileşmesinde önemli rol oynayan iki tabakalı osteoprogenitör hücre diziliminden oluşan periost sarar. Korteksin iç yüzeyini saran tabakaya da endosteum adı verilir.

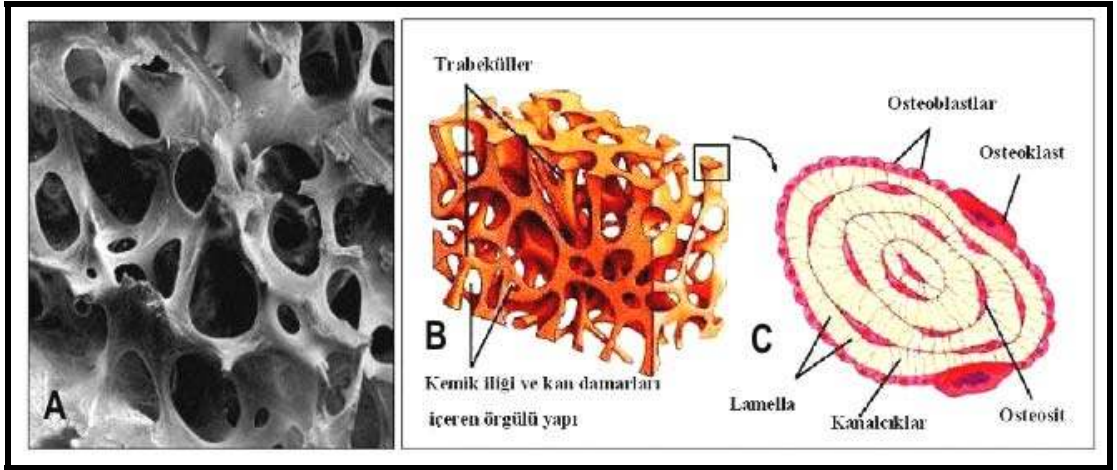
Kansellöz kemik kortikal kemik içinde kalan ise süngerimsi görünümü oluşturan trabeküler yapısı ile taşıma ve sağlamlık konusunda kortikal kemiğe destek olmakta ve zengin hematolojik ve osteoblastik hücresel elemanlara diğer bir ifade ile kemik iliğine, ev sahipliği yapmaktadır (**Şekil 2**).



**Şekil 1:** Kortikal kemiğin morfolojik yapısı Havers ve Volkmann kanallarının kemik yapı içerisindeki yerleşimleri (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof Dr. Ramazan Demir ,4. başlık, sayfa119, 2006).

Olgunlaşmış kemik yapısının %93'ü solid, %7 si sudan oluşmaktadır. Katı kemik içeriğinin %70'i, ağırlıklı olarak kalsiyum fosfat (hidroksiapatit kristalleri) olmak üzere inorganik içeriktir. Kemik dokusunun sertliği kollajen doku ile hidroksiapatit kristalleri arasındaki etkileşime bağlıdır. Eğer kemik dekalsifiye edilirse özgün şekil korunmakla beraber kolay bükülebilir hale gelir<sup>46</sup>. Organik içerik ise kemik hücreleri ve hücre dışı matriks elemanlarından oluşmaktadır. Kalsifiye matriks esas olarak tip I kollajenden meydana gelen lifsi maddeler ve kondrotin sülfat ve keratan sülfat yan bağları içeren proteoglikanlardan zengin bir yapı içerir.

Bunların yanında osteonektin, osteokalsin ve osteopontin gibi glikoproteinler ve kemik sialoproteinlerini de içerir.<sup>5,41</sup> Önemli roller oynayan bazı ara maddeleri özetleyecek olursak; tip 1 kollajen, kemik matriksinin %90'nı oluşturmaktadır. Osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. Osteopontin, fosforile glikoproteindir, Osteoblast ve osteoklastlarca salınarak hücre dışı matrikste yeniden şekillenme amacı ile osteoklastları aktive eder. Osteonektin de osteoblastlar tarafından sentezlenen bir glikoproteindir, mineralizasyonda, kalsiyum ve tip 1 kollajen bağlanmasını sağlayarak önemli rol oynar. Osteokalsin vitamin K bağımlı bir matriks proteinidir, osteoblastların yanı sıra odontoblast ve hipertrofik kondrositlerden salındığı bilinmektedir. Kemik iyileşme sürecinde düzenleyici rol oynar; hidroksiapatit bağlanmasının arttırır ve aynı zamanda osteoklast göçünü düzenler. Genel olarak kemik matriksi içerisinde proteoglikanlar bol miktarda bulunur. Biglikan ise en fazla bulunan proteoglikandır ve hidroksiapatit dengesinde rol oynar.



**Şekil 2:** Kansellöz kemiğin morfolojik yapısı (A) Kansellöz kemiğin gevşek trabeküler yapısının görünümü (B) Kansellöz kemiğin trabeküler yapısının ve kemik iliği ile kan damarı içeren örgülü yapının şematik görünümü, kansellöz kemik Haversian sistem içermez

## **Kemik Hücreleri**

### **Osteoprogenitör hücreler**

Periostun iç tarafında, Haversian kanallarında ve endosteumda bulunurlar. Embriyonik mezenşimden köken alan bu hücreler mitoz ile bölünebilmekte ve osteoblastlara farklılaşabilmektedirler. Düşük oksijen konsantrasyonlarında kondrojenik hücrelere dönebilmektedirler. İğsi şekilli ve soluk boyanan oval çekirdekleri vardır. Bu hücreler kemik büyümesinde aktif rol oynarlar.<sup>46</sup>

### **Osteoblastlar**

Osteoblastlar, özellikle kemiğin dış yüzeylerinde, kemik oluşumu ve yeniden şekillenmenin gerçekleştiği yerlerde ve kırık hattındaki kemik yüzeylerde sıklıkla bulunurlar. Kemik oluşumunu ve kemik matriksinin sentezinde önemli rol alır. Bunların yanında, kemik rejenerasyonunda önemli rol aldıkları düşünülen, kemik morfojenik protein, transforming büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, interlökin-1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi sinyal proteinlerini salgılar. Periost ve kemik iliğindeki prekürsör hücrelerden farklılaşır. Osteoblastın etrafı, salgıladığı hücre dışı matriks ile çevrilince ‘laküna’ adı verilen boşlukta osteosit halini alır. Hücre dışı matriks kalsifiye olsa da laküna etrafında ‘osteoid’ adı verilen kalsifiye olmamış doku ile kalsifiye matriksten ayrılırlar. Kemik yüzeyindeki osteoblastlar osteoprogenitör hücrelere benzese de bölünme özellikleri yoktur. Osteoblastların hücre membranında integrinler ve paratiroid hormon reseptörleri vardır.<sup>41</sup> Paratiroid hormon bu reseptöre bağlanınca osteoprotegrin ligandı (OPGL) ve osteokalsin stimüle edici faktör salgılanır. Böylece aktive edilen osteoklastlar kemik rezorbsiyonunu gerçekleştirir. Ayrıca osteoblastlar, osteoidi parçalayan enzimi salgılayarak osteoklastın organik matriks ile kontağını sağlarlar.

### **Osteositler**

Kalsifiye kemik matriksi içerisindeki lakünalar içinde oturan ve osteoblastlardan farklılaşan matür kemik hücreleridir. Başka hücresel yapılara dönüşmezler. Lakünalardan ışınal tarzda dağılan tünel benzeri kanalikül yapıları içerisinde osteositin sitoplazmik uzantıları vardır. Bu uzantılar yardımı ile komşu osteosit hücresi ile iyon ve küçük molekül alışverişine imkan sağlayan ‘gap junction’ oluştururlar. İnaktif gibi görünseler de kemik bütünlüğünden sorumlu maddeleri salgırlar, kemik mineral dengesi ve kemik rezorpsiyon dengesini sağladığı düşünülmektedir.

### **Osteoklastlar**

Çok çekirdekli hücreler olup kemik iliği granülosit-makrofaj öncül hücrelerinden köken alan ve kemik rezorbsiyonundan sorumlu olan, makrofaj işlevine sahip hücrelerdir. Periost ve endosteum varlığında yeniden şekillendirmeyi sağlarlar. Osteoklast-stimüle edici faktör, koloni stimüle edici faktör-1, osteoprotegrin ve kalsitonin reseptörleri içerirler. Kemik rezorbsiyonundan sonra apoptozise uğrarlar. Diğer bir faktör olan osteoprotegrin bu hücrelerin osteoklastlara dönüşümünü ve osteoklastların kemik rezorbsiyonunu baskılar. Osteoklastlar ‘Howship lakünası’ denen sığ çukurcularda otururlar. Bu lakünalar kemik rezorbsiyonunun olduğu bölgelerdir. Paratiroid hormon ve kalsitonin hormonları osteoklastların kemik rezorbsiyonunu düzenlerler.<sup>41,46</sup>

### **Kemiğin Yapısı**

Kemikler anatomik şekillerine göre 5’e ayrılırlar:

- uzun kemikler (örn: tibia)
- kısa kemikler (örn: el bilek kemikleri)
- yassı kemikler (örn: kafatası kemikleri)

- irregüler kemikler (örn: sfenoid ve etmoidal)
- sesamoid kemikler (örn: patella)

Uzun kemiğin gönderine diyafiz denir. Eklem yüzeylerine ise epifiz denir. Büyüyen bir insanda epifiz ile diyafiz arasında, kıkırdak yapıda epifizyal plak vardır. Epifizyal plak ile diyafiz arasındaki geçiş yeri metafizdir. Metafiz bölgesindeki spongioz kemik kolonları kemik büyümesi sırasında uzamadan sorumludurlar. Diyafiz bölgesi, kasların ve tendonların yapışma bölgesi hariç periosteum ile sarılıdır. Sesamoid kemikler ve eklem yüzlerinde ise periost yoktur. Periost yoğun, kalsifiye olmayan, düzensiz bağ dokusu olup ‘Sharpey lifleri’ ile kemiğe tutunur.<sup>46</sup>

Kafatası yassı kemikleri uzun kemiklerden farklı bir şekildedir. İç ve dış yüzeyler iç ve dış tabula denilen yoğun kompakt kemik ve aralarındaki ‘diploe’ denilen kansellöz kemikten oluşmuştur. Dış tabulanın üstü periosteum, iç tabulanın içi duramater ile örtülüdür.

### **Kemik oluşumu ve iyileşmesi**

İnsan iskelet yapısında, kemikler embriyonik gelişimde iki farklı yolla oluşurlar. Bu durum, farklı bir kemik tiplendirmesini beraberinde taşımaktadır.

- 1) Endokondral kemikleşme,
- 2) İntramembranöz kemikleşme

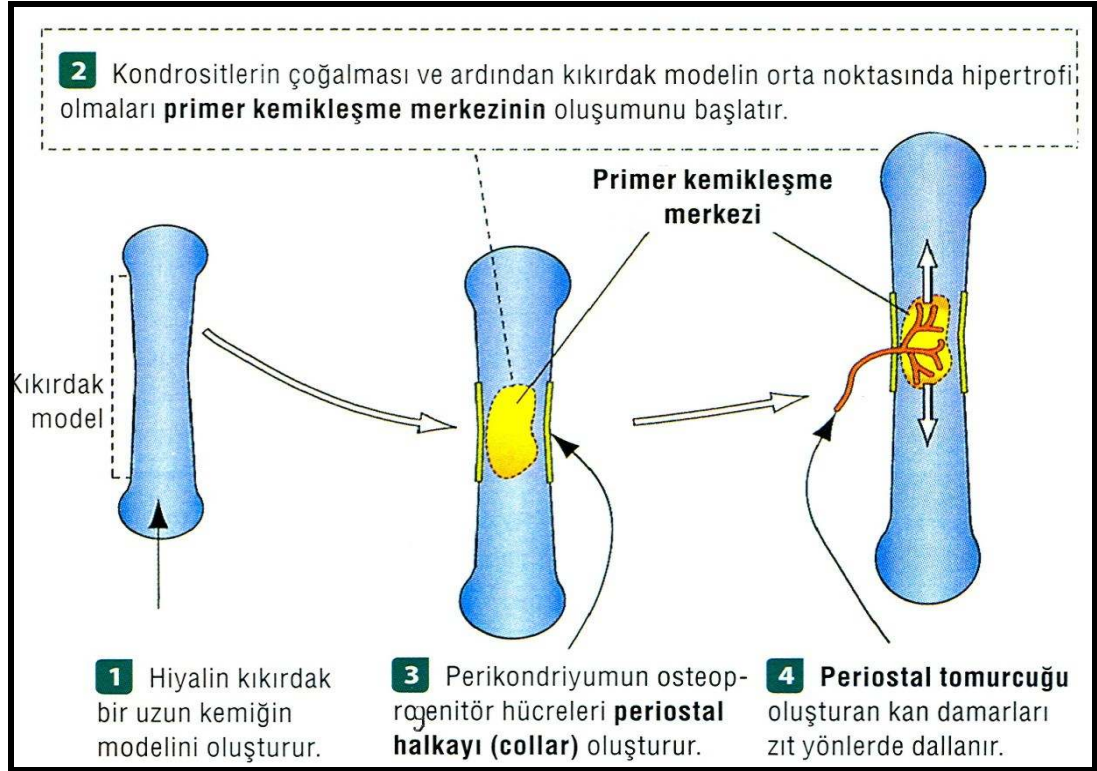
#### **1)Endokondral kemikleşme**

Kemik oluşumu için kıkırdak çatının varlığı gereklidir. Uzun ve kısa kemikler bu yolla kemikleşir. İki aşamada oluşur:

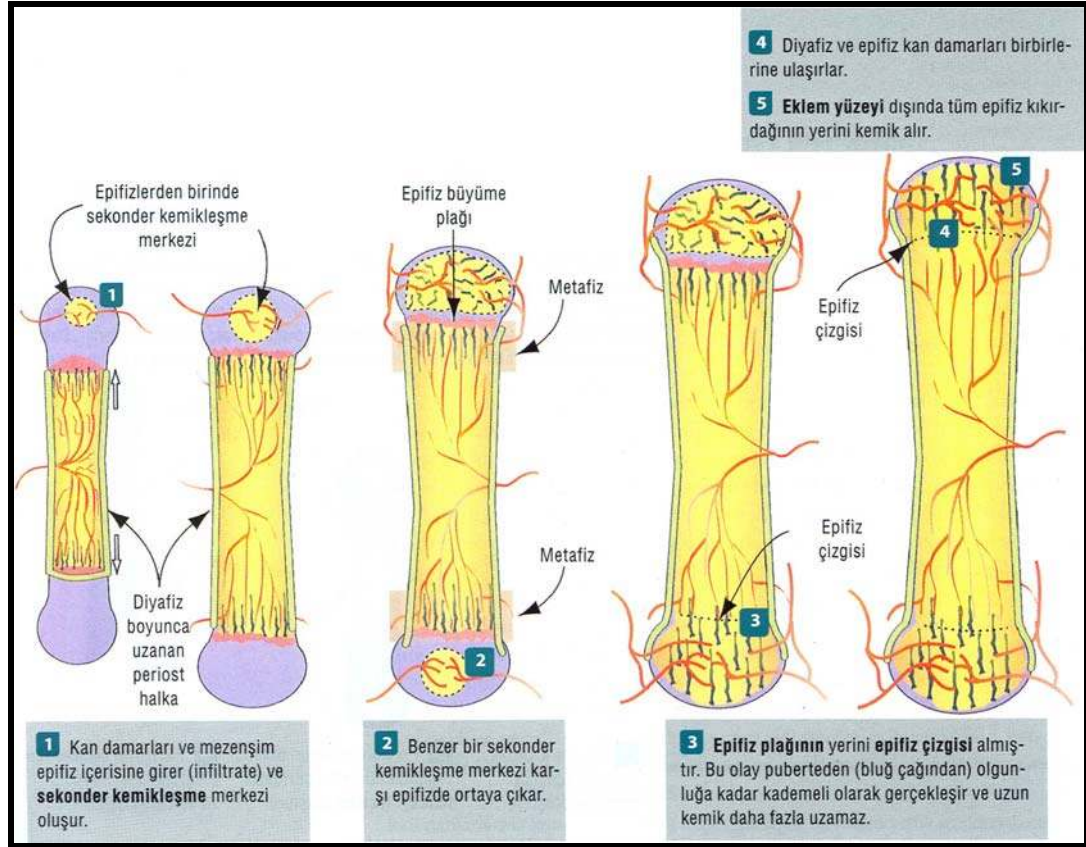
A- Hiyalin kıkırdak bir çatının oluşması

B- Kıkırdak yapının büyümesi ve kemik çatı için bir model olması, rezorbsiyonu ve yeni kemik oluşumu

Kemik oluşacak yerde hyalin kıkırdak bir model oluşur. Kıkırdak model içindeki kondrositler hipertrofiye uğrar, sitoplazmalarında glikojen depolarlar ve vakuolize hale gelirler. Kondrositler hipertrofi sonucu kalsifiye hale gelirler. Diyafiz kıkırdağındaki perikondrium damarlanır. Kıkırdak hücreleri osteoprogenitör hücrelere döner, perikondrium periosta döner. Yeni osteoblastlar kemik matriksi salgırlar ve intramembranöz kemikleşme yolu ile subperiosteal kemik manşet yapısının kıkırdak yüzey üzerinde oluşturlar. Kemik manşet kondrositlerin beslenmesine engel olur. Oluşan iskemi, kondrositlerde önce hipertrofiye, ardında diyafizin orta kısmından başlayarak tahrip olup, ölmelerine neden olur. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur ve bunlar ilerideki kemik iliği kavitesini meydana getirir. Kemik yapının aralarında osteoklastlar sayesinde periosteal delikler açılır ve bu delikler osteoprogenitör hücreler, hematopoetik hücreler ve kan damarları ile kıkırdak modele gerekli besin ve oksijeni sağlarlar. Damarlarla gelen kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalen fosfataz aracılığı ile birleşerek kıkırdak matrikse çöker ve böylece diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara farklılaşarak kalsifiye kıkırdak/kalsifiye kemik kompleksi haline gelir (**Şekil 3, 4**).



**Şekil 3:** Endokondral kemikleşme–birincil kemikleşme merkezinin oluşumu. **(1)** Hiyalin kıkırdak kemik model oluşumu. **(2)** Primer kemikleşme merkezinin oluşumu **(3)** Periosteal halkanın oluşumu. **(4)** Periosteal tomurcuk ile kan damarlarının oluşumu. (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 133, 2006).

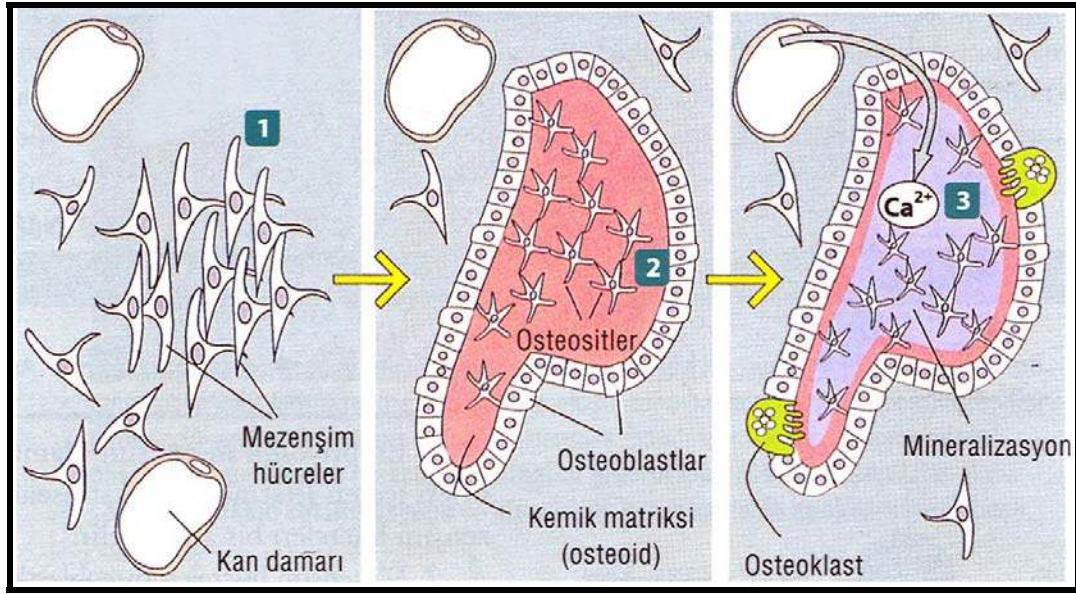


**Şekil 4:** Endokondral kemikleşme, ikincil kemikleşme merkezinin oluşumu. **(1)** Kan damarları ve mezenkim epifiz içerisine girer. **(2)** Benzer bir kemikleşme merkezi karşı epifizde ortaya çıkar. **(3)** Epifiz plağının yerini epifiz çizgisi almıştır. **(4)** Diyafiz ve epifiz kan damarları birbirlerine ulaşırlar. **(5)** Eklem yüzeyi dışında tüm epifiz kırırdağının yerini kemik alır. (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa134, 2006).

## 2) İntramembranöz kemikleşme

Mezenkimal dokular içerisindeki kemik oluşumudur. Çoğu yassı kemik bu yolla iyileşir. Organizmada kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın ‘processus coronoideus ve simfizisi’ dışındaki

bölgelerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşarak kemik matriksi oluştururlar. Oluşturdukları trabeküler kemik yapıları primer kemikleşme merkezi olarak adlandırılır. Trabeküllerin kollajen yapıları birbirine paralel yapıda değildir. Kalsifikasyon ve osteoid oluşumunu takiben osteoblastlar osteosit haline gelir. Mezenkimal hücrelerin mitotik çoğalması ile osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlar oluşur ve yeni kemik oluşumu devam eder. Kansellöz yapı içerisindeki trabeküler yapı yeterli olunca içlerindeki interstisyel vasküler bağ dokusu kemik iliği haline gelir. Oluşan bir çok kemikleşme merkezi birleşerek oksipital kemik gibi yapıları yaparlar. Fontaneller birleşmemiş kemikleşme merkezleridir. Kalsifiye olmayan mezenkimal hücreler periost ve endosteuma döner. Periostun iç tabakası ve duranın periosteal tabakası kompakt kemiğe dönerek iç ve dış tabakayı yaparlar<sup>46</sup> (**Şekil 5**).



**Şekil 5: (1)** İntramembranöz kemikleşme, mezenkimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesidir. **(2)** Mezenkim hücreleri hızlı bölünme gösterir ve önce osteoprogenitör hücreye farklılaşarak, sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler. **(3)** Kılcal damarlardan osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonları taşınarak, osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. Osteoklastlar kemikleri iç yüzlerinden rezorbe ederken, osteoblastlar da diğer bir taraftan yeni kemik lamelleri eklerler. Birincil kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar, geriye sadece ikincil kemik yapısındaki trabeküller kalır (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 131, 2006).

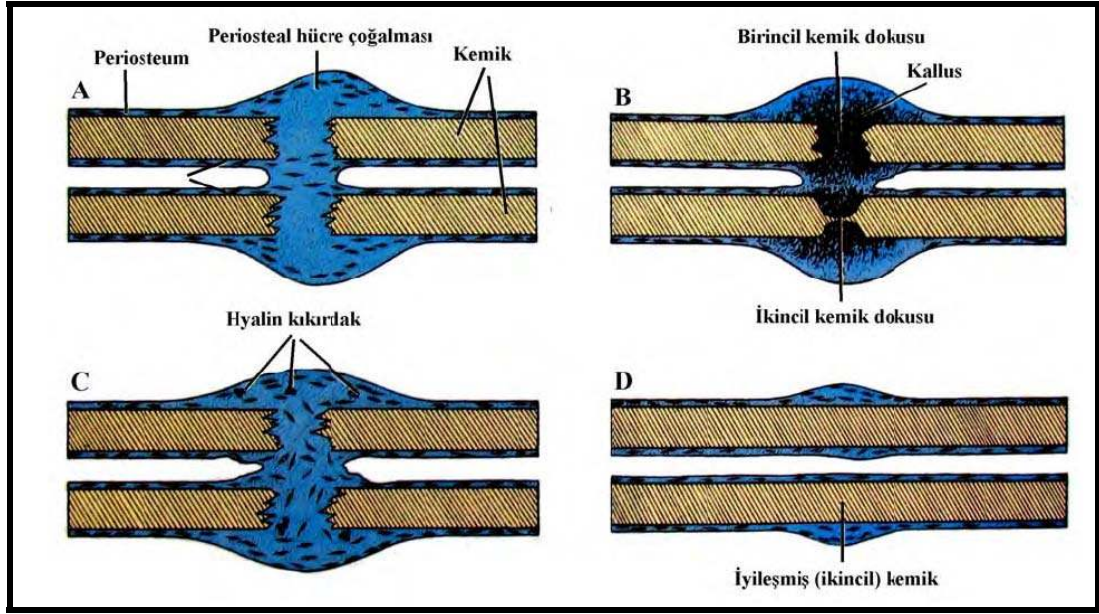
## KEMİK İYİLEŞMESİ

Zarar görmüş veya kırılmış bir kemiğin iyileşmesi ve onarımı bir dizi karmaşık biyolojik rejenerasyon olayını içeren bir süreçtir. Bu süreç içerisinde kemik bütünlüğünün bozulması osteoprogenitör hücreleri tetiklemektedir. Hücrelerin ve diğer mediatör ve faktörlerin devreye girmesi ile önce osteoindüksiyon daha sonra ise bu oluşumun içine yerleşeceği iskeletin oluşumu yani osteokondüksiyon tetiklenmektedir. Kemik iyileşmesi hem endokondral kemikleşme hem de intramembranöz kemikleşme yolu ile olur. Çoğunlukla kemik iyileşmesi 6 fazdan oluşmaktadır. Bu fazlar; 1) Etki, 2) İndüksiyon, 3) İnflamasyon, 4) Yumuşak Kallus, 5) Sert Kallus, 6) Yeniden şekillenme (remodelling) şeklinde sıralanmaktadır. Kemik kırığı, kemik matriksinin harabiyetine, hücre ölümüne, periost ve endosteumun yırtılmasına ve kemik uçlarının yer değiştirmesine neden olur. Kırık yerindeki damarlardan sızan kan, yaralanma alanında kan pıhtısına yol açar. Belirli bir süre sonra kan akımı durur ve hasarlı bölgeden geriye, anastomoz damarlarına doğru yeni bir kan akımı başlar. Bunun sonucu hasar her iki tarafta genişler çünkü bir çok Haversian sistemine kan gitmez. Lakünalar içindeki osteositler lizise uğrar. Kırık bölgesindeki kan pıhtısı içine çevre dokudaki küçük kılcal damarlar girerek granülasyon dokusunu oluştururlar. Aynı işlem kemik iliğindeki kan pıhtısında da olurken endosteum ve kemik iliğindeki çok yöne farklılaşan hücreler osteoprogenitör hücrelere farklılaşarak 1 hafta içinde iç kallusu yaparlar. Yaralanmadan 48 saat sonra periosteum altındaki ve endosteumdaki osteoprogenitör hücrelerin mitotik aktivitesi artar. Periost altında çoğalan osteoprogenitör hücrelerin kemiğe en yakın kısımları osteoblastlara dönüşerek kemik manşet yapmaya başlarlar. Kılcal damarların büyümesi osteoprogenitör hücre çoğalmasından daha yavaş olduğu için ortada kalan

prolifere olmuş osteoprogenitör hücreler azalmış oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücreler ve kondroblastlara dönüşerek kemik mantonun dış tabakasında kıkırdak yaparlar. Çoğalmış osteoprogenitör hücrelerin periosteuma yakın kısımlarındaki hücreler komşuluğundaki fibröz periosteumdaki kılcal damarlar sayesinde osteoprogenitör hücrelere dönüşürler. Sonuç olarak proliferen olmuş osteoprogenitör hücreler üç tabakaya ayrılmış olur:

1. İç kemikleşmiş tabaka
2. Ara kıkırdak tabaka
3. Çoğalmış osteojenik hücre dış tabakası

Her iki uçta oluşan bu manto tabakası her iki uçta birleşerek dış kallusu oluşturur. Ortadaki kıkırdak endokondral kemikleşme yolu ile, bunun etrafındaki tabakalar ise intramembranöz kemikleşme yoluyla kemikleşerek dış kemik manto büyür. Kırık uçları kanselöz kemik ile birleştikten sonra, primer kemik yapısının sekonder kemik yapısı ile değiştirilmesiyle yeniden şekillendirilme sağlanır. Kemiğe binen stres yükü yönünde yeniden şekillenme devam eder. Aksiyal yüklenme ile güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümü gerçekleşir (**Şekil 6**). Mekanik strese maruz kalan kemiğin dışbükey yüzü pozitif, içbükey yüzü negatif elektrik ile yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin egemen olduğu dışbükey yüzde geri emilim, osteoblastik aktivitenin hakim olduğu içbükey yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır. Yani ‘kırığın içbükey tarafında kemikleşme, dışbükey tarafında geri emilim’ olur.<sup>46,54,70</sup>



**Şekil 6:** Kortikal kemiklerde kemik iyileşme süreci. **(A)** Periosteum altındaki ve endosteumdaki osteoprogenitör hücrelerin mitotik aktivitesi artar. **(B)** Periosteum altında çoğalan osteoprogenitör hücrelerin kemiğe en yakın kısımları osteoblastlara dönüşerek kemik manşet yapmaya başlarlar. **(C)** Kılcal damar büyümesi osteoprogenitör hücre çoğalmasından daha yavaş olduğu için, ortada kalan proliferatif olmuş osteoprogenitör hücreler, azalmış oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücreler ve kondroblastlara dönüşerek kemik mantonun dış tabakasında kıkırdak yaparlar. **(D)** Kırık uçları kanselöz kemik ile birleştikten sonra, primer kemik yapısının sekonder kemik yapısı ile değiştirilmesiyle yeniden şekillendirilme sağlanır.

## **DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZİS**

Distraksiyon osteogenezis (DO), osteotomize kemik kenarlarının kademeli olarak ayrılması ile canlı kemik dokusunun oluşturulduğu yeni kemik rejenerasyonudur. Bu teknik, hastanın endojen hücrel etkinliğine dayanmakta ve kemik iyileşmesinin her aşamasını kapsamaktadır. Çeşitli kraniyofasiyal ve endokondral kemik defektlerinin tedavisi için, kemik rejenerasyonunu sağlayan indüktif cerrahi olarak gösterilen distraksiyon osteogenezis, son yıllarda tercih edilen bir yöntem olmuştur ve kullanımı artmaktadır. Distraksiyon osteogenezise ait ilk bildiri kısa olan alt ekstremitenin uzatılması girişimi olarak Codivilla tarafından yapılmıştır. Teknik en önemli ivmesini 2.Dünya Savaşı sonrasında, Rus ortopedist İlizarov ile yapmıştır. İlizarov, bacağa uygulanan eksternal fiksatörlerin yavaşça distrakte edilmesi ile kemik defektlerinde yeni kemik oluşumunu gözlemlemiş ve hayvan deneyi olarak dizayn edip biyomekanik özelliklerini ortaya koymuştur. Deneysel çalışmada; osteotomize kemiklerin yavaşça ve kontrollü olarak ayrılması ile ‘tension stress effect’ adını verdiği etkinin, metabolik aktivasyonu, anjiogenezi ve yeni kemik oluşumunu tetiklediği hipotezini oluşturmuştur. Takip eden yıllarda, yapılan farklı deneysel çalışmalarla, DO sürecini etkileyen mekanik (vida sağlamlığı, distraktörün duruşu ve sağlamlığı vb.) ve hastaya bağlı faktörler (yaş, osteotomi alanı, bölgesel kanlanma potansiyeli vb.) ortaya konmuştur. Yine bu çalışmalarda, DO süreci içindeki evrelerin özellikle de; osteotomi ile distraksiyonun başladığı an arasındaki sürenin (latans) ve distraksiyon evresindeki günlük distraksiyon mesafesinin önemi ortaya konmuştur.<sup>1,3,34,35</sup>

Synder ve ark. kraniyofasiyal alanda ilk uygulamayı köpeklerde gerçekleştirmişlerdir. Köpek mandibulasında günlük 1mm ilerleme ile 1.5 cm’ lik kemik defektinin onarımını gerçekleştirmişlerdir.<sup>76</sup> Daha sonra yine köpek

mandibulasında McCarthy ve Karp distraksiyon osteogenezis gerçekleştirmiştir.<sup>40</sup> Michieli ve Miotti intraoral yerleşimli distraktör ile deneysel çalışmalar içinde değişik özellikte bir distraktör cihazını kullanmışlardır.<sup>56</sup> 1992 yılında McCarthy ilk klinik uygulamalarına ait seriyi, 4 vakalık mandibular hipoplazi olgusunda mandibula distraksiyonu ile yayınlamıştı.<sup>52</sup> Günümüzde kraniyofasiyal alanda uygulamalar ve çalışmalar devam etmektedir. Kalvarium, ortayüz, zigoma, orbita ve sert damakta distraksiyon uygulamaları da yapılmaktadır.

### **Distraksiyon Osteogenezis Histolojisi**

Kemik iyileşmesindeki evrelerden farklı olarak DO sürecini oluşturan ve daha önce bahsedilen 3 ana evre mevcuttur. Sürecin doğru işlemesi ve başarılı bir sonuç elde edilmesi için bu evrelerdeki histoloji ve fizyolojik gelişmelerin tamamlanması gerekmektedir.

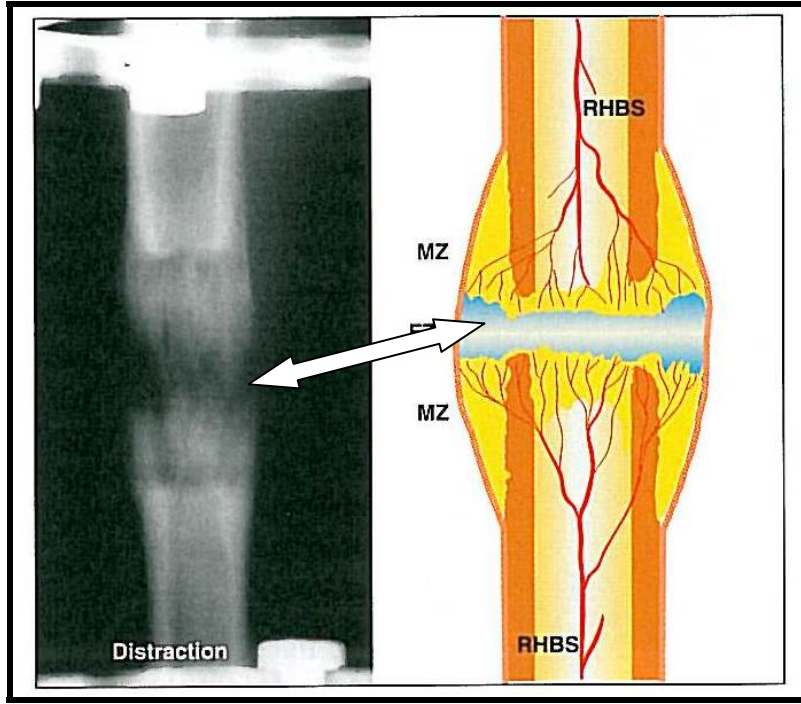
#### **1-Latans evresi:**

Latans evresi kemik segmentlerin birbirlerinden ilk ayrıldığı andan (kırılma veya osteotomi sonrası) distraksiyonun başladığı ana kadar geçen süredir. Bu süre içerisinde olan histolojik ve makroskobik olaylar kırık iyileşmesindeki ilk 3 basamak olan; etki (kırılma veya kesi), indüksiyon, inflamasyon periyodlarına benzetilebilir. Osteotomi inflamatuvar hücrelerin ve fibroblastların göçü, yeni kapiller oluşumu, sitokin ve mediatörlerin salınımı için belirlenmiş evredir. Anjiogenez ve hücre göçü en önemli iki mikroskobik değişkendir. Literatürde klinik uygulamalarda farklı süreler denenmiştir ve değişik sonuçlar alınmıştır. Oluşan genel eğilim ise latans evresinin kısalmasının kemik oluşması ve kaynamasına etkisinin olumsuz olduğu yönündedir. Literatürde en sık önerilen latans evresi 5-7 gündür.<sup>54</sup> Temel olarak inflamatuvar hücre göçü 3. günde tamamlanmaktadır. Sonraki dönemde ise yumuşak kallus dönemi takip eder. Deneysel ve klinik uygulamalarda bu süre 0 gün ile 10 gün

arasında latans uygulanmıştır. DO uygulanan kemik, kanlanma özellikleri, hastanın yaşı ve kortikotomi tekniği latans süresini etkileyebilir.<sup>86</sup>

## **2-Distraksiyon evresi:**

Distraksiyon evresi, osteotomi ile ayrılmış segmentlerin uygulanan traksiyon kuvvetleri ile kademeli olarak ayrılması ve segmentler arasındaki mesafenin artışı ile karakterize dönemdir. Latans evresi tamamlandığında distraksiyon başlar ve hedeflenen kemik uzunluğu elde edilinceye kadar belli ritim ve günlük açma oranı ile konsolidasyon döneminin başlangıcına kadar devam eder. Bu dönem aynı zamanda kemik iyileşmesi basamaklarında yumuşak kallustan sert kallus dönemine geçiş sürecini kapsar. Yumuşak kallusun oluşumunu takiben kademeli uygulanan traksiyon ile kallus dokusu distrakte edilmiş olur. Aynı zamanda İlizarov' un belirttiği 'tension stress effect' nedeni ile mikroçevrede değişiklikler olur. Anjiogenez, osteoblast aktivitesi, fibroblast proliferasyonu ve büyüme faktörleri artar. Yumuşak kallustan sert kallus basamağına geçiş distraksiyon nedeniyle kesilir veya gecikir. Böylece distraksiyon aksına paralel fibröz doku teşekkülü artarak devam eder. Distraksiyon döneminin sonuna doğru primer trabeküla oluşmaya başlar. Osteoid doku, osteoblastlar ve kollajen iskelet yerleşir ve mineralizasyon başlar. Esasında bu dönemde, kemik iyileşmesinin endokondral ve membranöz iki tipi de rol oynamaktadır<sup>1,19,39</sup> (Şekil 7).



**Şekil 7:** Arada radyolusent fibröz ara alan ve distraksiyonun ilk evreleri.( Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM.,*Craniofacial Distraction Osteogenesis*, Mosby Inc., St. Louis, Bölüm 2, sayfa 25. 2001)

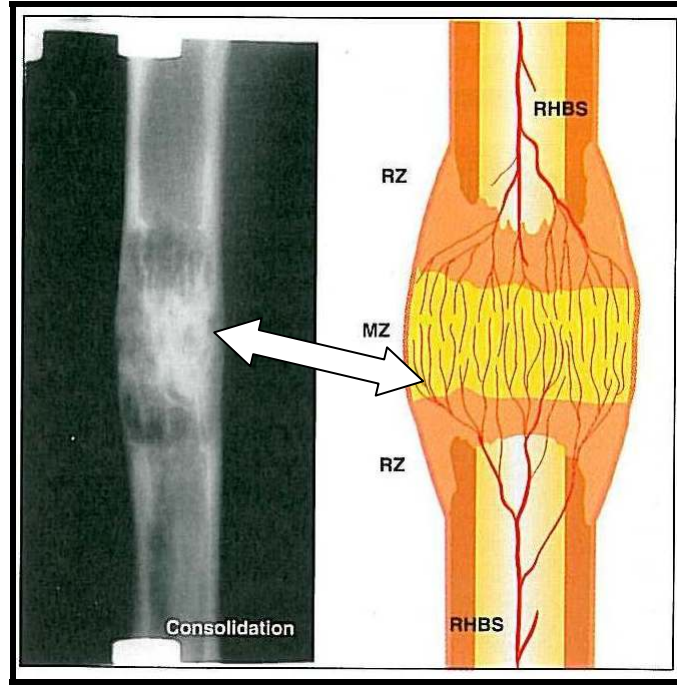
Distraksiyon dönemine etki eden en önemli faktör günlük çevirme miktarı ve her çevirmede kemik segmentler arası ayrılma mesafesidir. Ekstremitelerden yani uzun kemiklerden farklı olarak köpeklerde yapılan deneysel çalışmalar kraniyofasiyal cerrahide yeterli osteogenezis için günde 1-2 mm arası mesafe kadar açılması gerektiğini göstermiştir.<sup>9,25,39,40,76</sup> Günde 2 mm üzerinde distraksiyon uygulanan olgularda fibröz kaynamama izlenmiştir. Ayrıca günlük açma miktarının gün içinde eşit olarak bölünmesi de yumuşak kallusun uzatılması sürecinde olan mikro değişiklikleri arttırmaktadır. Günlük distraksiyon miktarının gün içinde 2 veya 3'e bölünmesi sayesinde distraksiyon sırasında kemik uzamasına eşlik eden kas, sinir, damarlar ve deri gibi yumuşak doku elemanları ve hatta komşu eklem yüzeyi zarar görmeden homojen bir şekilde adapte olabilmektedir.<sup>35,44,49</sup>

### 3-Konsolidasyon Evresi:

Konsolidasyon evresi distraksiyonun bitmesinden distraktör cihazının çıkarılmasına kadar olan süreyi kapsar, bu sırada distraksiyon sonunda oluşan fibröz doku köprüleri kemikleşmeye başlar. Her ne kadar her iki kemikleşme tipinin olduğu belirtilse de membranöz kemikleşme distraksiyonda biraz daha öne çıkmaktadır.<sup>70,83</sup>

Konsolidasyon dönemini etkileyen unsurlardan biri de distraktör cihazının, stabilitesi ve dolayısıyla kemik segmentlerin stabilitesidir. Bu stabilitenin bozulması halinde psödoartroza kadar uzanan sonuçlar ortaya çıkabilmektedir.<sup>35,42</sup> Konsolidasyon evresinin uzunluğu için farklı deneysel çalışmalarda farklı süreler bildirilmiş ve 4 haftadan kısa süren konsolidasyon evrelerinde yetersiz kemikleşme ve mineralizasyon bildirilmiştir<sup>18,69,70</sup> (**Şekil 8**).

Distraksiyon osteogenezis tedavisinin süresini kısaltmaya yönelik pek çok deneysel ve klinik çalışmalar halen yapılmaktadır. Latans veya distraksiyon ritm ve oranı üzerinde değişiklik yapılarak yeterli kemikleşmeyi daha kısa sürede elde etme çabaları vardır.<sup>23,47,59,60,77,80,84</sup> Konsolidasyon evresi, DO tedavi sürecinin en uzun evresidir. Konsolidasyon dönemine yönelik çalışmalar, histolojik değişimleri ve dolayısıyla yeterli kemikleşmeyi etkileyecek farmakolojik ajanlarla ve aynı zamanda süreyi kısaltması beklenen büyüme faktörleri ile yapılmaktadır.<sup>4,13,57,62,64,72,90</sup>

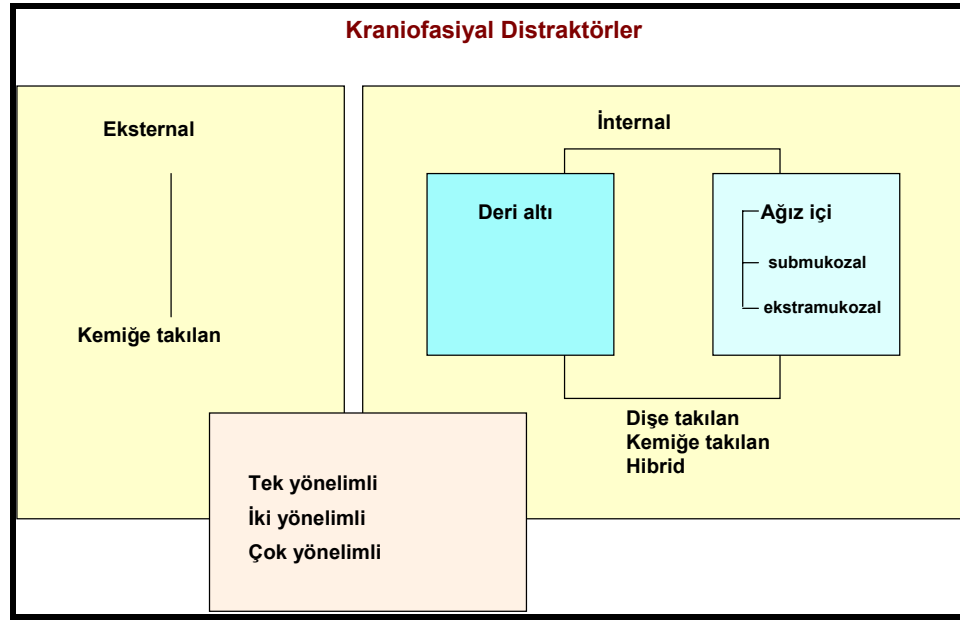


**Şekil 8:** Konsolidasyon dönemine ait şematik görünüm. Artmış mineralizasyon ile fibröz ara alan yerini kemikleşen kallus dokusuna bırakmış. (Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM., *Craniofacial Distraction Osteogenesis*, Mosby Inc., St. Louis, Bölüm 2, sayfa 26. 2001)

### **Distraktör Cihazlarının Gelişimi**

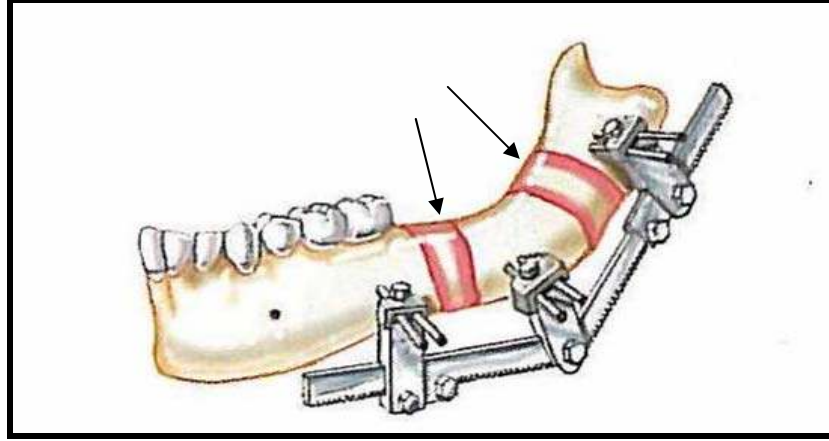
Kraniyofasiyal osteodistraksiyonda kullanılan iki ana tipe (eksternal ve internal) distraktör mevcuttur (**Şekil 9**). Eksternal distraktörler kemiğe perkütan vidalar ile tutturulur. Vidaların dışa uzanan uçları bir kısıkaç veya tutma mekanizmasına girer. Vidaları tutan kısıkaç veya mekanizma bir yandan da distraksiyon çubuğu denen ve dönebilen bir mile bağlıdır. Bu mil çevrildiğinde kırık hattının iki tarafındaki vidaların, dolayısıyla kemik segmentlerin birbirinden ayrılmasını sağlar. İnternal yerleşimli cihazlar kendi içlerinde alt gruplara ayrılırlar ve bu modellerin bir kısmı sadece ortodonti ve periodontolojide kullanılan distraktörlerdir. İnternal cihazlar daha az fark edilebilir olması ve tedavi sonrası

yüzde kalıcı iz bırakmaması nedeniyle avantajlıdır. Eksternal distraktörlerin kolay yerleştirilmesi, kolay manipulasyonu gibi avantajları olmasına rağmen hastalar, özellikle de çocuk hastalar uzun süre yüzlerinde taşıdıkları cihaz nedeni ile sosyal problemler yaşamaktadır.

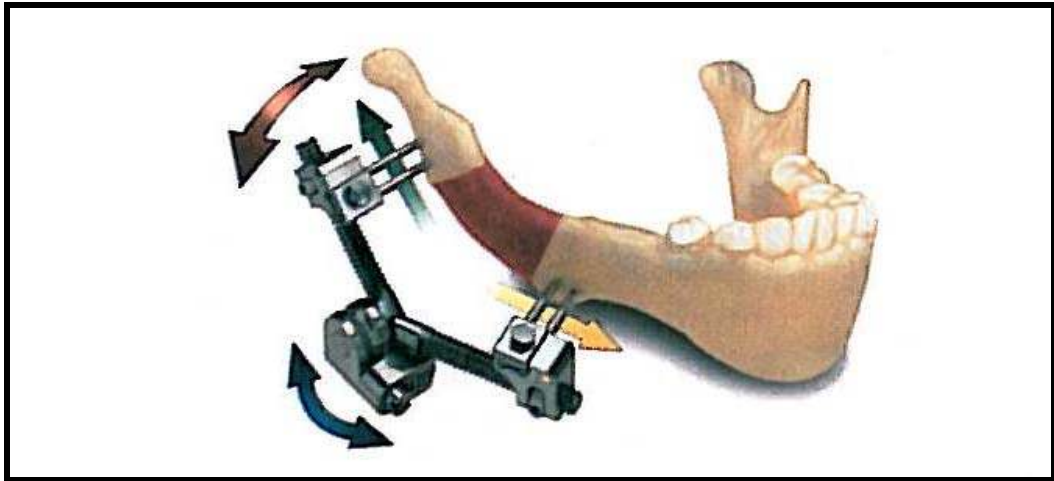


**Şekil 9:** Distraksiyon cihazlarının temel sınıflaması. (Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM., *Craniofacial Distraction Osteogenesis*, Mosby Inc., St. Louis, Bölüm 1, sayfa 9. 2001)

Distraktörlerin açılma ve kuvvet uygulama yönleri kemikleşme yönünü belirler. Uzun kemiklerde tek yönlü distraksiyon uygulanmakla beraber, kraniofasiyal cerrahide 2 veya 3 boyutlu yönelim gerekmektedir. Özellikle mandibula distraksiyonunda mandibulanın 3 boyutlu yapısı farklı yönlerde uzama gerektirmektedir. Tek yönlü uzatmalar oklüzal problemleri veya mandibula deformitelerini düzeltmek için yeterli olmayabilir.<sup>26</sup> Son yıllarda distraktörlerin kullanılan metal özellikleri ile hafiflemesi ve küçülmesi sağlanmıştır (**Şekil 10, 11**).



**Şekil 10:** Çok yönelimli distraktör ve 2 ayrı distraksiyon alanı.(↑) (Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM.,*Craniofacial Distraction Osteogenesis*, Mosby Inc., St. Louis, Bölüm 23, sayfa 232, 2001)



**Şekil 11:** Çok yönelimli eksternal distraktör. (Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM.,*Craniofacial Distraction Osteogenesis*, Mosby Inc., St. Louis, Bölüm 1, sayfa 11, 2001)

## DEMİNERALİZE KEMİK MATRİKSİ

İnsan kuru kortikal kemik ağırlığının %25'i kalsiyumdan oluşur. Kemik HCl solüsyonları ile demineralize edilerek organik matriks elde edilebilir.<sup>31</sup> Bu yapının büyük çoğunluğunu tip I kollajen yapar (Demineralize kemik matriksinin %93'ünü kollajen oluşturur). Diğer proteinler kemik morfojenik proteinler, insülin-benzeri büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve benzerleri olup demineralize kemik matriksi'nin yalnızca %5'ini oluştururlar. Kalan %2'lik kısım ise rezüdüel mineralize matrikstir. Amerikan Doku Bankası kuruluşu demineralize kemiği %8'den az rezidüel kalsiyum içeren yapı olarak tanımlamıştır.<sup>32</sup> Demineralize kemik matriksi osteoindüktif olmasının yanında, yapısındaki kollajen sayesinde osteokondüktif bir özelliği de vardır.<sup>20</sup> Asit demineralizasyon kemiğin demineralize edilmesinin yanında viral inaktivasyona da yol açtığından demineralize edilmemiş kemiğe göre hastalık transferi riski çok daha düşüktür.<sup>80</sup> Demineralizasyon işlemi kan elemanlarını da etkin bir şekilde ortamdan uzaklaştırdığından demineralize edilmemiş kemiğe göre daha az immünojeniktir.<sup>20,74</sup>

Demineralize kemik matriksinin osteoindüktif özelliği ilk defa Urist tarafından bildirilmiştir<sup>84</sup> ve 'de novo' kemik yapıcı özelliğinden 'kemik morfojenik proteinler (KMP)' sorumludur.<sup>14,48</sup> Kemik morfojenik proteinler küçük, hidrofobik, ısıya dayanıklı küçük molekül ağırlıklı glikoproteinler olup 'transforming growth factor-beta' (TGF-b) ailesinin alt gruplarıdır ve kemiğin organik matriksinde çok küçük miktarlarda bulunurlar (kemik organik matriksinin yaklaşık %0,1 ağırlığını oluştururlar). Demineralize kemik matriksi içerisinde 2'den 16'ya kadar olan KMP'ler bulunur.<sup>37,68,87</sup>

Kemik morfojenik proteinler, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) ortama kemoatraksiyonunu arttırarak kemik yapıcı hücreler yönünde farklılaşmalarını

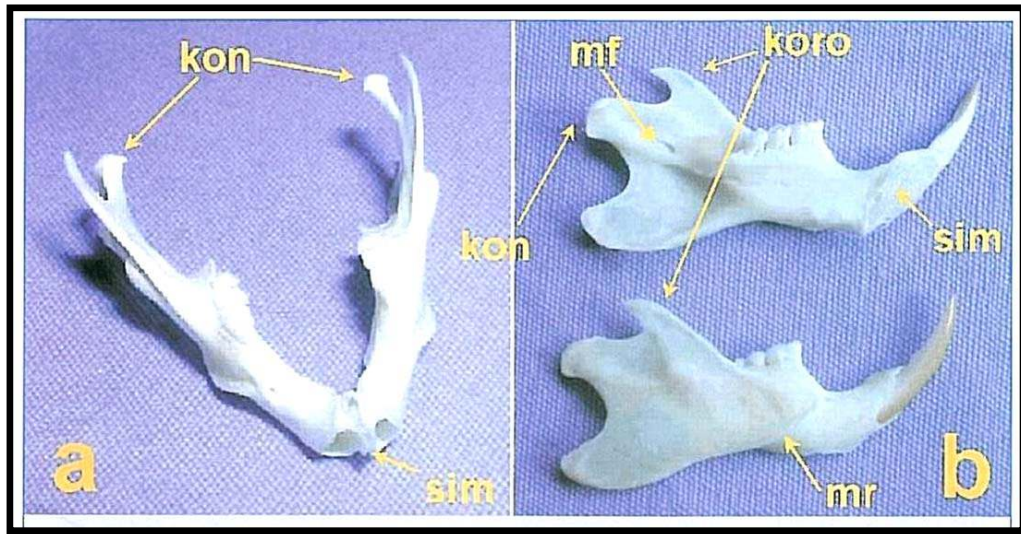
sağlarlar. Mezenkimal kök hücreler kondrositlere farklılaşarak kıkırdak bir iskelet sağlayıp endokondral kemikleşme yolu ile iyileşme sağlarlar.<sup>48,67,68</sup> Kemik morfojenik protein 2, 4 ve 7'nin kemik oluşumundaki etkisi bilinmekle beraber özellikle MKH'lerin terminal osteoblastik ön hücrelere dönüşümünde KMP 2, 6 ve 9 rol oynamaktadır.<sup>6,14</sup>

Lyofilize DKM uzun süredir doku bankalarında bulunmasına rağmen ameliyat sırasında kullanılmadan önce su, serum fizyolojik ve kan gibi maddelerle işleme tabii tutmak gerekmektedir. 1990'lardan sonra DKM'nin gliserin, kollajen, hiyalüronik asit ve diğer taşıyıcılar (gliserol, jelatin, kalsiyum sülfat, lesitin) ile kullanılması bazı uygulamalarda kullanımını kolaylaştırmıştır.<sup>45,50</sup> Taşıyıcı materyal biyouyumlu olup, toksik olmamalıdır. Aynı zamanda kemikleşme sürecini de etkilememelidir. Hiçbir materyal bu özellikleri taşımamakla beraber; geniş deneysel ve klinik uygulamalarda, DKM'nin lyofilize toz, macun (putty), blok ve diğer formlarının kabul edilebilir bir riskle osteoindüktif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir<sup>45,50</sup>.

Bu çalışmada kullandığımız demineralize kemik matriksi SureFuse® Gel (Hans Biomed, G.Kore) jel formunda olup içindeki taşıyıcı karboksimetil selülozdur. Biyouyumlu, toksik madde içermeyen osteokondüktif bir madde olup demineralize kemik matriksinin içeriğindeki yüksek BMP içeriği osteoindüktif etkiyi kuvvetlendirmektedir. Günümüzde kullanımda olan macun (putty) ve jel formunda pek çok ticari preparat mevcuttur ve ürünler arasındaki farklılığı içeriğindeki BMP konsantrasyonları ve taşıyıcı molekülün özelliği oluşturmaktadır. Ayrıca ürünlerin kolay uygulanabilme ve kullanım sırasında pratiklik sağlayan ek özellikleri de mevcuttur.

## SIÇAN KAFATASI ANATOMİSİ

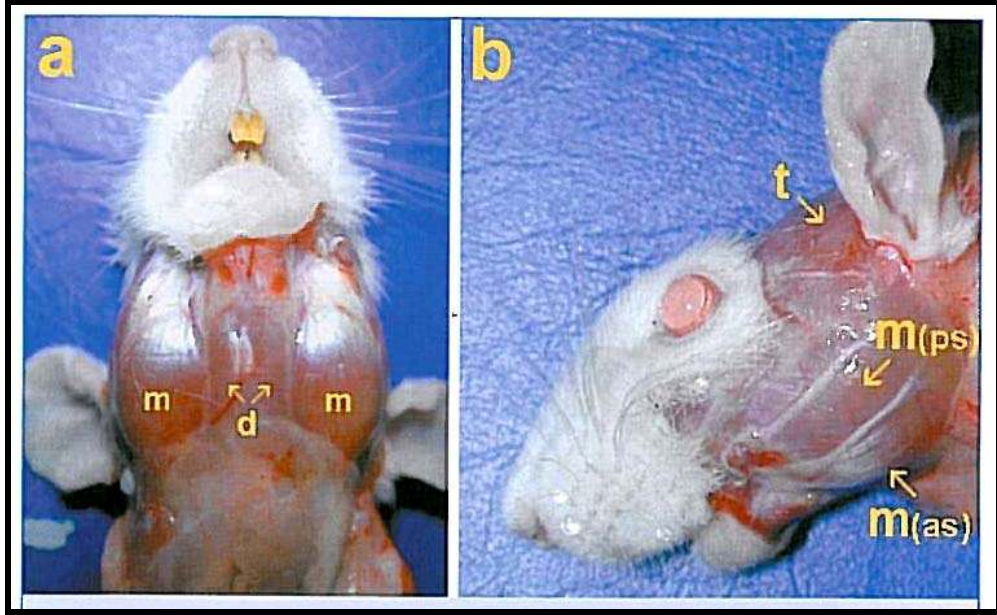
Laboratuvar sıçanı tipik bir omurgalıdır. İskelet sistemi ‘aksiyal’ ve ‘appendiküler’ bölümlere ayrılır. Aksiyal iskelet, kafatası, omurga, sternum ve kaburgaları, appendiküler iskelet ise pektoral kavşak, üst ekstremité, pelvis ve alt ekstremitéyi kapsar. Kemik olgunlaşması diğer memelilere göre sıçanda daha yavaştır. Mandibula kıkırdak yapıda simfisis ile birleşen iki parçadan oluşur. Mandibulanın tipik görüntüsünde belirgin koronoid çıkıntı ve hemen inferiorunda kondil belirgindir. Mandibulanın dış yüzeyinde masseter kasının yapıştığı masseterik çıkıntı mevcuttur<sup>7</sup> (Şekil 12).



**Şekil 12:** Sıçan mandibulasının anatomik görünümü. Üstten görünümde kemiğin inceliği görülürken lateral görünümde masseterik çıkıntı(mr) izlenmektedir. (Mehmet Bayramiçli, Deneysel mikrocerrahi. 1. baskı. Argos iletişim, İstanbul 2005, S:124).

Baş boyun kasları iki ana grupta incelenebilir. Birinci grup yüzeysel kaslar, ikinci grup ise çiğneme kaslarıdır. Çiğneme kasları dört çifttir. Masseter, temporalis, eksternal pterygoid ve internal pterygoid kaslar çeneyi kapatma ve çene hareketlerini sağlarlar. Çiğneme kasları arasında en kuvvetlisi olan masseter kası mandibulanın

angulus, posterior ve inferior kenarından başlar ve önde masseterik çıkıntıya yapışır. Kas üzerinde marjinal mandibular ve bukkal fasiyal sinirler bulunur<sup>7</sup>(Şekil 13).



**Şekil 13:** Çiğneme kasları ve kas üzerinde liflere paralel uzanan fasiyal sinir'in dalları. Alttan bakışta masseter kasının çene altına uzandığı görülmektedir (m). (Mehmet Bayramiçli: Deneysel mikrocerrahi. 1. baskı. Argos iletişim, İstanbul 2005, S:133).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın 05.04.2007 tarih ve B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/20-5530 sayılı izni ile Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nde gerçekleştirildi.

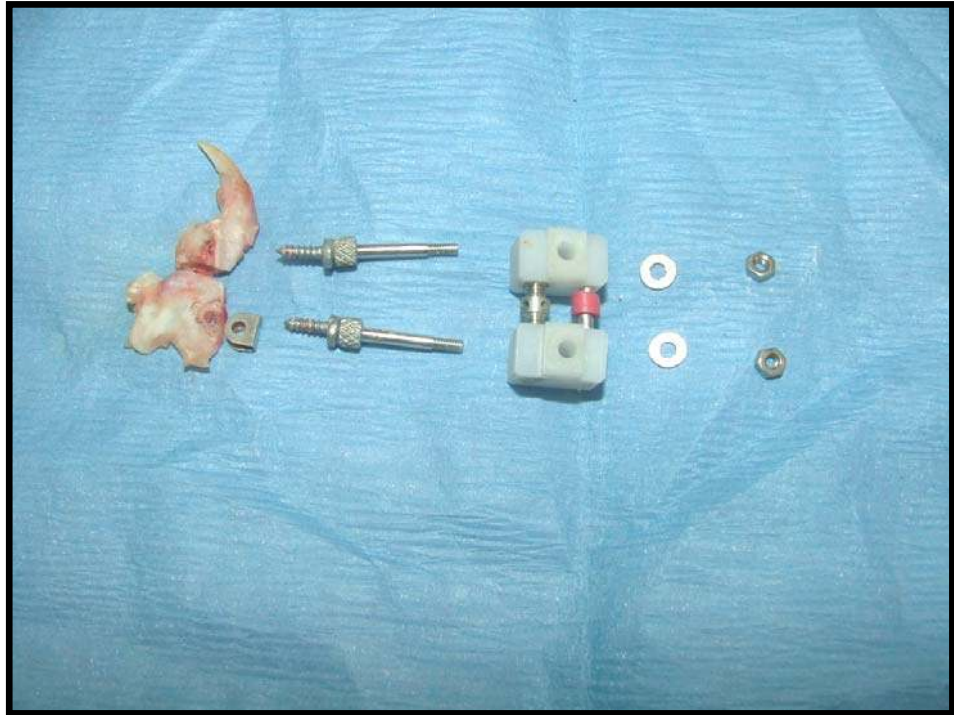
Çalışmada ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen 40 adet Wistar tipi erkek sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılan denekler ortalama 6 şar aylık, erkek, yaklaşık uzunluğu kuyrukla beraber 25 cm olarak seçildiğinden, dansitometre hesaplanması için girilen verilerde standardizasyon sağlandı. Çalışma boyunca denekler, veteriner hekim kontrolünde uygun kafeslerde, her kafeste 1 denek olacak şekilde ve uygun oda ısısı koşullarında, 12 saat karanlık–12 saat aydınlık olacak düzende takip edildi. Yem ve su ihtiyaçları 'ad libitum' olarak karşılandı. Yapılan cerrahi işlemin mandibulada olması nedeni ile deneklerin oral alım kısıtlılığı geliştiğinden, hayvanlara düzenli olarak her gün her sıçan için 50 cc muz aromalı pediatrik enteral ürün (PediaSure<sup>®</sup>, Abbott Laboratories, Zwolle, Hollanda) 50 cc musluk suyu ile seyreltilerek verildi.

Tüm cerrahi işlemler 50 mg/kg Ketamine-HCL (Alfamine<sup>®</sup> i.m. Alfasan International B.V. Woerden, Hollanda) ve 9 mg/kg Ksilazin HCL (Alfazyne<sup>®</sup>%2 i.m. Alfasan International B.V. Woerden, Hollanda) karışımı ile sağlanan anestezi altında, deney hayvanları ile çalışma sertifikası olan aynı cerrah tarafından ve standart cerrahi teknikler uygulanarak gerçekleştirildi.

Ameliyat sonrası birinci hafta sonrasından çalışmanın sonuna kadar olan sürede, cerrahi sahada enfeksiyon, distraktörün erken dönemde düşmesi ve oral alım azlığına bağlı ölüm nedeniyle 1. çalışma grubundan 9 adet, 2. çalışma grubundan 7

adet denek çalışma dışı kaldı. Bu deneklerin yerine aynı özellikte ve aynı işlemlerin gerçekleştirildiği yeni sıçanlar konularak grupların planlanan sayıları korundu.

Çalışmada kullanılan eksternal distraktör cihazı 12 mm'lik geçmeli vida ve bu vida üzerine takılmış 2 adet polivinil klorid bloklardan oluşmaktadır. İki blok arasında blokların hareketini sağlayan ikinci bir metal çubuk (distraksiyon mili) bulunmaktadır. Polivinil bloklar içinden metal çubuklara dik eksende kemikten gelen vidaların girebileceği delikler mevcuttur. Vidalar 2 mm kalınlığında ve 8 mm boyunda olup titanyumdan imal edilmiştir. Vida başına monte edilmiş diğer küt uçlu vida ise bloklar içindeki diklemesine uzanan vida deliklerinden girmekte ve distraktörün kemikle ilişkisini sağlamaktadır (**Şekil 14**). Distraktörlerin özelliği gereği distraksiyon vidasına atırılan 1 tur 1 mm' lik açılma sağladığından, her seferinde 90°'lik çeyrek tur ile 0,25 mm'lik açılma olmaktadır.

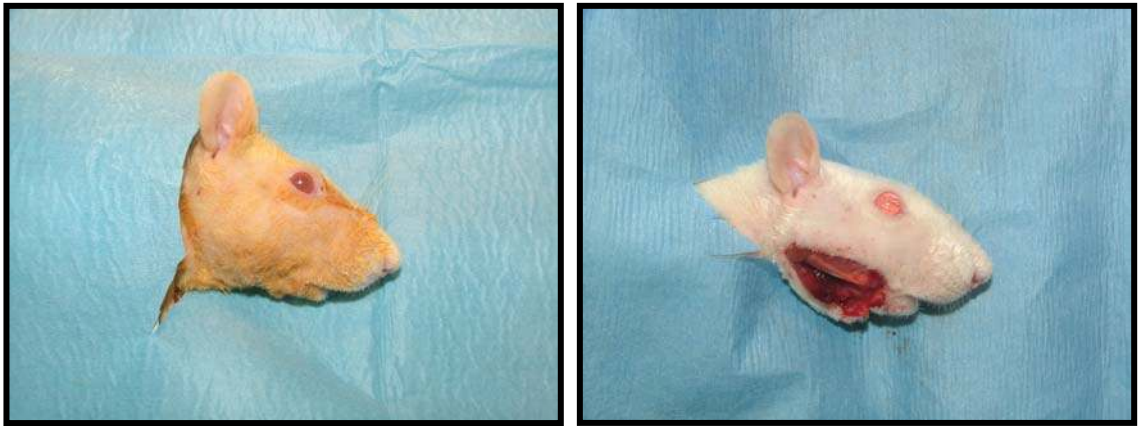


**Şekil 14:** Eski ve ark.<sup>21</sup> tarafından modifiye edilen distraktörün parçaları ve detaylı görünümü.

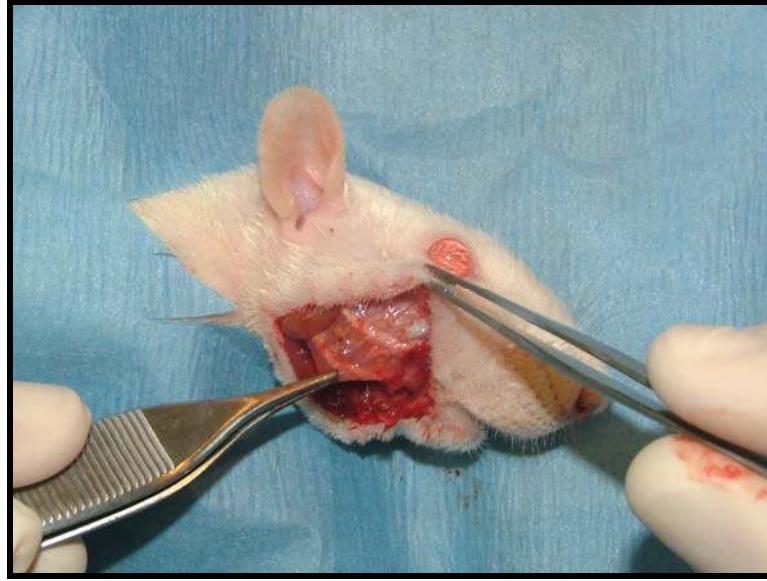
## CERRAHİ TEKNİK

Anestezi sağlandıktan sonra deneklerin kafa ve çene altı bölgesinin sağ yarısı tamamen traş edildi ve özel tespit kartonları üzerine sol yanlarına yatırılarak tespit edildi. Tüm gruplarda sağ mandibula çalışma için kullanıldı. Antisepsi amacı ile cerrahi alana Octenisept® (Oktenidin dihidroklorür, Schülke&Mayr, Almanya) uygulandı. Cerrahi işlem sırasında Eski ve ark. tarafından tarif edilen, mandibula stabilizasyonuna yardımcı olması ve hava yolunu açık tutması açısından üst ve alt kesici dişler arasına serum setinden kesilen 1 cm'lik parça yerleştirildi.<sup>21</sup> Cerrahi işlemler için no:15 bistüri, sivri uçlu eğri makas ve kemik üzerindeki yumuşak dokuların kaldırılması için dissektör kullanıldı.

Ameliyata sağ mandibula alt kenarı palpasyonla hissedilerek masseter kasının en belirgin alt kısmı üzerine denk gelecek şekilde deri kesisi yapıldı. Deri flebi superiorda zigomatik arkın üzerine, inferiorda submandibular alana, medialde ağız kenarına ve posteriorda parotis bezinin üstüne kadar diseke edilerek kaldırıldı. Masseter kası üzerinde seyreden Fasiyal sinirin marjinal mandibular ve bukkal dalları korunarak, mandibula alt kenarına yakın yerden kas dokusu liflerine paralel olarak kesildi (Şekil 15, 16).



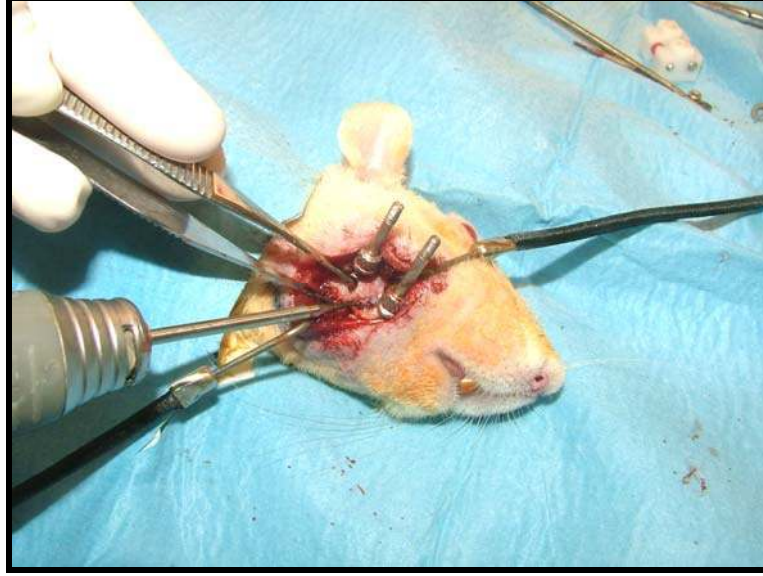
**Şekil 15:** Cerrahi sahanın, sağ yüz yarısının hazırlanması ve deri, kas kesisinin yerleşimi.



**Şekil 16:** Masseter kası ve üzerindeki fasiyal sinire ait dallar korundu.

Kemiğe ulaşıldığında disektör ile kemik tüm yönlerde açığa çıkarıldı. Ardından, standart osteotomi hattından eşit uzaklıkta anterior ve posteriorda olacak şekilde 2 adet delik, 1,6 mm'lik matkap ucu kullanılarak, MIO NE116 (Nakanishi INC, Japonya) tur motoru ile açıldı. Distraktör cihazını taşıyacak ve kemik segmentlerle ilişkiyi sağlayacak 2 mm kalınlığında vidalar yerleştirildi ve bikortikal olarak tutması sağlandı. Daha sonra en arka molar dişin hemen arkasından başlayıp mandibula alt kenarında masseterik kasının yapıştığı tuberöz alan ile posterioru arasındaki hat üzerinden tam kat osteotomi, 0,8 mm elmas uçlu topuz (burr) kullanılarak 3000 motor devri ile gerçekleştirildi (**Şekil 17, 18**). Takiben, Eski ve ark.<sup>21</sup> tarafından modifiye edilip geliştirilen sıçan mandibular eksternal distraktörü (Modelsan, Ankara, Türkiye), polivinil klorid içindeki vida deliklerine kemiğe takılmış vidalar girecek şekilde yerleştirildi (**Şekil 19**). Distraktörün yerleştirilmesinden sonra kemik segmentlerin distraktör yardımı ile birbirlerinden ayrılıp yaklaştırılması sağlanarak cihazın çalışması kontrol edildi. Son olarak

masseter kası emilebilir 5/0 Vicryl dikildi. Deri insizyonu vidaların çıktığı noktalar dışında distraktörün altında olacak şekilde 5/0 Prolen ile dikildi.



**Şekil 17:** Standart noktalar arasında, 0.8 mm'lik elmas uçlu topuz 'burr' ile osteotominin gerçekleştirilmesi.



**Şekil 18:** Yapılan bikortikal standart osteotominin görünümü.(↑)

Distraksiyon öncesinde 5 günlük latans periyodu uygulandı. Latans döneminde hayvanlara rutin beslenme ve bakıma devam edildi ve ek bir cerrahi işlem yapılmadı. Latans dönemini takiben distraksiyon evresine başlandı.

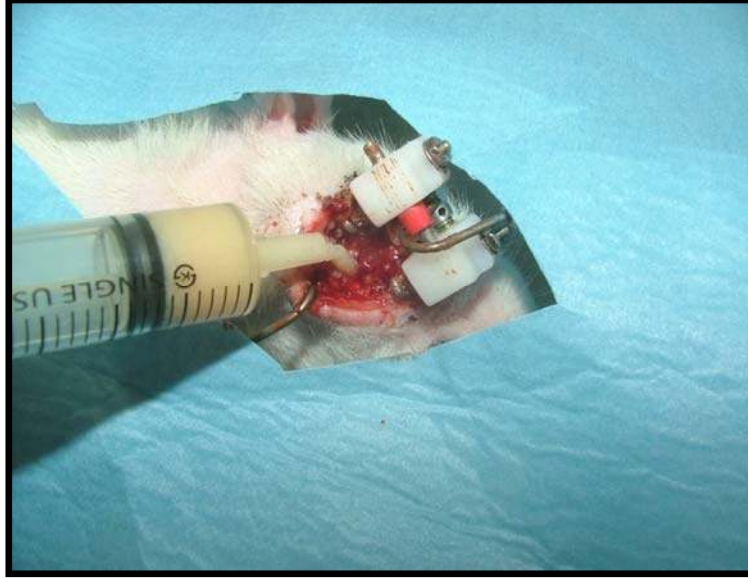


**Şekil 19:** Distraktörün yerleştirilmesi sonrası pozisyonu

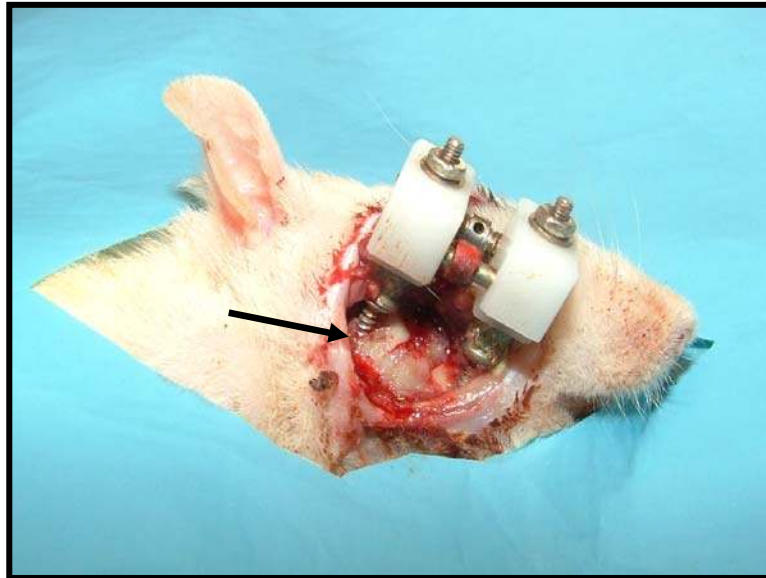
Distraksiyon evresinde, Paccione ve ark. tarafından belirlenen ve sıçan mandibula distraksiyon çalışmalarında yeterli kemik oluşumunu sağlayan ritim ve oran protokolu uygulandı.<sup>63</sup> Günde, 2 kerelik ritim ile ve her seferinde 0.25 mm' lik çevirme oranı ile 0,5 mm'lik açılma uygulandı. Altı günlük distraksiyon evresinde toplam 3 mm'lik açılma ve ilerletme sağlandı. Distraksiyon işlemi, özel kalın eldiven giymiş ikinci bir kişi tarafından hayvanın ön ve arka bacakları altta kalacak şekilde elle tutulurken, araştırmacı tarafından özel distraktör açma anahtarı kullanılarak gerçekleştirildi. Altı gün süren distraksiyon evresinden sonra 4 haftalık konsolidasyon dönemine geçildi.

Konsolidasyon döneminin ilk gününde, deneklere kısa süreli anestezi uygulanarak eksternal distraktör altında kalan insizyonun osteotomi hattı üzerine

gelen kısmı 1 cm kadar açıldı Distrakte edilen bölgenin ortaya çıkarılmasından sonraki uygulamalar çalışma gruplarına uygun gerçekleştirilerek; grup 2'deki deneklerin, kemik kesisi üzerine 1cc serum fizyolojik uygulandı. Grup 1'e ise, kesi hattı üzerine SureFuse® marka demineralize kemik matriksi 0,2 cc uygulandı (**Şekil 20 ve 21**) ve 1 cm lik alan tekrar kapatıldı.



**Şekil 20:** Distrakte edilen kemik aralığına DKM uygulanması.



**Şekil 21:** Kemik aralığını doldurmuş DKM görülmekte (↑).

## ÇALIŞMA GRUPLARI

Cerrahi işlemler 40 adet sıçanda 3 ayrı grup oluşturularak gerçekleştirildi.

**Grup 1** (Cerrahi deney grubu), (n=16): Distraksiyon osteogenezis uygulandı ve konsolidasyon döneminin başında distrakte edilen mesafeye DKM uygulandı. Konsolidasyon döneminin ikinci haftasında gruptaki deneklerin yarısı (n=8) histolojik değerlendirme için sakrifiye edildi. Diğer denekler (n=8), dördüncü haftada sakrifiye edilerek kemik dansitometrik inceleme ve histolojik değerlendirme için kullanıldı.

**Grup 2** (Kontrol grubu), (n=16): Distraksiyon osteogenezis uygulandı ve konsolidasyon döneminin başında distrakte edilen mesafeye 1 cc serum fizyolojik uygulandı. Konsolidasyon döneminin ikinci haftasında gruptaki deneklerin yarısı (n=8) histolojik değerlendirme için sakrifiye edildi. Diğer denekler (n=8), dördüncü haftada sakrifiye edilerek kemik dansitometrik inceleme ve histolojik değerlendirme için kullanıldı.

**Grup 3** (Cerrahi kontrol grubu), (n=8): Deri, kas kesisi ve kemik üzerinde disseksiyon yapıldı. Ek bir işlem yapılmadan tabakalar 5/0 Vicryl ve 5/0 Prolen dikişle dikildi. Cerrahi kontrol grubu, konsolidasyonun 4. haftasını tamamlayan diğer çalışma gruplarındaki deneklerle beraber sakrifiye edilerek kemik dansitometrik inceleme için kullanılmıştır.

## DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

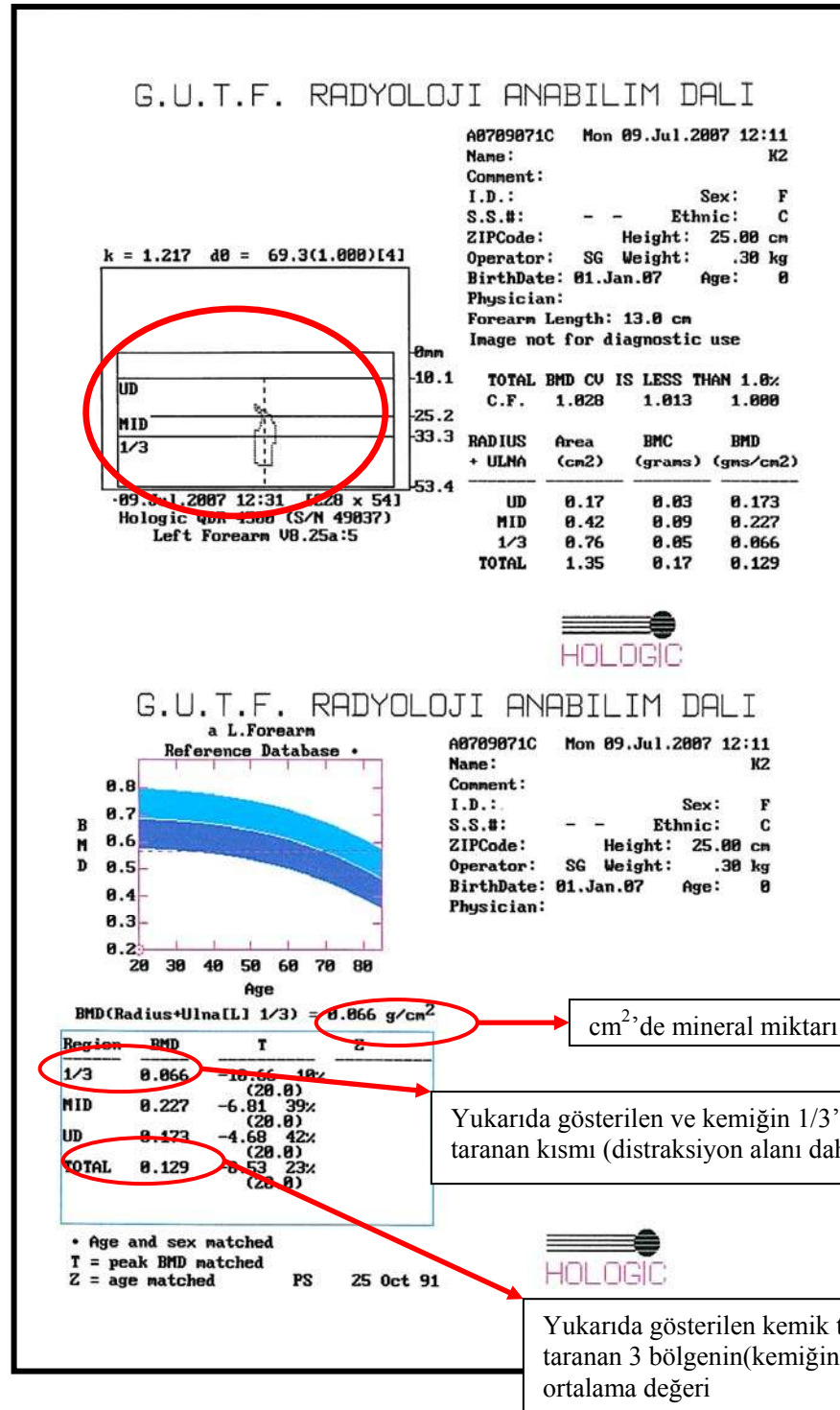
### A) GENEL DEĞERLENDİRME

Çalışma sürecinde deneklerde gözlenen genel sağlık durumu değişiklikleri, yara yeri problemleri ve distraktör cihazına uyumları takip edildi. Yapılan gözlemler ile, bu ve benzeri çalışmalarda dikkat edilmesi gereken, sonuçları etkileyebilecek bazı durum ve değişiklikler belirlendi. Ayrıca çalışma sonunda, elde edilen sonuçların makroskobik değerlendirilmesi ve büyütülmüş x-ray görüntüleri incelendi.

### B) KEMİK YOĞUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dört haftalık konsolidasyon dönemini tamamlayan sıçanların sağ hemimandibulektomisi çevre yumuşak doku ile beraber gerçekleştirildi. Çıkarılan mandibulaların kemik dansitometrik ölçümleri, kemik metabolizması ünitesinde Hologic QDR 4500C (Hologic Inc., Bedford, MA, USA) cihazı ve cihazla eş zamanlı çalışan kendi bilgisayar yazılımı ile gerçekleştirildi. Bilgisayar yazılımına hayvana ait daha önce belirtilen standart yaş, cinsiyet, kilo ve uzunluk verileri girilerek standartizasyon sağlandı.. Kemiğin boyutları insan el bilek kemiklerinin boyutlarına yakınlığı sebebiyle el bilek modu seçilerek dansitometrik ölçüm yapıldı. Kemik dansitometrisi ölçümü aynı teknisyen ve aynı cihazla ve kemikler cihaza aynı şekilde yerleştirilerek gerçekleştirildi. Tüm mandibuler kemikler lingual yüzeyi alt tarafta ve kemiğin uzun aksı masanın uzun aksına paralel ve C kolunun işaret lazeri tam spesimenin üstüne gelecek şekilde yerleştirildi.

Cihaz kemiği taradıktan sonra bilgisayar yazılımı, dansitometrik değerleri ( $\text{g/cm}^2$ ) kemiği 3 eşit parçaya bölerek ve ayrıca total olarak vermektedir. Total değerlendirilmesinin yanı sıra, elimizdeki 4 adet rakamsal veri içinden kırık hattını içinde bulunduran 1/3 lük değerler de alınarak daha spesifik bir değerlendirme yapılmıştır (**Şekil 22**).



Şekil 22: Kemik mineral dansitometrisi ölçüm sonuç raporu ve değerlendirilen veriler.

### C) HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Grup 1 ve 2'de bulunan tüm denekler sakrifiye edilerek sağ hemimandibulektomileri gerçekleştirildi. Kemik yapılar deneklerden eksize edildikten sonra yumuşak dokularından ayrılıp serum fizyolojikle yıkanarak %10'luk formolin solüsyonunda tespit edildiler. Ardından akan musluk suyunda yıkanan kemik dokular %10'luk formik asit solüsyonunda dört hafta boyunca dekalsifiye edildiler. Yeniden musluk suyunda yıkanıp tespit edilen dokular alışılagelmiş histolojik doku takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldüler.

#### **1. Hematoksilen–Eozin (H.E.) boyası:**

5 µm kalınlığında alınan kesitler, önce 60°C' de etüvde ve ksilolde deparafinize edildikten sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildiler. Havada kuruyan doku kesitleri hematoksilende 10 dk boyandıktan sonra musluk suyunda yıkandı ve %3'lük amonyaklı suya daldırıldı. Yeniden musluk suyunda yıkanan dokular 10 dk. eozin ile boyandılar. On dk' lık yıkamanın ardından artan alkol serilerinden geçirilip dehidrate olan dokular ksilolde 45 dk bekledikten sonra entellan ile kapatıldılar

#### **2. Masson-Trikrom yöntemi:**

Dokulara Bio-Optica'nın anilin mavili Masson trikrom boyası uygulandı (Bio-Optica Masson tricromica Cat no: 04-010802, Milano S.p.a, via San Faustino, 58, 20134 Milano, ITALIA). Doku kesitleri azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suya kadar indirgendiler. Eşit hacimde Weigert's demirli hematoksilen A ve B solüsyonları karıştırılarak kesitlerin üzerine damlatılarak 10 dk bekletildiler. Ardından solüsyon drene edilerek pikrik asit alkolik solüsyonu 4 dk süreyle uygulandı. 3-4 saniye distile suda yıkanan kesitler Mallory'nin Ponceau Asit Fuksin boyası içinde 4 dk süreyle bekletildi. Ardından distile suda yıkanan kesitlere

fosfomolibdik asit solüsyonu damlatılıp 10 dk bekletildi. Daha sonra Masson'un anilin blue boyası 5 dk süreyle uygulanarak kesitler distile suda yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilen kesitler ksilende parlatılarak entellan ile kapatıldı.

### **3. İmmünohistokimyasal yöntem:**

Parafin bloklara gömülen doku kesitleri polilizinli camlara alındı. 37 °C' lik etüvde 1 gece, deparafinize edilen lamlar 2 kez 15'er dakika ksilolde, 10'ar dakika %100, %96 ve %80'lik etil alkolde dehidrate edilerek distile suya kadar indirgendiler. Ardından MMPase-2 (LabVision Corporation, Fremont, CA,USA) ve Caspase-3 (LabVision Corporation, Fremont, CA, USA) ile immünohistokimyasal boyama yapılacak kesitlere, %10'luk sitrat tamponu (0,1 M) solüsyonunda yüksek dereceli mikrodalgada 20 dk 'retreival aşaması' (parafin blok içinde hidrofobik ortamdan dolayı maskelenmiş antijenlerin açığa çıkarılması) uygulandı. Ardından dokular oda ısısına kadar soğuduktan sonra, 2 kez distile sudan geçirilerek tuzlu fosfat tamponunda (PBS) yıkandılar. Bu aşamada dokuların etrafı hidrofobik kalemle sınırlandı ve ardından 15 dk hidrojen peroksitte inkübe edilerek 3 kez 5'er dk PBS'de yıkandılar. Beş dakika Ultra V blokta bekletilen dokulara MMPase-2 ve Caspase-3 primer antikorları 1:100 oranında dilüe edilerek uygulandı. Primer antikor aşamasında dokular oda ısısında 1 saatlik süreyle inkübe edildiler. Ardından tekrar PBS ile yıkanan dokulara 15 dk süreyle sekonder antikor ve peroksidaz uygulandı. Kromojen aşamasında AEC'de 10 dk bekletilen dokular yeniden PBS ile yıkanarak Mayer's hematoksilen (LabVision) ile zıt boyama aşamasına alındılar. Akan musluk suyunun altında yıkanan dokular su bazlı yapıştırıcı ile kapatılarak Leica DM 4000 B imaj analizörlü fotoşık mikroskobunda değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal değerlendirme sonunda, distraksiyon osteogenezis yapılan alanda matriks dönüşümü, apoptozis varlığı incelenerek iyileşme dokusunun dinamiği ortaya kondu.

Histolojik değerlendirmede, hematoksilen eozin ile boyanan grup 2 ve 3 deneklerine ait dokular ışık mikroskopunda incelenerek derecelendirme yapıldı. Derecelendirme kriterlerinde, Paccione ve ark. tarafından yapılan derecelendirme göz önünde bulundurularak ve birtakım kriterler saptandı.<sup>61,63</sup> Derecelendirmeye, immünohistokimyasal inceleme (MMPase-2 ve Caspase-3) dahil edilmedi. Her grup için elde edilen 2. ve 4. hafta değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Derecelendirme:

Hematoksilen-eozin ile boyanmış, ışık mikroskopik kesitlerde;

**G0:** Distraksiyon uygulanmış kemikler arasında herhangi bir onarım dokusunun oluşmamış olması.

**G1:** Trabeküllerden oluşmuş, aralarında kemik iliğinin bulunduğu, spongioz yapıdaki karşılıklı uçlar arasında, düzensiz, ince çaplı kollajen lifler, çoğunluğunu fibroblastların oluşturduğu bağ dokusu hücre elemanları, rudimenter dikensi kemik çıkıntılarından oluşmuş interkallus dokusunun olması.

**G2:** Distraksiyon uygulanan uçlar arasındaki onarım dokusunun G1'e göre daha kalın çaplı ve daha düzenli kollajen lifler ile fibroblast ve diğer bağ doku hücre elemanlarından oluşmuş daha fibröz yapıda bir doku olması.

**G3:** Distraksiyon uygulanan uçlar arasındaki onarım dokusunun, ortada kondroblast ve kondrositlerden oluşan bir kıkırdak ön model ile periferinde kemik trabeküllerine dönüşen bölgenin varlığı.

**G4:** Karşılıklı kemik uçlar arasındaki fibröz bağ dokusu ile arasında ossifikasyonun gerçekleştiği kemik adacıklar ya da kemik trabeküllerinin olması.

#### D) İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Değerlendirilen tüm parametrelerden elde edilen veriler istatistiksel değerlendirme için ‘SPSS for Windows v.12.0’ programına (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) aktarıldı. Tüm verilerin ortalama ve standart sapmaları hesaplandı. İki gruplu karşılaştırmalarda bağımsız değişkenler için çift yönlü non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi, 3 gruplu karşılaştırmalarda ise non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi kullanıldı.  $p < 0,05$  seviyesi anlamlı olarak kabul edildi.

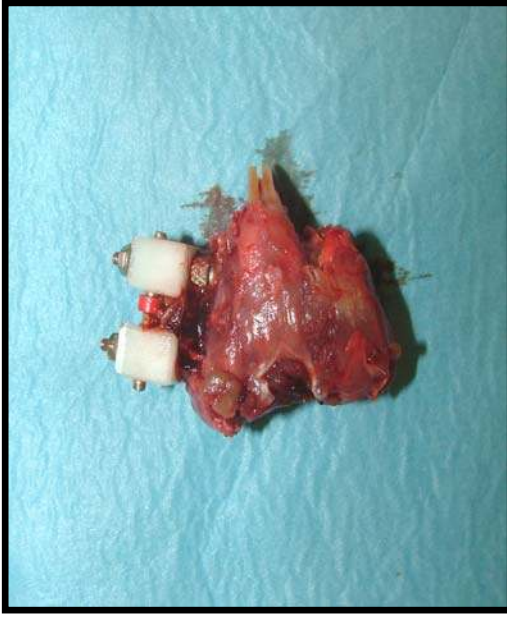
## BULGULAR

### A) GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

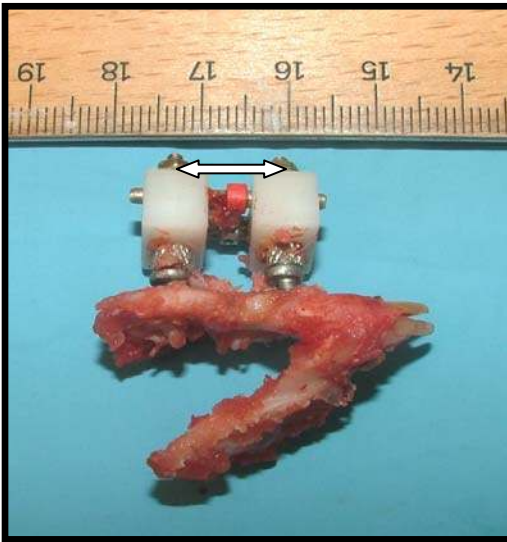
Çalışma sürecinde, cerrahi sahada enfeksiyon, distraktörün ayrılması ve oral alım azlığına bağlı ölümler nedeni ile grup 1'den 7 adet, grup 2'den 9 adet sıçan çalışma dışı kaldı. Bu deneklerin yerine aynı özellikte ve aynı işlemlerin gerçekleştirildiği yeni sıçanlar konularak grupların planlanan sayıları korundu ve çalışmaya 8'i kontrol, 32 tanesi distraksiyon uygulanan denek dahil edildi. Cerrahi kontrol grubu dışındaki diğer iki grupta sağ hemimandibulada değişiklik, sağ yüz yarısında yumuşak dokuda sola göre kısmi atrofi gözlemlendi. Çalışmanın erken döneminde  $15\pm 5$  gramlık ağırlık kaybı yaşansa da günlük verilen 50 cc muz aromalı PediaSure® ile çalışmaya dahil edilen hayvanlar 250-300 gr civarında kilolarını korudular. Konsolidasyon döneminin son iki haftasında da tekrar yemlerini kemirme işlevlerine geri dönmeye başladıkları izlendi. Enfeksiyona bağlı çalışma dışı kalan deneklerde (4 adet), cerrahi esnasında oral mukoza hasarı ve buna bağlı oral kavitenin açık hale gelmesi ile enfeksiyonların oluştuğu gözlemlendi. Distraktörlerin erken ayrılmasına bağlı çalışma dışı kalan deneklerde (8 adet) ise, sıçanların distraktörü ön ayakları ile zorlayarak çıkarmaya çalıştıkları gözlemlendi. Bu sebeple, çalışmaya dahil edilen deneklerin cihazı zorlamasına engel olmak için boyunluk takıldı. Cihazı düştüğü için çalışma dışı kalan sıçanlar ayrı kafeslerde gözlemlendiğinde distraktörden kurtulduktan sonra deneklerdeki, gözlerde kızarma, tüylerde sararma ve dikleşme, sırtta kamburlaşma gibi stres bulgularının azaldığı ve yem cinsi oral alımının arttığı gözlemlendi.

Sakrifiye edilen deneklerde distraktörler ve klips çıkartıldıktan sonra ağız tabanından yaklaşılarak total mandibulektomi yapıldı. İşlem esnasında karşı mandibula yarısına göre kaslarda atrofik değişiklikler, ön alt kesici dişin oklüzyon

düzleminde değişiklik ve kırık hattı çevresinde skar dokusu ve iyileşme dokusu izlendi. Makroskobik olarak değerlendirilen mandibulanın etrafındaki yumuşak dokular büyük ölçüde temizlendikten sonra ölçek yardımı ile amaçlanan 3mm'lik uzama ve kemik üzerindeki değişiklikler makroskobik olarak incelendi (**Şekil 23, 24**).



**Şekil 23:** Distraktör çıkarılmadan önce total mandibulektomi gerçekleştirildi. Sağ tarafta masseter kasının atrofik olduğu, ön alt kesicilerde oklüzyon değişikliği ve kırık hattı çevresinde yumuşak dokuya ait düzensiz bir iyileşme dokusu mevcut olduğu izleniyor.

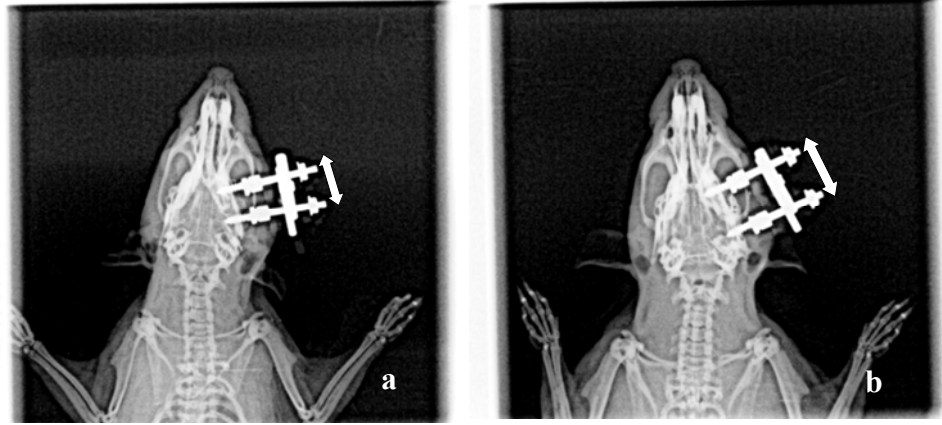


**Şekil 24:** Distraktörün başlangıçdaki ayaklarının açıklığı 1cm iken DO süreci sonunda mesafenin hedeflendiği gibi 3 mm uzadığı görülmektedir.

Çalışmanın başında takılan distraktörlerin, konsolidasyon döneminin sonunda çıkarılmadan önce çekilen röntgen

görüntülerinde iki vida arası mesafesinin açıklığı gözlenmekteydi. Kemik segmentler arası mesafede yeni oluşan kemik dokusunun varlığı, diğer yüz kemiklerinin süperpoze olması nedeniyle mandibulektomi yapıp distraktör uzaklaştırıldıktan sonra mandibulalara büyütülmüş röntgen çekilerek değerlendirildi. Bu sayede yeni

oluşan doku mineralizasyonu ölçüsünde görüntülendi. Aynı zamanda vida delikleri etrafında, daha önce Schulten ve ark. tarafından gösterilen değişik derecelerde osteopenik alanlar izlendi<sup>69</sup>(Şekil 25 26).



**Şekil 25:** Distraksiyon (a) ve konsolidasyon (b) dönemi sonrasında distraktörün iki ayağı arasındaki mesafenin artmış görünümü



**Şekil 26:** Demineralize kemik matriksi grubuna ait, konsolidasyonu tamamlamış mandibulaların büyütülmüş röntgenleri. Distraksiyon mesafesindeki kemik iyileşmesi ve arka vida deliği etrafındaki osteopenik alanlar (↑) denekler arasında farklılık göstermektedir.

## B) KEMİK DANSİTOMETRİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Dört haftalık konsolidasyon döneminin sonunda, DKM, SF ve kontrol grubuna ait 8'er denek sakrifiye edildi. Deneklerin distraktörleri çıkarıldıktan sonra sağ taraf hemimandibulektomileri gerçekleştirildi. Eksize edilen parçaların Hologic QDR-4500C Fan-Beam (Hologic Inc., Bedford, MA, USA) cihazı ile kemik mineral yoğunluğu ( $\text{g/cm}^2$ ) ölçüldü. Ölçümlerde, total mandibula kemik dansitometri değeri ve kırık hattı ile arka vida deliğini içine alan 1/3'lük mandibulaya ait ölçüm değeri kaydedildi (Tablo 1, 2).

**Tablo 1:** Kemik mineral dansitesi 1/3 değerleri ( $\text{g/cm}^2$ ).

| Vaka No | DKM   | SF    | KONTROL |
|---------|-------|-------|---------|
| 1       | 0.029 | 0.019 | 0.14    |
| 2       | 0.025 | 0.017 | 0.106   |
| 3       | 0.035 | 0.016 | 0.129   |
| 4       | 0.029 | 0.011 | 0.159   |
| 5       | 0.031 | 0.01  | 0.129   |
| 6       | 0.011 | 0.003 | 0.15    |
| 7       | 0.049 | 0.033 | 0.142   |
| 8       | 0.01  | 0.008 | 0.13    |

**Tablo 2:** Kemik mineral dansitesi total değerleri (g/cm<sup>2</sup>).

| Vaka<br>No | DKM   | SF    | KONTROL |
|------------|-------|-------|---------|
| 1          | 0.058 | 0.03  | 0.178   |
| 2          | 0.147 | 0.04  | 0.129   |
| 3          | 0.026 | 0.019 | 0.156   |
| 4          | 0.061 | 0.019 | 0.176   |
| 5          | 0.027 | 0.02  | 0.139   |
| 6          | 0.033 | 0.026 | 0.16    |
| 7          | 0.079 | 0.07  | 0.135   |
| 8          | 0.039 | 0.018 | 0.142   |

**Tablo 3:** (Grup 1=DKM grubu, Grup 2= SF grubu, Grup 3 = Kontrol grubu)

1/3 ve total kemik mineral dansitometri ölçüm değerlerine yönelik istatistiksel değerlendirme tablosu. Üç grubun kemik mineral dansitometrik değerlerinin ortalama, median, standart sapma ve ikili karşılaştırma değerlerinin detaylı görünümü.( \*p<0,05)

|                 |          | N | Mean  | Median | ss    | Min   | Max   | SıraOrt. | Ki-Kare | Sd | p      | İkili Karşılaştırma |
|-----------------|----------|---|-------|--------|-------|-------|-------|----------|---------|----|--------|---------------------|
| <b>KMD 1/3</b>  | <b>1</b> | 8 | 0,027 | 0,029  | 0,013 | 0,010 | 0,049 | 10,8     | 17,01   | 2  | 0,000* | 1-2 (p1-2=0,058)*   |
|                 | <b>2</b> | 8 | 0,015 | 0,014  | 0,009 | 0,003 | 0,033 | 6,3      |         |    |        | 1-3 (p1-3=0,0001)*  |
|                 | <b>3</b> | 8 | 0,136 | 0,135  | 0,016 | 0,106 | 0,159 | 20,5     |         |    |        | 2-3 (p2-3=0,001)*   |
| <b>KMDTotal</b> | <b>1</b> | 8 | 0,059 | 0,049  | 0,040 | 0,026 | 0,147 | 11,0     | 15,83   | 2  | 0,000* | 1-2 (p1-2=0,040)*   |
|                 | <b>2</b> | 8 | 0,030 | 0,023  | 0,018 | 0,018 | 0,070 | 6,1      |         |    |        | 1-3 (p1-3=0,001)*   |
|                 | <b>3</b> | 8 | 0,152 | 0,149  | 0,019 | 0,129 | 0,178 | 20,0     |         |    |        | 2-3 (p2-3=0,001)*   |

Gruplar arasında 1/3 kemik dansitometrik (KMD) değerler açısından anlamlı farklılık görülmektedir. ( $p<0,01$ ) (Kruskall-Wallis testi) (**Şekil 27**) Gruplar arası farklılıklar için Mann-Whitney U testi yapıldı:

\*Grup 1 ile grup 3 arasında anlamlı farklılık görülmektedir. Grup 3 de kemik dansitometrik değerleri daha yüksek görülmektedir( $p<0,01$ ) (Mann-Whitney U testi  $p<0,05$ )

\*Grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı farklılık görülmektedir. Grup 3 de kemik dansitometrik değerleri daha yüksek görülmektedir. ( $p<0,01$ ) (Mann-Whitney U testi  $p<0,05$ )

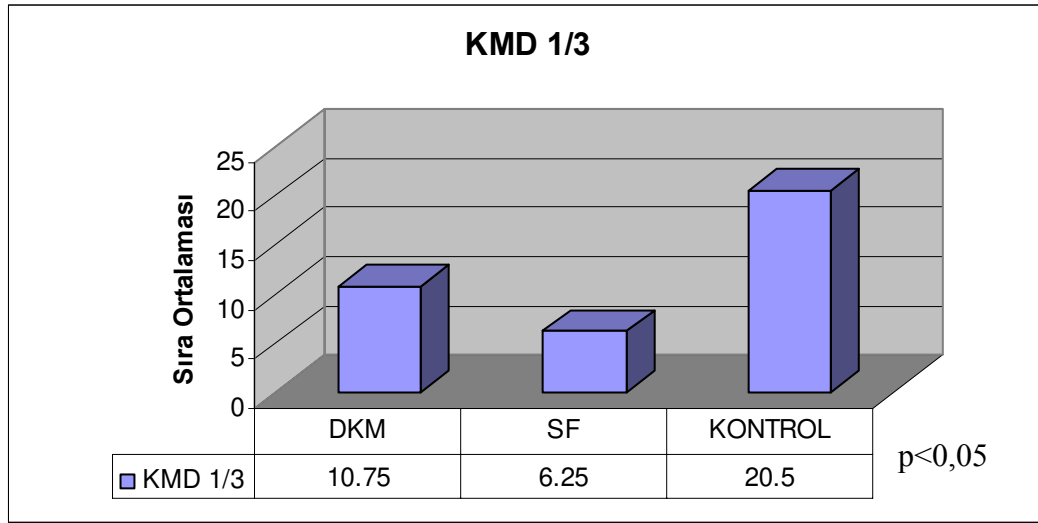
\*Grup 1 ile Grup 2 arasında KMD açısından anlamlı farklılık görülmemektedir. ( $p=0,058$ ) (Mann-Whitney U testi  $p<0,05$ ) İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Grup 1 de KMD değerleri daha yüksek görülmektedir.

Gruplar arasında Total KMD açısından anlamlı farklılık görülmektedir. ( $p<0,01$ ) (Kruskall-Wallis testi) (**Şekil 28**) Hangi gruplar arasında farklılık olduğunu araştırmak için yapılan Mann-Whitney U testinde:

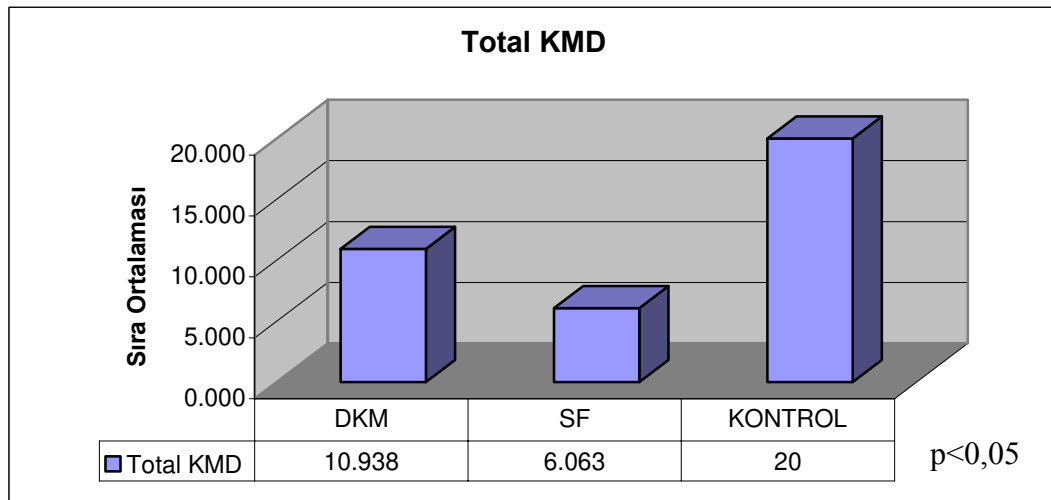
\*Grup 1 ile grup 3 arasında anlamlı farklılık görülmektedir. Grup 3 de Total KMD değerleri daha yüksek görülmektedir. ( $p<0,01$ ) (Mann-Whitney U testi  $p<0,05$ )

\* Grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı farklılık görülmektedir. Grup 3 de Total KMD değerleri daha yüksek görülmektedir. ( $p<0,01$ ) (Mann-Whitney U testi  $p<0,05$ )

\*Grup 1 ile Grup 2 arasında Total KMD açısından anlamlı farklılık görülmektedir. ( $p=0,040$ ) (Mann-Whitney U testi  $p<0,05$ ) Grup 1 de Total KMD değerleri daha yüksek görülmektedir.



**Şekil 27:** 1/3 Kemik mineral dansitometrik ölçüm değerlerinin sıra ortalaması kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırma grafiği (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ )



**Şekil 28:** Total kemik mineral dansitometrik ölçüm değerlerinin sıra ortalaması kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılması (Kruskal-Wallis testi  $p < 0,05$ )

### C) HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Hematoksilen-Eozin ve Masson-Trikrom ile boyanmış kesitlerde, ışık mikroskopik incelemede, distraksiyon uygulanmış kemikler arasında onarım dokusunun oluşmadığı durum G0 olarak dikkate alındığında, 2 ve 4 haftalık distraksiyon uygulamalarına ait kesitlerde buna rastlanmadı. Trabeküllerden oluşmuş, aralarında kemik iliğinin bulunduğu, spongioz yapıdaki karşılıklı uçlar arasında, düzensiz, ince çaplı kollajen lifler, çoğunluğunu fibroblastların oluşturduğu bağ dokusu hücre elemanları, rudimenter dikensi kemik çıkıntılarından oluşmuş interkallus dokusu varlığı G1 olarak değerlendirildi (**Şekil 29, 30**). G2 olarak değerlendirilen dokularda ise distraksiyon uygulanan uçlar arasındaki onarım dokusunun G1'e göre daha kalın çaplı ve daha düzenli kollajen lifler ile bağ doku hücre elemanlarından oluşmuş daha fibröz yapıda bir doku olduğu görüldü (**Şekil 31, 32**). Aynı grubun Masson trikrom boyamasında da onarım dokusundaki kollajen lifler net olarak ayırt edildi (**Şekil 33**). G3'te ise, distraksiyon uygulanan uçlar arasındaki onarım dokusunun, ortada kondroblast ve kondrositlerden oluşan bir kırıkta ön model ile periferinde kemik trabeküllerine dönüşen bölgeden oluştuğu görüldü. İki bölge arasında belirgin bir demarkasyon hattı dikkati çekmekteydi. Bu endokondral ossifikasyonun gerçekleştiği bir onarım bölgesi olarak saptandı (**Şekil 34a**). Masson trikrom ile boyamada da bu alan belirgin olarak görüldü (**Şekil 34b**). G4 olarak değerlendirilen gruplarda ise karşılıklı kemik uçlar arasındaki fibröz bağ dokusu ile arasında ossifikasyonun gerçekleştiği kemik adacıklar ya da kemik trabeküllerinin yer yer köprüleşmeler oluşturduğu görüldü (**Şekil 35, 36**). Aynı grubun Masson trikrom boyamasında da kemik adacıklar belirgin olarak seçildi. Buradaki onarım bölgelerinin intramembranöz kemikleşme gösterdiği saptandı (**Şekil 37**).

Demineralize kemik matriksi kullanımının, distraksiyon osteogenezis sürecinde, özellikle konsolidasyon dönemi içinde kemik iyileşmesine katkısı ve histolojik aktiviteyi artırıcı etkisini araştırmak amacıyla, distraksiyon uygulanan mandibular kemikler arasında oluşan onarım dokusunda, hem intramembranöz osteogenezis, hem de endokondral osteogenezis olduğu ancak onarımın aynı gruplar içinde bireysel farklılıklar gösterdiği görüldü. İkinci ve dördüncü haftada sakrifiye edilen deneklere ait dokular yukarıda anlatılan kriterlere göre skorlandığında (**Tablo 4**), demineralize kemik matriksi uygulanan grubun serum fizyolojik uygulanan gruba göre histolojik aktivitesinin artmış olduğu sayısal veri olarak gösterilmiştir.

**Tablo 4:** Distraksiyon alanını içine alan kesitlerde yapılan histolojik inceleme sonrası kesitlerin aldığı skor değerleri.

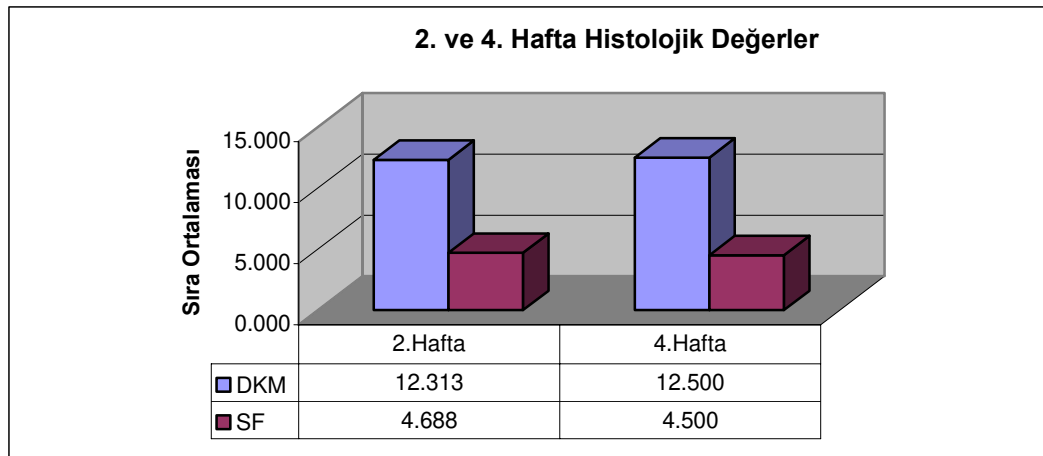
| Vaka no | DKM 2.hf | SF 2.hf | DKM 4.hf | SF 4.hf |
|---------|----------|---------|----------|---------|
| 1       | 2        | 1       | 3        | 1       |
| 2       | 2        | 0       | 3        | 1       |
| 3       | 2        | 1       | 4        | 1       |
| 4       | 2        | 0       | 3        | 1       |
| 5       | 3        | 0       | 3        | 2       |
| 6       | 3        | 1       | 4        | 1       |
| 7       | 1        | 0       | 3        | 1       |
| 8       | 2        | 0       | 3        | 2       |

İstatistiksel olarak, Mann-Whiney-U testi kullanılarak yapılan değerlendirmede; histolojik aktivitenin DKM grubunda anlamlı olarak arttığı ve buna bağlı olarak kemik iyileşmesi sürecinin daha iyi geliştiği saptanmıştır (**Tablo 5, Şekil 38**).

**Tablo 5:** İkinci hafta histolojik skor değerleri DKM grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek görülmektedir.( $p<0,01$ ) (Mann-Whitney U testi  $p<0,05$ )

Dördüncü hafta histolojik grade değerleri DKM grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek görülmektedir. ( $p<0,01$ ) (Mann-Whitney U testi  $p<0,05$ )

|             |     | n= | Ort.  | Medyan | SS    | Min   | Max   | Sıra Ort. | Mann-Whitney U | P     |
|-------------|-----|----|-------|--------|-------|-------|-------|-----------|----------------|-------|
| 2. Hafta KH | DKM | 8  | 2,125 | 2,000  | 0,641 | 1,000 | 3,000 | 12,313    | 1,5            | 0,001 |
|             | SF  | 8  | 0,375 | 0,000  | 0,518 | 0,000 | 1,000 | 4,688     |                |       |
| 4. Hafta KH | DKM | 8  | 3,250 | 3,000  | 0,463 | 3,000 | 4,000 | 12,500    | 0,3            | 0,000 |
|             | SF  | 8  | 1,250 | 1,000  | 0,463 | 1,000 | 2,000 | 4,500     |                |       |

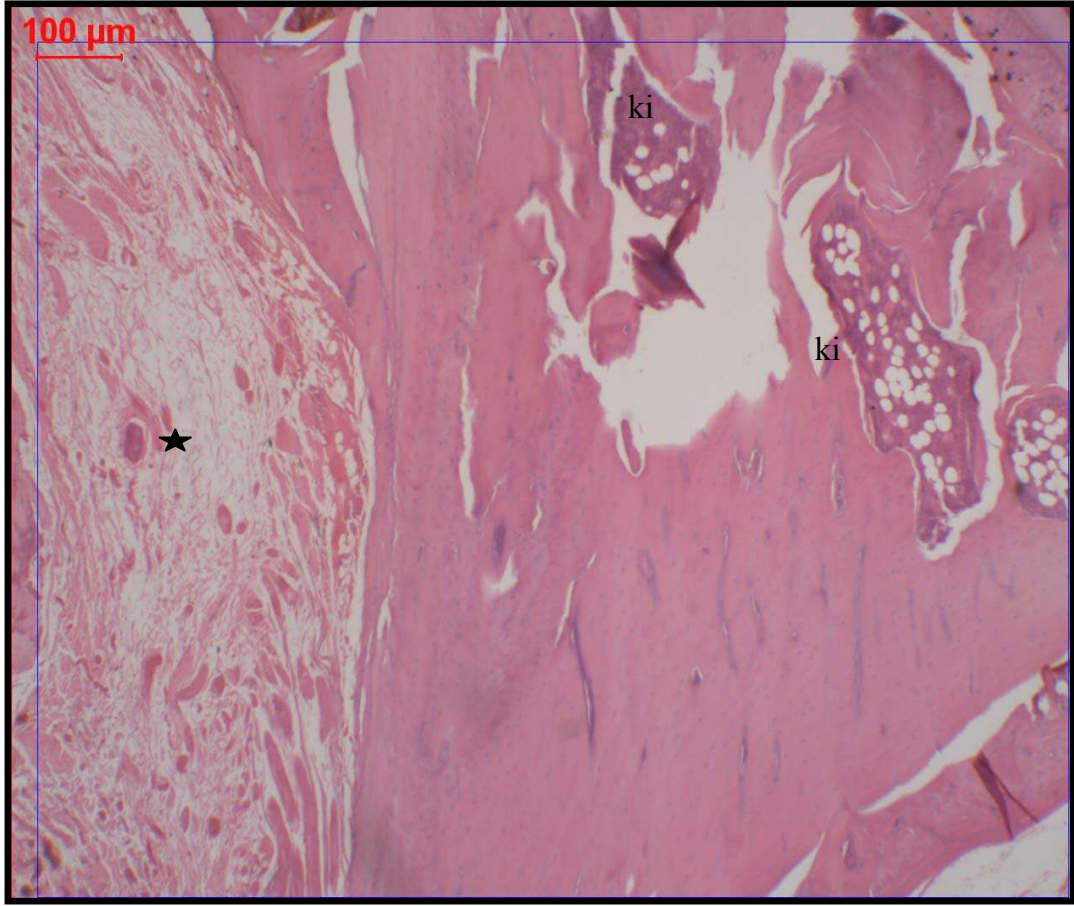


**Şekil 38:** Hematoksilen eozin ile boyanan kesitlerde, ışık mikroskopik inceleme ile yapılan histolojik değerlerin sıra ortalaması ile istatistiksel olarak karşılaştırma grafiği (Mann-Whitney U testi,  $p<0,05$ )

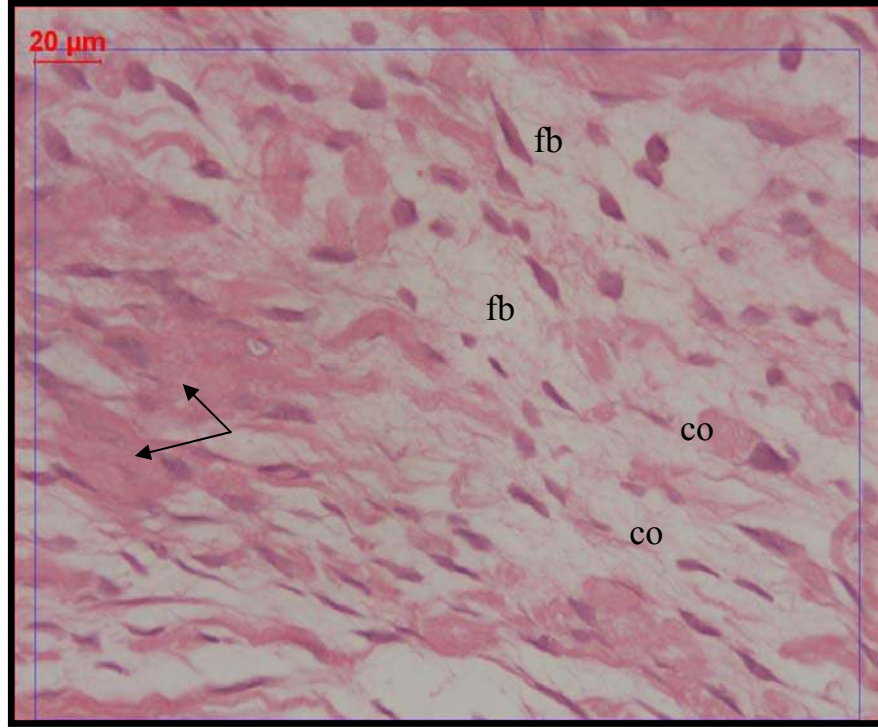
## İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Distraksiyon yapılarak SF ve DKM uygulanan gruplarda, bir yandan kemik yıkımı bir yanda kemik yapımı ile giden ‘remodelling’ sürecini göstermek amacıyla, MMPase-2 (LabVision Corporation, Fremont, CA, USA) ile yapılan immünohistokimyasal boyamada; 2 haftalık SF grubunda, onarım bölgesine ait herhangi bir hücresel elemanda MMPase-2 ile herhangi bir immünoreaktivite izlenmedi (**Şekil 39**). Dört haftalık SF grubunda, immatür kemik trabekülü üzerindeki çok çekirdekli dev hücreler olan osteoklastlar ile trabekül üzerinde tek sıra halinde dizilim gösteren osteoblast hücrelerinde iki haftalık SF grubuna göre artmış bir immünreaktivite gözlemlendi (**Şekil 40**). İki haftalık DKM grubunda MMPase-2 ile tutulum gösteren osteoklast ve osteoblast hücrelerini SF gruplarına göre sayıca daha fazla olduğu dikkati çekti (**Şekil 41, 42**). Dört haftalık DKM grubunda ise birbirleriyle anastomoz yapan ve matür kemik yapısı gösteren onarım bölgesinde MMPase-2 ile tutulum gösteren osteoklastik hücre dağılımının azaldığı buna karşılık trabeküller üzerinde tek sıra halinde dizilim gösteren osteoblastlarda tutulumun arttığı dikkati çekti (**Şekil 43, 44**).

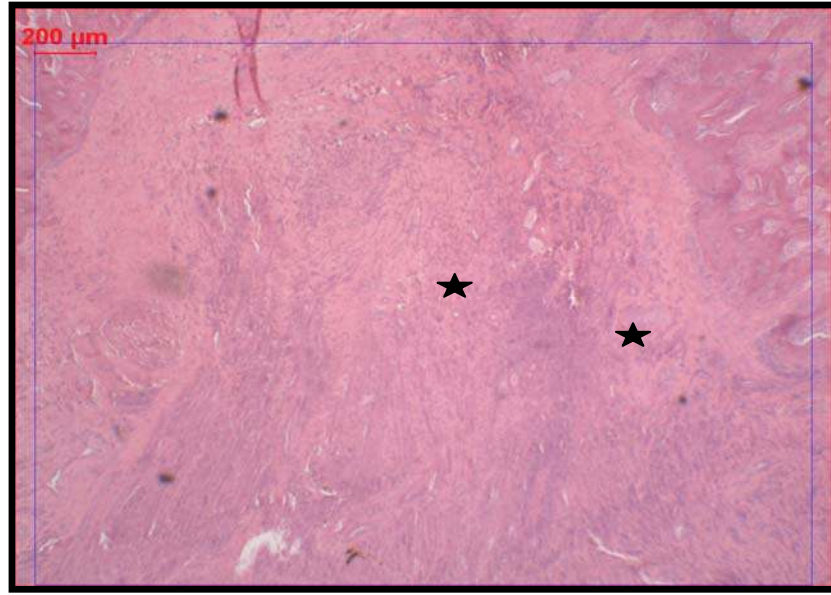
Diğer immünohistokimyasal incelemede; kemik iyileşmesi ve ‘remodelling’ döneminde rol oynayan apoptozisin varlığı araştırıldı. Caspase-3 ile boyama yapılarak inceleme gerçekleştirildi. İki haftalık SF grubunda distraksiyon bölgesinde oluşan fibrotik dokuya ait hücrelerde, dört haftalık SF grubunda immatür kemik trabeküllerinde Caspase-3 ile immünreaktivite izlendi. DKM 2. hafta ve 4. hafta gruplarında distraksiyon bölgesinde birbirleriyle anastomozlaşan kemik trabekülleri üzerinde özellikle osteoblastik hücrelerde immünreaktivite saptandı. DKM’ne ait kesitlerde, Caspase-3 immünreaktivitesi, maturasyonun daha ileri evresindeki hücrelerde görüldü (**Şekil 45, 46, 47, 48**).



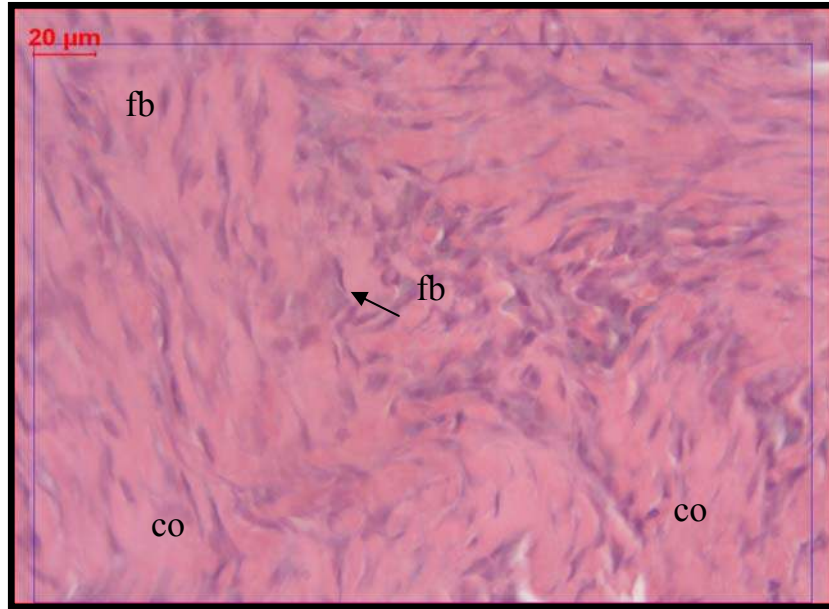
**Şekil 29:** G1 olarak değerlendirilen kesitte; aralarında kemik iliğinin (ki) bulunduğu trabeküllerden oluşan kemik dokusu ve distraksiyon uygulanan onarım bölgesi (★).  
(Sf1 2.hafta, H.E., x40)



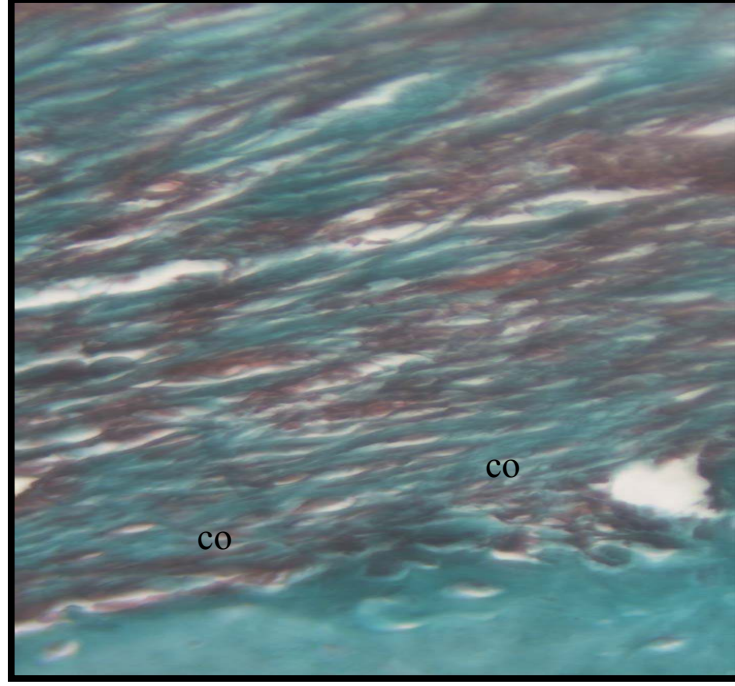
**Şekil 30:** G1 olarak değerlendirilen kesitte, büyük büyütmede düzensiz, ince çaplı kollajen lifler (co), fibroblast (fb), bağ doku hücre elemanlarının çekirdekleri ve rudimenter dikensi kemik çıkıntılarından oluşan interkallus (↑) dokusu. (Sf3 2.hafta, H.E, x400)



**Şekil 31:** G2 olarak değerlendirilen kesitte küçük büyütmede, distraksiyon uygulanan bölgede oluşan ve G1'e göre daha fibröz yapıdaki bağ dokusunun olduğu görünüm(★). (Sf3 4.hafta, H.E., x40)



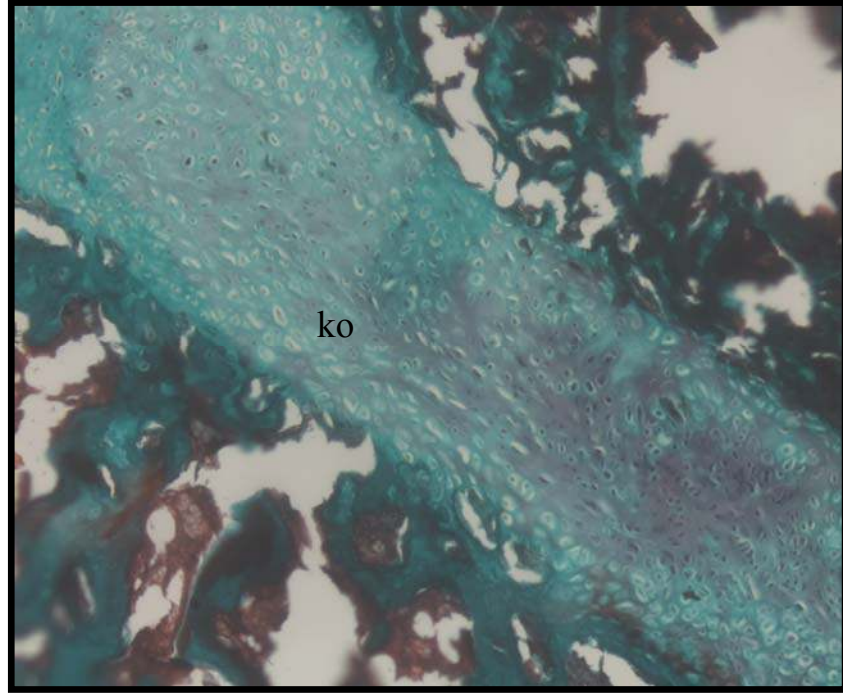
**Şekil 32:** G2'ye örnek kesitte; büyük büyütmede G1 derecesine göre daha kalın çaplı ve daha düzenli kollajen lif demetleri (co) ile fibroblast (fb) ve diğer bağ doku hücre elemanlarından oluşmuş fibröz doku. (Sf1 4.hafta. H.E., x400)



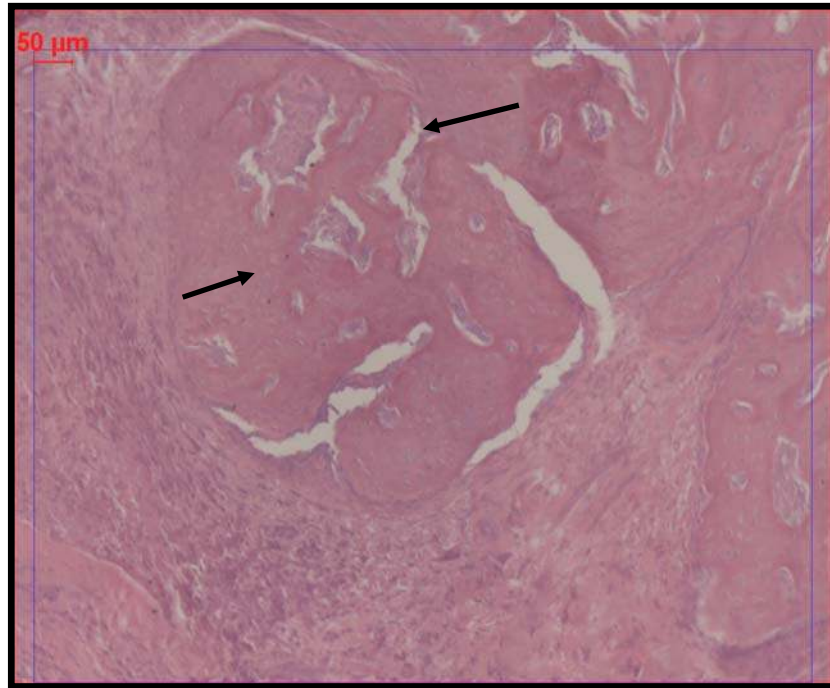
**Şekil 33:** G2 olarak derecelendirilen kesite ait masson trikrom boyaması. Kesitte aynı yönde seyreden kollajen liflerden oluşan onarım dokusu (co) (Sf 4.hafta, x400)



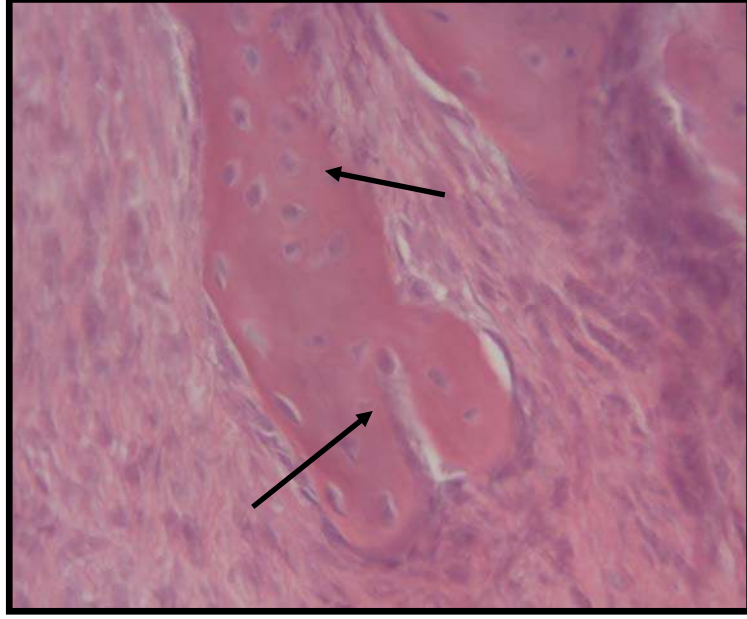
**Şekil 34a:** G3 olarak derecelendirilen kesitte ortada kondroblast (ko) ve kondrositler ile periferinde kemik trabeküllerine (kt) dönüşen bölge. Arada belirgin demarkasyon hattı seçilmektedir. (DKM5 2.hafta, H.E. x100)



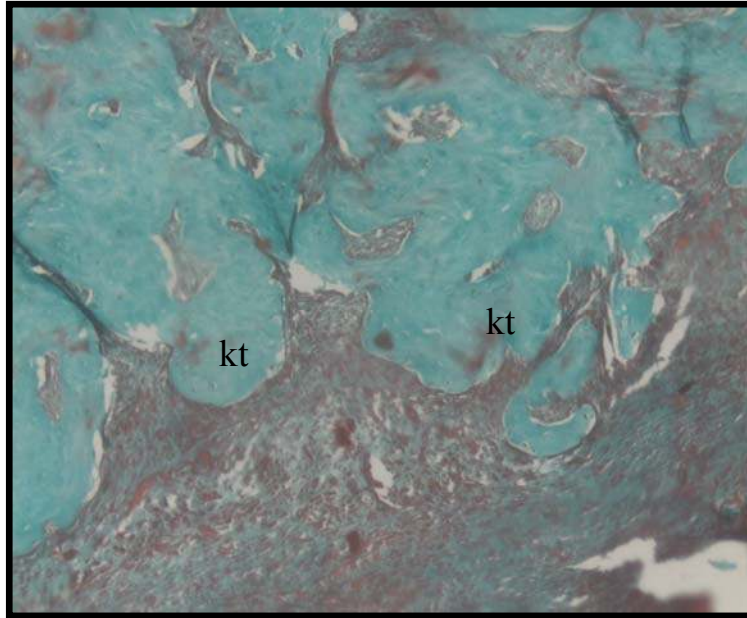
**Şekil 34b:** G3 olarak derecelenen kesitte mason trikrom boyamasında endokondral kemikleşme olduğu dikkat çekmektedir.(ko:kondroblast) (DKM 2.hf, MT, x100)



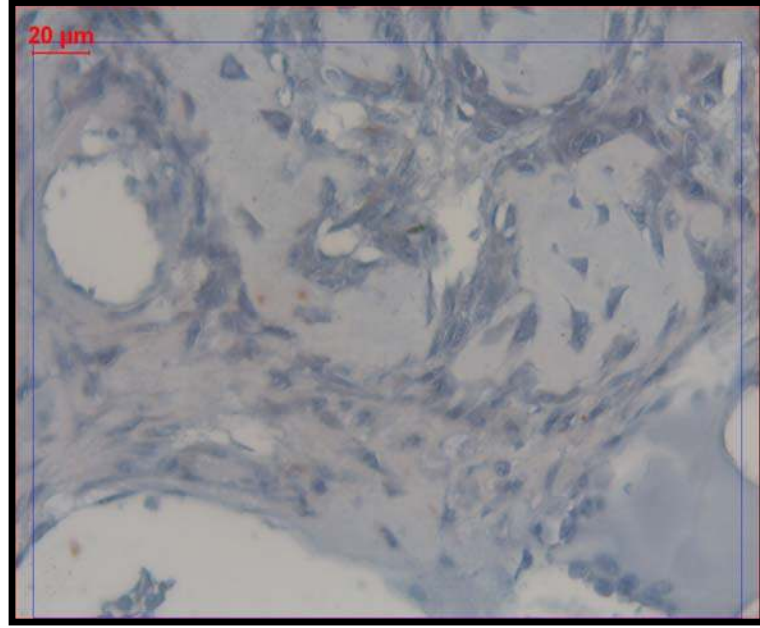
**Şekil 35:** G4 olarak değerlendirilen kesitte, fibröz bağ dokusu içindeki kemik adacıklar ve köprüleşme gösteren kemik trabeküllerden oluşan onarım bölgeleri görülmekte(↑). (DKM1, 4.hafta H.E., x100).



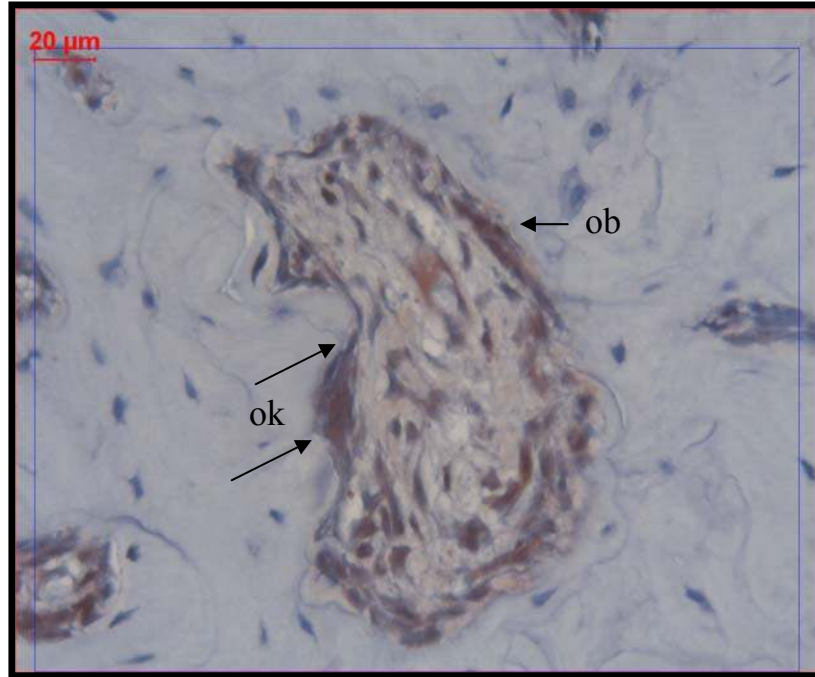
**Şekil 36:** G4 olarak değerlendirilen kesitte, fibröz bağ dokusu içindeki kemik adacıklar ve köprüleşme gösteren kemik trabeküllerden oluşan onarım bölgeleri görülmekte(↑). (DKM5, 4.hafta, H.E. x400)



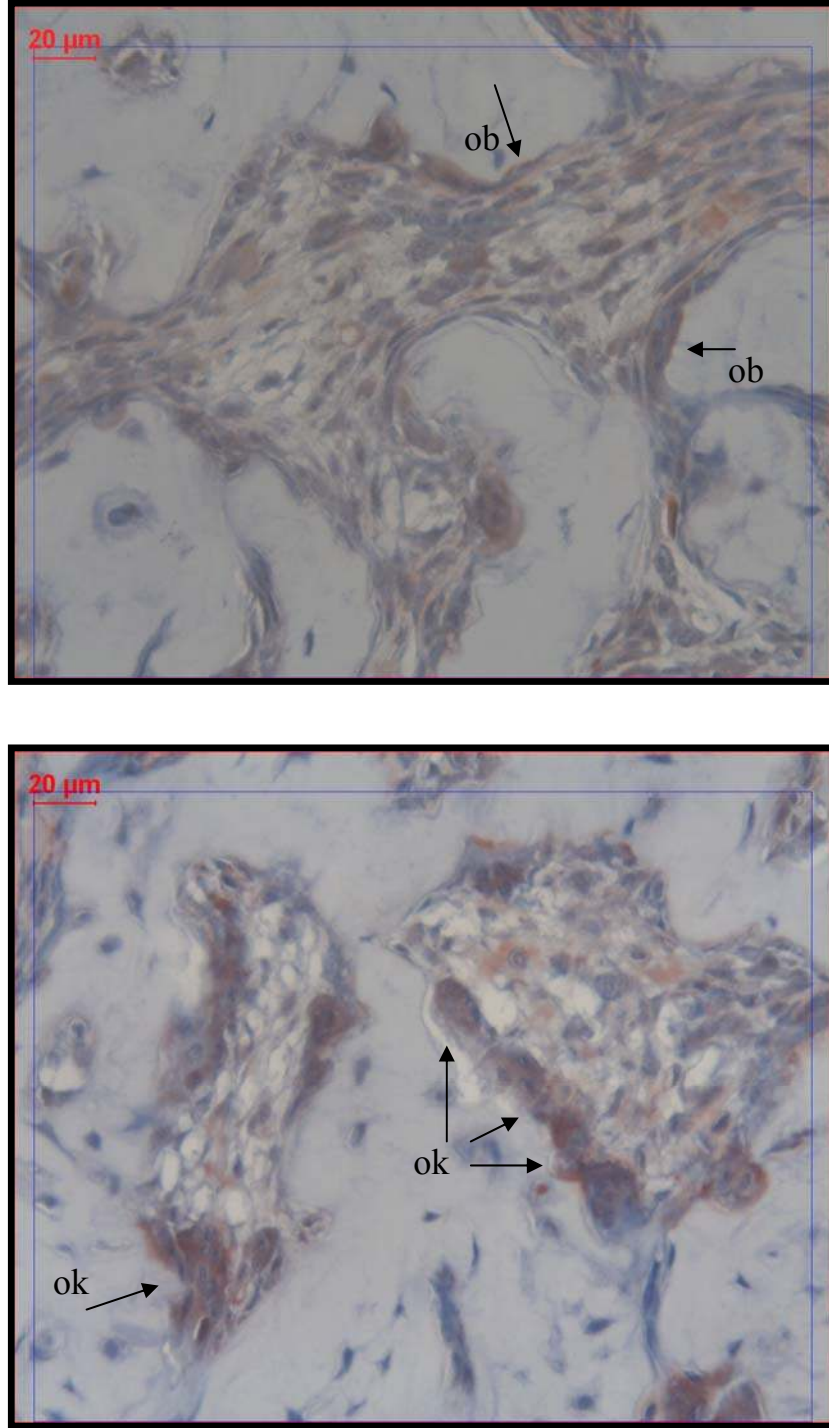
**Şekil 37:** G4 olarak derecelendirilen, yapılan mason trikrom boyamasında onarım bölgesindeki fibrotik doku içindeki kemik trabekülleri. (DKM 4hf, MT, x100)



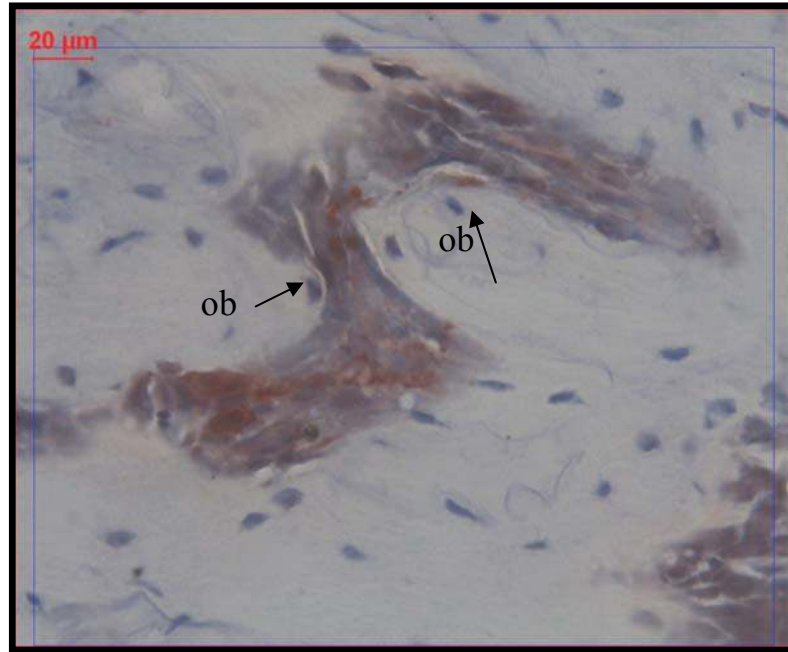
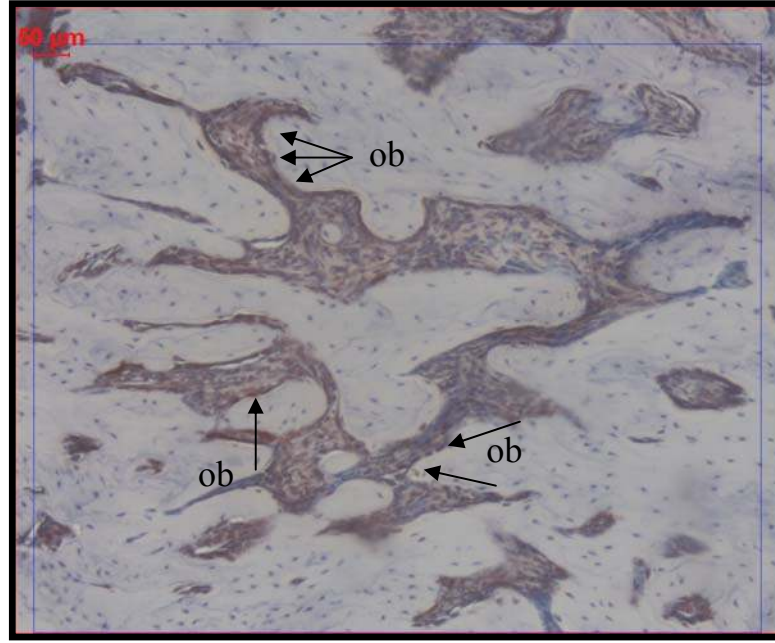
**Şekil 39:** Sf5 2. haftada alınan kesitte onarım dokusuna ait bölgedeki hücresel elemanlarda herhangi bir immün reaktivite izlenmedi.(Anti MMPase-2 x400)



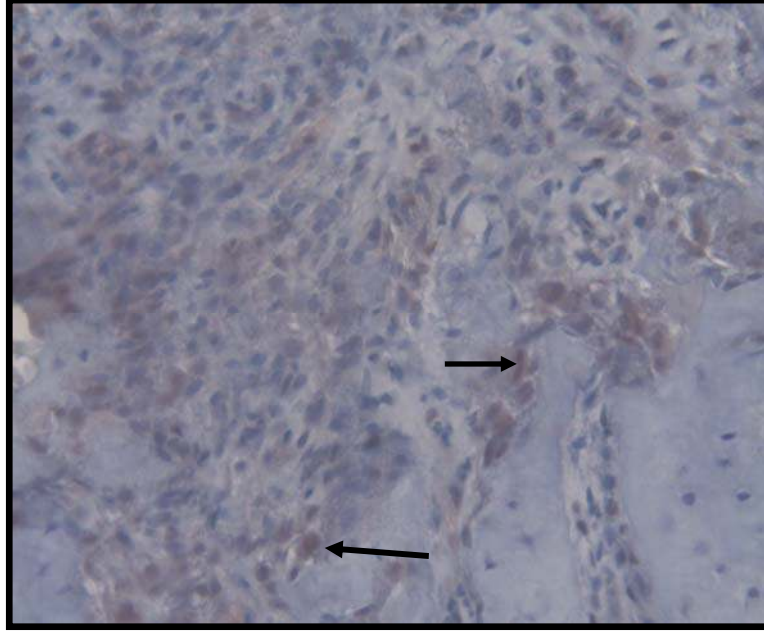
**Şekil 40:** Sf5 4. haftada alınan kesitte immatür kemik trabekülü üzerindeki osteoklast (ok) ve osteoblastlarda (ob) 2 haftalık SF grubuna göre artmış immünreaktivite görülmektedir.(Anti MMPase-2 x400)



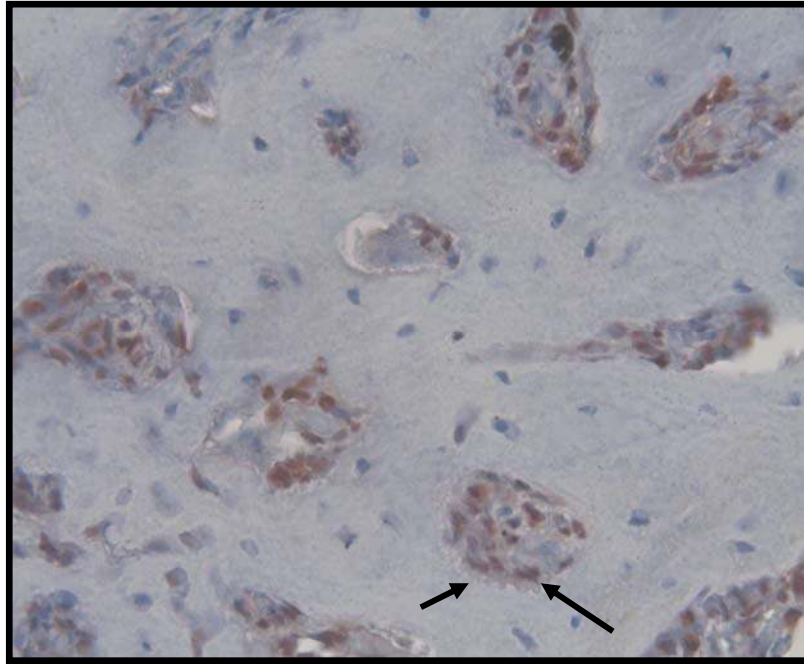
**Şekil 41, 42:** İki haftalık DKM grubuna ait denekten hazırlanan kesit (Alt). Üst resimdeki 4 haftalık SF grubuna göre MMPase-2 ile tutulan osteoblast (ob) ve osteoklast (ok) hücrelerinin sayıca arttığı görülmektedir. (Anti-MMPase-2 x400)



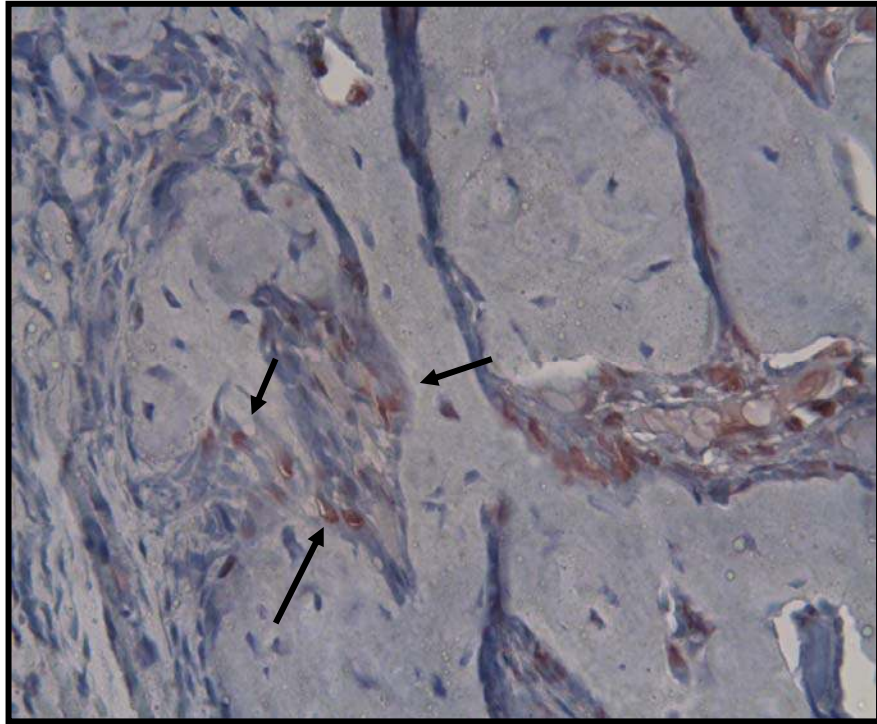
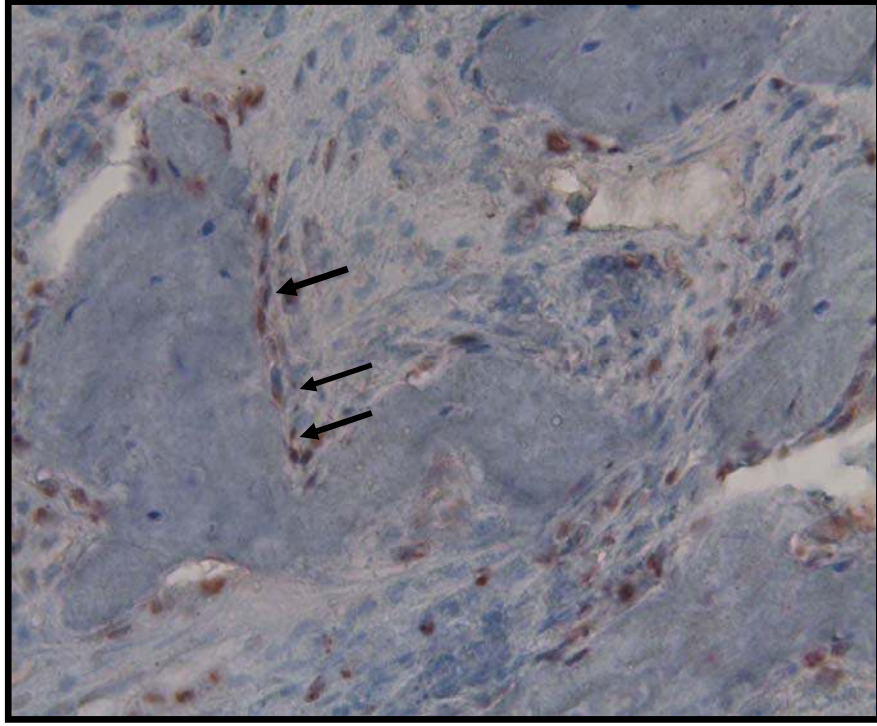
**Şekil 43, 44:** Demineralize kemik matriks 4 hafta grubu. Birbirleriyle anastomozlaşan ve matür kemik yapısı görünümündeki kemik trabekülleri üzerinde osteoblast (ob) hücrelerindeki artmış immün reaktivite. (Anti MMPase-2 x100, x400)



**Şekil 45:** Distraksiyon uygulanan bölgede oluşan fibrotik dokudaki hücrelerde Caspase-3 tutulumu görülmekte. (SF6, 2hf, Caspase-3, x400)



**Şekil 46:** Distraksiyon bölgesinde oluşan immatür kemik trabeküllerinde Caspase-3 ile tutulum. (SF5, 4hf, Caspase-3, x400)



**Şekil 47, 48:** Sırasıyla DKM 2 hafta (üst) ve 4 hafta (alt) gruplarına ait onarım dokularında birbiriyle anastomozlaşan kemik trabekülleri üzerindeki osteoblastlarda immünreaktivite. (DKM 3,2hf, Caspase-3, x400 ve DKM 1, 4hf, Caspase-3, x400)

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Distraksiyon osteogenezis 90'lı yılların başından itibaren gelişerek, doğumsal ve edinsel kraniyofasiyal patolojilerin tedavisindeki yerini almıştır. Distraksiyon osteogenezisin, özellikle etkin olduğu bazı deformitelere örnek olarak hemifasiyal mikrozomi, mandibular hipoplazi, hemifasiyal hipoplazi, kraniyosinositoz, temporomandibular eklem ankilozu, travma sonrası büyüme bozukluğu ve çeşitli gelişimsel anomalileri sayabiliriz. Çocuk yaş grubunun çoğunluğunu oluşturduğu hasta grubunda, daha kısa süreli ve daha az invaziv cerrahi yapılması, tekniğin başlıca avantajları olarak öne çıkmaktadır.<sup>10,11,23,51,52,53,59</sup> Özellikle deformitenin düzeltilmesine yönelik gerçekleştirilen konvansiyonel yöntemlerde kullanılan kemik greftlerine olan ihtiyacın azalması distraksiyon osteogenezisi avantajlı hale getirmiştir.

Distraksiyon osteogenezis kullanımındaki artış, beraberinde komplikasyonları ve teknik problemleri ortaya çıkarmıştır. Karşılaşılan sorunlar içinde, tedavi süresinin uzunluğu, özellikle çoğunluğunu çocukların oluşturduğu hasta grubunda, hasta uyumunu azaltmaktadır. Hatta distraktör cihazının gevşemesi, enfeksiyon gelişmesi ve yetersiz distraksiyon gibi tek başına gerçekleşebilecek bazı komplikasyonların da sürenin uzunluğu ve hasta uyumsuzluğu ile ilgili olabileceği belirtilmektedir.<sup>15,22,23,58,65,71,75</sup> Mofid ve ark.'nın yapmış oldukları ve 2001 yılında yayınlanan, 3278 DO olgusunu içine alan anket çalışmasının sonuçlarına göre; toplam komplikasyon oranı %35.6 olarak bildirilmiştir. Tüm olguların %4.7'sinde hasta uyumsuzluğuna, %5.2'sinde vida boyunca enfeksiyon gelişimine, %2.4'ünde kemik iyileşmesine ve %7.5'inde cihaza bağlı problemler yaşandığı bildirilmiştir<sup>58</sup>. Son on yıl içinde, DO süresini kısaltmak ve aynı zamanda kemik iyileşmesinin kalitesini artırmak amacıyla, DO süreci içindeki farklı parametrelere yönelik çok

sayıda deneysel çalışma yapılmıştır. Çalışmaları değerlendirilmesinde, histolojik, radyolojik, morfolojik ve genetik bazı incelemelere rağmen hücresel boyutta açıklanamayan noktalar mevcuttur.

Ortopedi ve plastik cerrahi literatüründe, yapılan deneysel çalışmalarda, DO süreci içindeki 3 ana evre üzerinde yapılan değişikliklerle toplam tedavi süresini kısaltmak amaçlanmıştır. Latans evresinin süresi kısaltılmış veya bu evre hiç kullanılmayarak distraksiyona hemen başlanmış ve süreç sonunda iyileşme değerlendirilmiştir. Yapılan incelemelerde kemik iyileşmesi ve mekanik testlerde uzun süreli latans evreleri ile anlamlı fark saptanmamış ancak klinik uygulamada pek çok cerrahın latans evresinden vazgeçmediği belirtilmiştir.<sup>58,81,82</sup> Distraksiyon evresinde ise hedeflenen uzama miktarına daha çabuk ulaşabilmek için günlük çevirme miktarı (rate) ve sayısı (ritim) değişik oranlarda artırılıp azaltılarak optimal değerler bulunmaya çalışılmış fakat yapılan hızlı distraksiyonlar, başarısız kemik iyileşmeleri ile sonuçlanmıştır.<sup>34,35,52,64,78,82,85</sup> Distraksiyon osteogenezisin en uzun dönemi olan konsolidasyon dönemi; kemik iyileşmesi, mineralizasyonu ve maturasyonun gerçekleştiği evredir. Bu dönemin sonlandırılması aynı zamanda fiksator görevi gören distraktör cihazının çıkarılması ile sona erer. Cihazın erken çıkarılması psödoartroz, iyileşme hattı üzerinde kırılma veya relaps gelişmesine yol açmaktadır.<sup>34,42,54,69</sup> Özellikle çocuk yaş grubunda konsolidasyon döneminin kısaltılmasının tercih edilmediği bildirilmektedir.<sup>58</sup> Bu durumda, konsolidasyon dönemini erken sonlandırmak yerine bu evredeki fizyolojik süreci hızlandırmaya yönelik çalışmalar planlanmıştır.

Son yıllardaki deneysel çalışmalarda fizyolojik işleyişin basamaklarını ortaya koyan ve bu basamaklara dışardan çeşitli yollarla müdahale edilerek, konsolidasyon dönemi veya tüm DO sürecini hızlandırmak amaçlanmıştır. Çalışmaların çoğunda,

hızlandırma işlemi sonunda elde edilen kemik iyileşmesi, histolojik, kemik mineral dansitometrisi ve biyomekanik testler gibi farklı yöntemlerle değerlendirilmiş ve sonuçlar normal sürecin sonucu ile karşılaştırılmıştır. Uygulamalar arasında çeşitli farmakolojik ajanlar, büyüme faktörleri, mezenkimal kökenli osteoblast benzeri hücre uygulanması, ultrasonik dalgalar, kompresyon uygulanması, elektrik stimülasyonu gibi farklı yöntemler mevcuttur.<sup>4,13,28,57,59,62,64,66,72,90</sup> Ortopedi ve kraniyomaksillofasiyal cerrahi literatüründeki bu deneysel çalışmalarda uygulanan yöntemlerin çoğunda, yöntemlerin kemik iyileşmesine olan katkıları gösterilmiş ve süreci kısaltabileceği belirtilmiştir. Ancak, mezenkimal kökenli osteoblastik hücrelerin, kemik morfojenik proteinlerin ve osteojenik proteinlerin kullanıldığı çalışmalar olmakla beraber bu yöntemler kliniğe uygulanamayan yöntemler olarak kalmıştır.<sup>4,10,11,27,29,57,60,62,72,89,90</sup> Bazı deneysel çalışmalar ise ortopedistler tarafından sadece endokondral kemikleşen uzun kemiklerde gerçekleştirilmiş ve kraniyofasiyal iskelette intramembranöz iyileşen kemiklere uygulanmamıştır. Kraniyofasiyal iskelete ait kemiklerin daha ince ve daha iyi kanlanma özelliğine sahip oldukları, cerrahi sırasında üzerlerindeki periost dokusunun daha rahat kaldırılabilmesi, çevre yumuşak dokunun ekstremiteye göre daha iyi ekspansiyon olabildiği bilinmektedir.<sup>2,58</sup> Bu durum, ortopedi literatüründeki bazı çalışma ve bilgilerin kemikleşme ve klinik özellikleri farklı olan kraniyomaksillofasiyal cerrahide yeniden incelenmesi gereğini doğurmaktadır.

Bu çalışmada, sıçan mandibular distraksiyon osteogenezis modeli üzerinde, demineralize kemik matriksi kullanımının, konsolidasyon döneminin hızlandırılması ve kemik iyileşmesine katkısını araştırmayı amaçladık. Demineralize kemik matriksi çok uzun zamandır farklı disiplinlerde kullanılan ve kemik iyileşmesine olan katkısı gösterilmiş bir biyomateryaldir. Günümüzde DKM hazır preparatlarda, farklı

formlarda ve içeriğinde bir taşıyıcı ile birlikte, ortopedi ve plastik cerrahi dışında beyin cerrahi ve diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>87</sup> Özellikle kraniyomaksillofasial cerrahide statik kemik defektlerinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.<sup>73</sup> 1990'lı yıllardan sonra DKM, kullanıma hazır preparat olarak geliştirilmiş olmasına rağmen, halen bazı çalışmalarda deneklerden kemik grefti alınarak, araştırmacılar tarafından hazırlanmaktadır. Kemik morfojenik faktör içeren veya uygulandığı yerde morfojenik büyüme faktörlerini salınımını artıran DKM, osteoindüktif etkiye sahiptir. Aynı zamanda yapısında bulundurduğu kollajen sayesinde kemik iyileşmesine kalıp oluşturarak osteokondüktif etkiyi de sağlamaktadır.<sup>16,36,73</sup>

Literatür incelendiğinde, distraksiyon osteogenezis ile birlikte DKM kullanımına ait ortopedi literatüründe bir adet çalışma olduğu, bunun haricinde daha çok, içerdiği veya salınımını artırdığı Kemik Morfojenik Proteinlerin (KMP) çalışıldığı görülmektedir. Özellikle osteojenik potansiyeli yüksek KMP-2, 4, 7 ve osteojenik protein 1'in dışardan uygulandığı çalışmalar yapılmıştır.<sup>4,29,57,62,90</sup> KMP'nin intramembranöz kemik iyileşmesinde, mandibula kırıklarında salınımının arttığı gösterilmiş,<sup>77</sup> daha sonra Campisi ve Yazawa'nın aynı yıl içinde yayınlanan çalışmalarında, distraksiyon osteogeneziste salınımın arttığı fakat konsolidasyon döneminde azalma eğilimine girdiği ve bu dönemde dışardan verilecek KMP'lerin klinik sonuçları olumlu etkileyeceğini ve sürecini kısaltacağını bildirmişlerdir.<sup>11,89</sup> Demineralize kemik matriksi kullanılan çalışmada ise Hagino ve ark., endokondral kemikleşen tavşan tibiasında 5 mm'lik kemik defekti yaratıp distraksiyon osteogenez gerçekleştirirken, bir gruba demineralize kemik matriksi uygulayarak, statik olmayan kemik defektinde iyileşmeyi histolojik, radyolojik ve dansitometrik olarak değerlendirmişlerdir. DKM latans evresinin başında uygulanmış ve çalışmanın

sonucunda dansitometrik ve radyolojik olarak iyileşmenin, kontrol grubuna göre daha iyi olduğu istatistiksel olarak gösterilmiş. Bu sonuç ile latans evresini muhtemelen kısalttığı, kemik iyileşmesinde gecikmeyi ortadan kaldırdığı ve cihazın takılı olduğu toplam süreyi azalttığı bildirilmiştir.<sup>27</sup> Bizim çalışmamızda ise, DKM, kemikleşme özelliği tamamen farklı olan kraniyofasiyal iskeletin bir parçası olan ve intramembranöz kemikleşen mandibulaya uygulandı. Kullandığımız hayvan modeli, tavşan modeline göre etik açıdan daha uygun, maliyeti daha düşük olan ve daha önce Rowe ark. tarafından tanımlanan sıçan distraksiyon osteogenezis modeliydi.<sup>69</sup> Hagino ve ark. çalışmalarında denekten aldıkları kemik greftini kimyasal yollarla demineralize edip matriks haline getirirken, bizim çalışmamızda jel formunda karboksimetil selüloz taşıyıcı içeren SureFuse® Gel (Hans Biomed, G.Kore) jenerik isimli DKM kullanıldı. Çalışmamızda, DKM uygulamasının konsolidasyon dönemi üzerine olan etkisi araştırıldığı için literatürdeki çoğu çalışmadan farklı olmak üzere, distraksiyon evresi bittikten hemen sonra konsolidasyon döneminin 1.günü uygulama gerçekleştirildi. Mizumoto, Özeç ve Pampu, sırasıyla KMP-7, KMP-2 ve zoledronik asit kullandıkları çalışmalarında; osteotomi gerçekleştirildikten hemen sonra ajanı uygulamışlardır.<sup>57,62,64</sup> Bu durumda çalışmanın sonunda karşılaşılan sonucun özellikle hangi evredeki etkiye bağlı olduğu ve osteogenezis sürecini hangi aşamadaki etkisi ile hızlandırdığı soruları tam olarak cevaplanamamaktadır. Oysa ki Zakhary, Ashinoff ve Hamdy KMP'leri, Shao ise osteoblast benzeri mezenkimal hücreleri, DO en uzun evresi olan konsolidasyon döneminin başında uygulamışlardır ve bu sayede daha sağlıklı bir değerlendirme yapılabilmektedir.<sup>4,29,72,90</sup>

Kraniyofasiyal cerrahi literatüründe, deneysel çalışmalar için en çok mandibula distraksiyonu ve farklı çeşitlerde hayvan modelleri kullanılmıştır. Şimdiye kadar; maymunlar, beagle cinsi köpekler, koyunlar, domuzlar, ve tavşanlar pek çok

çalışmada kullanılmıştır.<sup>79</sup> Swennen ve ark.'nın yaptıkları literatür incelemesinde DO ilgili deneysel çalışmalarda sıçan kullanımının %4.7 oranında olduğu en fazla kullanılan türün ise %48.2 oranı ile köpek türü olduğu bildirilmiştir. Fakat özellikle Rowe ve ark. tarafından gerçekleştirilen sıçan distraksiyon osteogenezis modeli ile beraber daha büyük hayvanların kullanımının gereksiz olduğu ve sıçanlara göre daha karmaşık genetik yapıya sahip büyük hayvanlarda DO'ı moleküler düzeyde incelemenin uygun olmayacağı bildirilmiştir. Sıçanların moleküler ve genetik çalışmalara daha uygun olmasının yanı sıra maliyetinin düşük olması ve yeni prosedürlerin gerçekleştirilmesine imkan vermesi önemli avantajlarıdır. Ayrıca daha önce yapılmış sıçan deneyleri nedeni ile karşılaşılan sorunlar ve bazı kemikleşme özellikleri bildirilmiştir.<sup>17,63,69,85,88</sup> Bizim çalışmamızda, moleküler ve genetik bir inceleme yapılmamakla beraber, diğer bahsedilen avantajlar nedeniyle sıçan modeli kullanılmıştır.

Kullanılan hayvan modelinin yanı sıra DO çalışmalarında bir önemli konu da kullanılan distraktör cihazıdır. Farklı hayvan modellerine göre farklı özelliklere sahip distraktörler tasarlanmıştır. Sıçanlar için sırasıyla, Rowe, Connolly ve Eski tarafından farklı sıçan mandibular distraktörü tariflenmiştir. Bizim çalışmamızda ise Eski ve ark. tarafından geliştirilen sıçan mandibula distraktörü kullanıldı. Eski ve ark. sıçan mandibulasında DO sırasında osteotominin posterior molar dişin arkasına yerleştirilmesi halinde, distraktörün arka vidasının sıçan mandibulasının ince ve narin olan angulus ve ramus bölgesine geldiğini ve bu durumun kırılma veya cihazın erkenden ayrılmasına yol açabildiğini bildirmişlerdir. Eğer osteotomi yerleşimi 2.ve 3. molar dişler arasından gerçekleştirilirse oral mukozadan kaynaklanan enfeksiyonun cerrahi sahada enfeksiyon yarattığı ayrıca bu yerleşimde diş kökleri olduğu için kemik iyileşmesinin sağlıklı değerlendirilemeyeceği bildirilmiştir. Bu

problemlerin anlaşılması ile Connolly ve ark., osteotomi yerleşimini biraz daha arkaya, sigmoid çentik ile mandibula alt kenarı arasında ve bir miktar oblik hale getirerek gerçekleştirdiler. Aynı zamanda ince kemiği arkadan destekleyecek bir metil metakrilat blok kullanarak daha küçük bir distraktör cihazı kullandılar. Eski ve ark. mandibula arkasına konan metil metakrilat blok yerine mandibulanın alt kenarını içine alan U şeklinde bir somun ile arka vidanın ince kemiğe tutunmasını arttırdılar. Ayrıca osteotomi hattı olarak en arka molar dişin arkasından geçen hattı kullandılar. Distraktör cihazının arka vidasını tutan bu U şekilli somun ile çalışma süresince cihaz ayrılması gerçekleşmediği bildirildi. Çalışmamızda, aynı distraktör cihazını ve aynı osteotomi lokalizasyonunu kullandık. Farklı olarak U şeklindeki somun yerleştirildiğinde vida deliğinin alt kenara yakın kaldığını ve bu nedenle cihazın takılması sırasında kırıklarla karşılaşıldığını düşünerek, U somun kullanmadan, vida deliğini, kemiğin daha kalınlaştığı yukarı doğru alarak cihazı yerleştirdik. Bu sayede peroperatif mandibula kırığı ile hiç karşılaşmadık.

Latans, distraksiyon ve konsolidasyon zamanlamalarının literatürde farklı çalışmalara konu olması, kemik rejenerasyonundaki önemlerini ortaya koymuştur.<sup>23,63,78,81,82,85</sup> Deneysel çalışmalarda, farklı hayvan modellerinde farklı süreler belirlenmiş hatta çalışmamızda kullandığımız sıçan modelinde ideal rejenerasyon için gerekli sürelerle yönelik bir takım çalışmalar yapılmıştır.<sup>63,85</sup> Bu çalışmada, Paccione ve ark. tarafından, farklı latans, ritim ve oranlar ile kemik rejenerasyonunun sadece histolojik değerlendirmesine göre belirlenen en iyi latans, ritim ve oran değerleri kullanılmıştır. Paccione'nin çalışmasına göre sıçan modelinde optimum mandibular distraksiyon protokolü olarak latans 5 gün, distraksiyon döneminde çevirme başına 0.25 mm oranı ve günde 2 defalık bir ritim, konsolidasyon dönemi 4 hafta olarak bildirilmiştir.<sup>63</sup>

Literatürde yapılan DO çalışmaları incelendiğinde, değerlendirme için altın standart denebilecek bir yöntem olmamakla beraber histolojik, histomorfometrik, immünohistokimyasal, kemik mineral dansitometrik, radyolojik (direkt röntgen ve BT) ve biyomekanik kemik testleri değerlendirme yöntemlerini oluşturmaktadır. Çalışmamızda, histolojik inceleme ve puanlama, kemik dansitometrik inceleme, immünohistokimyasal inceleme gerçekleştirildi.

Histolojik incelemede hematoksilen eozin boyaması ve Masson-trikrom boyamaları gerçekleştirildi. Kesitlerde; kemik iyileşmesi, bağ dokusu özellikleri, kollajen liflerinin varlığı, doğrultusu ve kesitlerdeki hücrelerin morfolojisi incelendi. Işık mikroskopik olarak yapılan değerlendirmelerde kesitlere 1 ve 4 arasında puanlar verilerek demineralize kemik matriksi ve serum fizyolojik gruplarının 2. ve 4. haftalardaki iyileşme özellikleri ve hücresel değişiklikler incelendi ve karşılaştırıldı. Paccione benzer bir derecelendirme yöntemini yaparak, farklı latans ve distraksiyon değerlerindeki kemikleşmeyi değerlendirmiştir. Literatürde çalışmaların birçoğunda histolojik inceleme yapılmakla beraber yapılan incelemelerin istatistiksel değerlendirilmesine nadir rastlanmaktadır. Bizim çalışmamızda 2. hafta ve 4. hafta gruplarına ait DKM ve SF grupları karşılaştırıldığında; DKM uygulanan gruplarda, 2. ve 4. haftada SF grubuna göre daha hızlı bir iyileşme ve artmış hücresel aktivite olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterildi. Serum fizyolojik grubu 4. haftaya ait kesitler ile DKM 2. haftaya ait kesitler istatistiksel olarak karşılaştırılmamakla beraber histolojik değerlendirmede birbirlerine yakın değerler alması, DKM'nin süreci ne kadar etkilediği konusunda ipucu vermektedir. Histolojik inceleme sırasında bir diğer önemli nokta, daha önce Yasui, Rowe Samchukov ve Cope, tarafından bildirilen üçüncü bir kemikleşme tipi olan transkondroid kemikleşmenin bazı kesitlerde tespit edilmesi idi. İntramembranöz

kemikleşmesi beklenen mandibulada karşılaşılan kondrosit ve kondroblast adalarının endokondral kemikleşmede rastlanan bir görüntü olması farklı hayvan modellerinde de bildirilmiş ve mandibuler DO'de farklı bir kemikleşme tipinin varlığından şüphe duyulmuştur. Daha sonra intramembranöz kemikleşme içinde kıkırdak oluşumunun sebebi olarak yetersiz stabilite ve mikro hareketler veya azalmış kanlanma ve yetersiz oksijen düzeyine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda, kemik üstünü örten masseter kasının nekroza uğradığı tüm deneklerde kemikte de nekrotik görünüm oluştu, cihaz ayrılması gelişti ve bu denekler çalışma dışı kaldı. Kesitlerini incelediğimiz hayvanların çalışmayı tamamlayan hayvanlar olması, karşılaşılan 'transkondroid' yapının daha çok mikro hareketlere bağlı olabileceğini düşündürmüştür.

İmmünohistokimyasal incelemede ekstraselüler matriks dinamiğini gösteren matriks metalloproteinaz-2 ile ve ayrıca apoptozisi gösteren Caspase-3 ile boyama yapılmıştır. Literatürde, özellikle büyüme faktörleri ve kemik morfojenik proteinlerle yapılan çalışmalarda, doku içindeki kemik morfojenik protein salınım düzeyini ve işlevini anlayabilmek için araştırılan faktöre ait işaretleyiciler kullanılarak yapılmış immünohistokimyasal çalışmalar mevcuttur.<sup>10,11,22,89</sup> Ancak bizim çalışmamızda olduğu gibi, ekstraselüler alandaki yıkımı sağlayıp, hücreler arası ve hücre matriks arası ilişkiyi dengeleyen matriks metalloproteinaz işaretleyici MMPase-2 ile yapılmış bir immünohistokimyasal değerlendirmeye rastlanmadı. İyileşme dokusu içinde önemli role sahip MMP'ler; ekstraselüler matriks döngüsünde, hücre göçü, gelişimi ve farklılaşmasında, inflamatuvar cevaplarda, apoptozis ve neovaskülarizasyonda da role sahiptir.<sup>12</sup> İncelenen kesitlerde, SF grubuna ait 2. hafta kesitlerinde MMPase-2 tutulumuna rastlanmazken, aynı haftaya ait DKM uygulanan kesitlerde osteoblast ve osteoklast hücrelerinde MMPase-2 tutulumu tespit edildi. DKM lehine olan görünüm

4. haftada devam ederek, SF grubuna göre tutulum gösteren hücrelerin sayıca daha fazla olduğu izlendi. Ayrıca 4. hafta DKM grubuna ait kesitlerde; matür kemik yapısı gösteren onarım bölgesinde MMPase-2 ile tutulum gösteren osteoklastların azaldığı, buna karşılık kemik trabekülleri üzerinde tutulum gösteren osteoblastların arttığı gözlemlendi (**şekil 43, 44**). Bu değerlendirme ile DKM uygulanan distraksiyon mesafesinde matriks döngüsünün arttığı ve iyileşme sürecinin süratlendiği düşünülmektedir.

İmmünohistokimyasal olarak incelediğimiz apoptozisin, literatürde, kırık iyileşmesindeki rolü ve özellikle remodeling safhasındaki önemi bildirilmiştir. Ortopedi literatüründe mekanik uyarıların apoptozisi uyardığı ve programlı hücre ölümünün kemik ‘remodelling’ sürecini tetiklediği gösterilmiştir.<sup>33,35</sup> Distraksiyonun apoptozisi tetiklediği ve osteoblastik hücre ölümünün gösterilmesi ilk olarak Meyer ve ark. tarafından bildirilmiş, aynı çalışmada, artmış apoptozisin artmış hücresel aktiviteyi gösteren bir bulgu olduğu vurgulanmıştır.<sup>55</sup> Bu çalışmada Caspase-3 kullanarak kesitlerde apoptozis incelendi. Serum fizyolojik grubuna ait 2.hafta kesitlerinde fibrotik doku içinde immünreaktivite, 4. hafta kesitlerinde ise immatür kemik trabeküllerinde immünreaktivite izlendi. Farklı olarak DKM 2. hafta ve 4. hafta gruplarında anastomozlaşan kemik trabekülleri üzerindeki osteoblastik hücrelerde Caspase-3’e ait immünreaktivite izlendi. Bu bulgu ile konsolidasyonun 4. haftasında, DKM’ne ait kesitlerde, saptanan apoptozisin maturasyonun daha ileri aşamaya geldiğini ve kemiğe ait iyileşme hızının arttığı düşünülmektedir.

Çalışmanın diğer değerlendirme kriteri olan kemik mineral dansitometrisi ölçümü, literatürdeki benzer çalışmalarda büyük ölçüde yer verilen bir değerlendirme yöntemidir. Ölçüm için dual enerji X-ray absorbsiyometri (DEXA) ile aksiyel planda kemik tarandı. Başta osteoporoz olmak üzere kemik mineralizasyonuna yönelik

klinik kullanımında hızlı sonuçlar veren Fan Beam teknolojisine<sup>23</sup> sahip Hologic QDR 4500C (Hologic Inc., Bedford, MA, USA) cihazı ile ölçümler gerçekleştirildi. Hemimandibulaların taranması sırasında diğer çalışmalarda da dikkat edilen rejenerasyonun gerçekleştiği alanın ayrı değerlendirilmesi sağlandı.<sup>23,72,81,90</sup> Ayrıca distraksiyon alanı çevresindeki diğer kortikal alanlar ile beraber total sonuçlarda değerlendirmeye alındı. Osteotomi yapılmayan cerrahi kontrol grubu (n=8) mineral dansitometrik ölçüme dahil edildi. Sonuçlar 3'lü olarak karşılaştırıldığında total mandibula değerleri açısından 3 grup arasında anlamlı fark vardı. İkili değerlendirmede, DKM grubu SF grubuna göre total mandibula mineral dansitometrisi açısından daha yüksek değerlere sahipti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Mann Whitney-U  $p<0,05$ ). İyileşme alanını içine alan 1/3 değerlerinde ise 3 grubun değerlendirmesinde aradaki fark anlamlı iken, 2'li değerlendirmelerde DKM grubunun dansitometrik değerlerinin SF grubuna göre yüksek olmakla beraber aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (Mann Whitney-U  $p<0,05$ ). Bu sonuç konsolidasyon döneminin 4. haftasında yapılan bu ölçümlerde DKM değerlerinin SF grubuna göre önde ve cerrahi kontrol grubu değerlerine daha yakın olduğunu ve konsolidasyon döneminin uzatılması veya kemik iyileşmesi sürecinin devamında artış gösterecek olan değerlerde anlamlı fark olabileceğini düşündürmektedir. Literatürdeki diğer DKM ve distraksiyon osteogenezis çalışmasında (Hagino ve ark.), tavşan tibiasındaki iyileşmeye ait kemik mineral dansitometrisi, konsolidasyon döneminin 3. ve 5. haftasında ölçülmüş, 3. haftada kontrol grubuna göre anlamlı fark yokken, 5. haftada değerlerde anlamlı fark olduğu bildirilmiştir<sup>27</sup>. Bir başka açıdan değerlendirdiğimizde aynı grup içindeki deneklerde, standart koşullara rağmen histolojik ve kemiğin makroskobisi adına birtakım farklılıklar mevcuttu. Bu farklılıkların yanı sıra Schulten ve ark. tarafından

bildirilen vida çevresinde görülen osteopenik alanlar deneklerin çekilen röntgenlerinde gözükmekteydi<sup>71</sup> (**Şekil 26**). Distraksiyon cihazının arka vidasına ait delik, kırık hattını içine alan 1/3'lük kemik dansitometrisi ölçüm alanına girmektedir. Şekil 26'da görülen delik etrafındaki osteopenik alanlar mineralizasyonu azalmış alanlardır ve denekler arası bireysel mineralizasyon ve iyileşme farkı ile beraber değerlendirildiğinde, DKM grubu ile SF grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasını açıklayabilecek ikinci bir neden olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, sıçan mandibular distraksiyon osteogenezisinde uyguladığımız demineralize kemik matriksi ve bunun oluşan kemik kalitesi ve konsolidasyon dönemi üzerindeki hızlandırıcı etkisi çalışmasına ait sonuçlar, dışardan uygulanan kemik morfojenik proteinler ve diğer yöntemlerin araştırıldığı çalışmalara paralel veriler içermektedir. Yapılmış çalışmalarda uygulanan yöntemlerin bazıları klinik kullanıma uygulanması pratik olmayan ve sadece distraksiyon fizyolojisi konusunda açıklayıcı etkisi olan yöntemler ve deneyler olmuştur. Klinikte kullanımı ve statik kranial defektlerde başarısı izlenen demineralize kemik matriksinin özellikle, olguları içerisinde çocuk yaş grubunun çok olduğu ve sendromik hastalıkların olduğu distraksiyon osteogenezis olgularında kullanılabileceğini düşünüyoruz. Distraksiyon osteogenezis süreci içinde uygulanacak pek çok yöntemin dolayısı ile DKM'nin de, iyileşmenin, maturasyonun devam ettiği ve kemik morfojenik proteinlerin azalmaya başladığı konsolidasyon dönemi içinde veya başında uygulanması önerilmektedir. DKM'nin kullanıma hazır pratik preparatlarının olması lokal anestezi veya sedasyon anestezisi altında perkütan veya oral mukozdan distraksiyon alanına uygulanabilirliğini artıran bir başka avantajıdır.

## ÖZET

Distraksiyon osteogenezis, kraniyofasiyal patolojilerin tedavisinde kullanılan uzun süreli bir tedavi yöntemidir. Bu çalışmada; demineralize kemik matriksinin, DO'in konsolidasyon dönemi üzerinde fizyolojik süreci hızlandırıcı ve kemik kalitesine etkisini araştırmayı amaçladık.

Ağırlıkları 250-300 gr arasında olan 40 adet Wistar tipi erkek sıçan kullanıldı. Tüm deneklerde sağ hemimandibulada çalışıldı. Cerrahi kontrol grubunda (Grup 3, n=8) yumuşak dokular kesilip tekrar dikildi. Diğer denekler grup 1 (DKM, n=16) ve grup 2 (SF, n=16) olarak ayrıldı. İki gruba distraktör takılarak, osteotomi sonrası 5 gün latans, 0.25 mm oran ve günde 2 defa ritim ile 3mm'lik distraksiyon gerçekleştirildi. Takiben, 4 haftalık konsolidasyon döneminin 1. gününde distraksiyon mesafesine 0.2cc DKM, diğer gruba da 1cc SF uygulandı. Konsolidasyonun 2. haftasında her iki gruptan 8'er denek sakrifiye edilerek sağ hemimandibulaları histolojik incelemeye alındı. Konsolidasyonun 4. haftasında kalan tüm gruplardaki denekler sakrifiye edilerek mandibulaları eksize edildi. Kemik mineral dansitometrik (KMD), histolojik ve immünohistokimyasal inceleme gerçekleştirildi. İncelemede H.E, Masson-trikrom, MMPase-2 ve Caspase-3 kullanılarak kemik iyileşmesi ve apoptozis incelendi. Tüm veriler Kruskal-Wallis yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirildi. Kemik mineral dansitometrik değerleri 2'li gruplar şeklinde Mann Whitney-U testi ile ayrıca değerlendirildi. Histolojik değerlendirmede. 2. ve 4.haftalarda DKM uygulanan grubun SF uygulanan gruba göre kemik iyileşmesi değerlerinin ve hücresel aktivitenin daha iyi olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p<0,05$ ) görüldü. Total KMD sonuçlarına göre DKM, SF ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı, 2'li

karşılaştırmalarda DKM grubu ve SF grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,05$ ,Mann Whitney-U). 1/3 KMD sonuçlarına göre 3 grup arasındaki fark anlamlı iken, 2'li karşılaştırmada DKM grubu SF grubu arasındaki, DKM lehine olan fark, anlamlı değildi ( $p>0.05$ , MannWhitney-U).

Sonuç olarak, klinik kullanıma uygun bir ürün olan DKM'nin, konsolidasyon döneminin başında distraksiyon mesafesine uygulanması ile kemik iyileşmesini olumlu etkilediği ve süreci hızlandığı istatistiksel olarak gösterilmiştir. Distraksiyon ile rekonstrüksiyonu planlanan kraniyofasiyal olgularda, tedavi süreci içinde,genel anesteziye gerek kalmadan, iyileşmeye yardımcı olarak DKM uygulanması öngörülebilir.

## SUMMARY

Distraction Osteogenesis (DO) is the long-term treatment method used for craniyofacial pathologies. In this study, we aimed to investigate the accelerating effect of demineralized bone matrix upon the physiologic process of consolidation period of DO and its sustaining effect upon bone quality.

Forty Wistar type male rats weighting between 250-300 grams were used in the study. All subjects were operated on the right hemimandibula. The soft tissue up to the bone was cut and sutured in the operative control group (group 3 n=8). The remaining subjects were divided into two groups and DBM (group 1, n=16) and %0.09 NaCl (group 2, n=16) groups were formed. Distractor devices were fixed to both groups. After osteotomy, 5 day's latency, the rate of 0,25 milimeters and twice a day as a rhythm with a distraction of 3 milimeters were performed. Later, on the first day of the four weeks' consolidation period DBM was applied to the distraction gap and %0.09 NaCl was applied to the other group. Eight subjects from both groups were sacrificed in the second week of the consolidation and their right hemimandibula were taken for histologic examination. In the fourth week of the consolidation the remaining all subjects were sacrificed and hemimandibulectomies were performed. Bone mineral densitometric (BMD) histologic and immunohistochemical examinations were made. In histological examination H.E., Masson's-trichrome, MMPase-2 ve Caspase-3 were used to examine healing of bone and apoptosis. In the second and fourth weeks, histological examinations and bone densitometric data were statistically evaluated by using Kruskal-Wallis method. BMD results were also evaluated with Mann Whitney-U test in binary groups. In the histological evaluation, at the second and fourth weeks it was seen that the bone

healing results and cellular activities of the group with the DBM application were relatively better than those of the group with %0.09 NaCl application and it was also realized that there was a statistically significant difference ( $p < 0,05$ , Mann Whitney-U). According to 1/3 BMD results, there was a significant difference among three groups; however, in binary comparisons, despite the fact that DBM group had relatively better results than %0.09NaCl group, there was no statistically difference. ( $p > 0.05$ , MannWhitney-U)

In conclusion, the results, regarding to bone healing process are statistically significant and show that healing process is accelerated and affected in a positive way with application of the DBM which is convenient for clinical use, to distracted zone at the beginning of the consolidation phase. These results also show that application of the DBM without general anesthesia, during treatment period, may be preferred by the surgeons to support the healing process of the craniofacial cases that may require distraction.

### KAYNAKLAR

1. Aronson J., Harrison BH., Stewart CL., Harp JH Jr., The histology of distraction osteoneogenesis using different external fixators. Clin Orthop. 241:106, 1989
2. Aronson J., Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis. Cleft Palate-Craniofacial Journal 31(6): 473-81, 1994
3. Aronson J., Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. Clin Orthop. 301:124-131,1994
4. Ashinoff RL., Cetrulo CL. Jr, Galiano RD., Dobryansky M., Bhatt KA., Ceradini DJ., Michaels J. 5th, McCarthy JG., Gurtner GC., Bone morphogenic protein-2 gene therapy for mandibular distraction osteogenesis. Ann Plast Surg. 52(6):585-90, 2004
5. Bancroft JD., Stevens A., Theory And Practice Of Histological Techniques. 4<sup>th</sup> Ed. Churchill Livingstone, New York, Chapter 15, Page: 309-339, 1996
6. Basterzi Y., Sıçan Kraniyal Kemik Defektlerinde İnsan Amniyon Sıvısının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi A.D. S: 15, 2003
7. Bayramiçli Mehmet, Deneysel Mikrocerrahi. Temel Araştırma, Doku Ve Organ Nakli Modelleri. 1. Baskı. Argos İletişim, İstanbul, S:123, 2005
8. Bouletreau PJ., Warren SM., Longaker MT., The molecular biology of distraction osteogenesis. J Craniomaxillofac Surg. 30: 1-11, 2002
9. Califano L., Cortese A., Zupi A., and Tajana G., Mandibular lengthening by external distraction. An experimental study in the rabbit. J Oral Maxillofac. Surg. 52: 1179, 1994

10. Campisi P., Hamdy RC., Lauzier D., Amako M., Schloss MD., Lessard ML.,  
Overview of the radiology, histology, and bone morphogenetic protein expression  
during distraction osteogenesis of the mandible. *The Journal Of Otolaryngology*  
31(5): 281-6, 2002
11. Campisi P., Hamdy RC., Lauzier D., Amako M., Rauch F., Lessard ML.,  
Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction  
osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 111: 201-8, 2003
12. Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A., Chakrabort T., Regulation of  
matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem.* 253: 269-285, 2003
13. Chan CW., Qin L., Lee KM., Cheung WH., Cheng JC., Leung KS., Dose-  
dependent effect of low intensity pulsed ultrasound on callus formation during  
rapid distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 24(11): 2072-9, 2006
14. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N,  
Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC., Osteogenic activity  
of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone  
Joint Surg Am.* 85-A(8): 1544-1552, 2003
15. Cherkashin AM., Samchukov ML., Potential Mistakes and Complications  
During Distraction Osteogenesis. *Craniofacial Distraction Osteogenesis*, 1<sup>st</sup> ed.,  
Mosby Inc., St. Louis, Chapter 68, page 583-94, 2001
16. Concannon MJ., Boschert MT., Puckett CL., Bone induction using  
demineralized bone in the rabbit femur: A long-term study. *Plast Reconstr Surg.*  
99: 1983-88, 1997

17. Connolly JP., Liu ZJ., Wang L., Whelan MF., Huang JG., Williams JK., King GJ., A custom mandibular distraction device for the rat. *The Journal Of Craniofacial Surgery* 13(3): 445-50, 2002
18. Cope JB., Samchukov ML., Cherkashin AM., Historical Development and Evolution of Craniofacial Distraction Osteogenesis. *Craniofacial Distraction Osteogenesis*, 1<sup>st</sup> ed., Mosby Inc., St. Louis, Chapter 1, page 3-17, 2001
19. Cope JB., Samchukov ML., Regenerate bone formation and remodeling during mandibular osteodistraction. *Angle Orthodontist* 70(2): 99-111, 2000
20. Davy DT., Biomechanical issues in bone transplantation. *Orthop Clin North Am.* 30(4):553-63, 1999
21. Eski M., Nişancı M., Cil Y., Şengezer M., Özcan A., A custom-made distraction device for experimental mandibular distraction osteogenesis. *The Journal Of Craniofacial Surgery* 16(4): 675-83, 2005
22. Farhadieh RD., Yu Y., Dickinson R., Gianoutsos MP., Walsh WR., The role of transforming growth factor- $\beta$ , insulin-like growth factor-1 and basic fibroblast growth factor in distraction osteogenesis of the mandible. *J Craniofac Surg.* 10: 80,1999
23. Farhadieh RD., Gianouotuos MP.Dickinson, Walsh BS., Effect of distraction Rate on biomechanical mineralization and histologic properties of an ovine mandible model. *Plast Reconstr Surg.* 105: 889-895, 2000
24. Fink B., Pollnau C., Vogel M., Skripitz R., Enderle A., Histomorphometry of distraction osteogenesis during experimental tibial lengthening. *J Orthop Trauma.* 17(2): 113-8, 2003

25. Fisher E., Staffenberg DA., Mccarthy JG., Miller DC., Zeng J., Histopathologic and biochemical changes in the muscles affected by distraction osteogenesis of the mandible. *Plast Reconstr Surg.* 99:366-71, 1997
26. Genecov DG., Agarwal R., Genecov ER., Salyer KE., Evolution of Extraoral Mandibular Distraction: Case Reports Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM.(eds), *Craniofacial Distraction Osteogenesis*, 1<sup>st</sup> ed., Mosby Inc., St. Louis, Chapter 23, page 230-235, 2001
27. Hagino S., Hamada Y., Accelerating bone formation and earlier healing after using demineralized bone matrix for limb lengthening in rabbits. *J Orthop Res.* 17(2): 232-7, 1999
28. Hagiwara T., Bell WH., Effect of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis. *J Cranio Maxillofac Surg.* 28: 12-19, 2000
29. Hamdy RC., Amako M., Beckman L., Kawaguchi M., Rauch F., Lauzier D., Steffen T., Effects of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 33: 248-55, 2003
30. Harper RP., Bell WH., Hinton RJ., Browne R., Cherkashin AM., Samchukov ML., Reactive changes in the temporomandibular joint after mandibular midline osteodistraction. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 35: 20-25, 1997
31. Hollinger JO., Mark DE., Goco P., Quigley N., Desverreaux RW., Bach DE., A comparison of four particulate bone derivatives. *Clin Orthop Relat Res.* 267: 255-263, 1991
32. Hornicek FJ, Woll JE, Kasprisin D, eds: *Standards for Tissue Banking*, 10th ed. McLean, VA: American Association of Tissue Banks, 2002
33. Hughes DE., Boyce BF., Apoptosis in bone physiology and disease. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 50: 132-137, 1997

34. Ilizarov GA., The tension stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. Clin Orthop Relat Res. 238: 249-281, 1989
35. Ilizarov GA., The tension stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. Clin Orthop Relat Res. 239: 263-85, 1989
36. Isaksson S., Alberius P., Comparison of regenerative capacity elicited by demineralized bone matrix of different embryonic origins. J Craniomaxillofac Surg. 20: 73-80, 1992
37. Izawa H., Hachiya Y., Kawai T., Muramatsu K., Narita Y., Ban N., Yoshizawa H., The effect heat-treated human bone morphogenetic protein on clinical implantation. Clin Orthop Relat Res. 390: 252-258, 2001
38. Junqueira LC., Carneiro J., Basic Histology 10<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York, Chapter 8, page: 144, 2003.
39. Karaharju EO., Aalto K., Kahri A., Lindberg LA., Kallio T., Karaharju-Suvanto T., Vauhkonen M., Peltonen J., Distraction bone healing. Clin Orthop Relat Res. 297: 38-43, 1993
40. Karp NS., McCarthy JG., Schreiber JS. et al. Membranous bone lengthening: A serial histological study. Ann Plast Surg. 29: 2-7, 1992
41. Kierszenbaum AL., Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş. 1<sup>st</sup> ed. Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 118. 2006

42. Komuro Y., Takato T., Harri K., Yonemara Y., The histological analysis of distraction osteogenesis of the mandible in rabbits. *Plast Reconstr Surg.* 94: 153-9, 1994
43. Kruse-Lösler B., Meyer U., Flören C., Joss U., Influence of distraction rates on the temporomandibular joint position and cartilage morphology in a rabbit model of mandibular lengthening. *J Oral Maxillofac Surg.* 59: 1452-59, 2001
44. Kruse-Lösler B., Joss U., Meyer T., Meyer U., Temporomandibular Joint Alterations during Distraction Osteogenesis. Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM.(eds), *Craniofacial Distraction Osteogenesis*, 1<sup>st</sup> ed., Mosby Inc., St. Louis, Chapter 12, page 118-127, 2001
45. Ladd AL., Pliam NB., Use of bone-graft substitutes in distal radius fractures. *J Am Acad Orthop Surg.* 7(5): 279-290, 1999
46. Leslie P. Gartner, James L. Hiatt, *Color textbook of Histology*. 2<sup>th</sup> edition, W.B. Saunders company, page:129-155, 2001
47. Li G., Simpson AH., Kenwright J., Triffitt JT., Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *J Orthop Res.* 15(5): 765-772, 1997
48. Ludwig SC., Boden SD., Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: A basic science summary. *Orthop Clin North Am.* 30(4): 635-45, 1999
49. Makarov MR., Samchukov ML., Cope JB., Muirhead DE., The Effect of Gradual Traction on Skletal Muscles *Craniofacial Distraction Osteogenesis*, 1<sup>st</sup> ed., Mosby Inc., St. Louis, Chapter 8, page 75-88, 2001

50. Martin GJ. Jr., Boden SD., Titus L., Scarborough NL., New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine* 24(7): 637-645, 1999
51. McCarthy J., The role of distraction osteogenesis in the reconstruction of the mandible in unilateral craniofacial microsomia. *Clin Plast Surg.* 21: 625-31, 1994
52. McCarthy JG.,Schreiber J., Karp N., Thorne CH., Grayson BH., Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg.* 89(1): 1-8, 1992
53. McCarthy JG., Stelnicki EJ., Mehrara BJ., et al. Distraction osteogenesis of the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg.* 107: 1812–1827, 2001
54. Mehrara BJ., McCarthy JG., Repair and Grafting of Bone. *Plastic Surgery 2<sup>th</sup> edition Vol 1 General Principles Mathes SJ.(ed). Saunders Elsevier, Philadelphia, Chapter 24, page 639-718, 2006*
55. Meyer T., Meyer U., Stratmann U., Wiesmann HP., Joos U., Identification of apoptotic cell death in distraction osteogenesis. *Cell Biol Int.* 23: 49-46, 1999
56. Michieli S., Miotti B., Lengthening of mandibular body by gradual surgical orthodontic distraction. *J Oral Surg.* 35: 187,1977
57. Mizumoto Y., Moseley T., Drews M., Cooper3rd VN., Reddi AH., Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A (Suppl 3): 124-30, 2003
58. Mofid MM., Manson PN., Robertson BC., Tufaro AP., Elias JJ., Vander Kolk CA., Craniofacial distraction osteogenesis: A review of 3278 cases. *Plast Reconstr Surg.* 108: 1103-1114, 2001

59. Mofid MM., Inoue N., Atabey A., Marti G., Chao EY., Manson PN., Vander Kolk CA., Callus stimulation in distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 109(5): 1621-9, 2002
60. Nunotani Y., Abe M., Shirai H., Otsuka H., Efficacy of rhBMP-2 during distraction osteogenesis. *J Orthop Sci.* 10: 529-33, 2005
61. Ömeroğlu S., Uçankuş NL., Distraksiyon osteogenezisde kemik iyileşmesi derecelendirme sistemi. Yayınlanmamış bilgi (Unpublished data).
62. Özeç İ., Öztürk M., Kılıç E., Yeler H., Göze F., Gümüş C., Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on mandibular distraction osteogenesis. *The Journal Of Craniofacial Surgery* 17(1): 80-83, 2006
63. Paccione MF., Mehrara BJ., Warren SM., Greenwald JA., Spector JA., Luchs JS., Longaker MT., Rat mandibular distraction osteogenesis: Latency, rate, and rhythm determine the adaptive response. *The Journal Of Craniofacial Surgery* 12(2): 175-182, 2001
64. Pampu AA., Dolanmaz D., Tuz HH., Karabacakoglu A., Experimental evaluation of the effects of zoledronic acid on regenerate bone formation and osteoporosis in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 64(8): 1232-6, 2006
65. Panikarovski VV., Grigoryan AS., Kaganovich SI., et al. Reperative osteogenesis of the mandible under compression-distraction osteogenesis experimental investigation. *Stomatologiya* 3: 21, 1982
66. Rauch F., Lauzier D., Travers R., Glorieux F., Hamdy R., Effects of locally applied transforming growth factor- $\beta$ 1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. *Bone* 26: 619-24, 2000

67. Reddi AH., Anderson WA., Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. *J Cell Biol.* 69(3): 557-572, 1976
68. Reddi AH., Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 83-A Suppl 1: 1-6, 2001
69. Rowe NM., Mehrara BJ., Dudziak ME., et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: Part I: histologic and radiographic analysis. *Plast Reconstr Surg.* 102: 2022-32, 1998
70. Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM., *Biologic Basis of New Bone Formation Under the Influence of Tension Stress. Craniofacial Distraction Osteogenesis*, 1<sup>st</sup> ed., Mosby Inc., St. Louis, Chapter 2, page 21-36, 2001
71. Schulten AJM., Zimmermann CE., Glowacki J., Osteoclastic bone resorption around intraosseous screws in rat and pig mandibles. *Microsc Res Tech.* 61: 533-39, 2003
72. Shao Z., Liu B., Peng Q., Liu W., Liu Y., Liu R., Xu Y., Liu L., Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in the rabbit mandible. *Plast Reconstr Surg.* 119(2): 500-7, 2007
73. Shermak MA., Wong L., Inoue N., Nicol T., Reconstruction of complex cranial wounds with demineralized bone matrix and bilayer artificial skin. *J Craniofac Surg.* 11(3): 224-31, 2000
74. Skowronski PP., An YH., Bone graft materials in orthopaedics. *Musc Orthopaed J.* 6: 58–66, 2003

75. Smith K., Harnish M., Pediatric Sleep Apnea Treated With Distraction Osteogenesis. Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM.(eds),Craniofacial Distraction Osteogenesis, 1<sup>st</sup> ed., Mosby Inc., St. Louis, Chapter 21, page 213-224, 2001
76. Snyder CC., Levine GA., Swanson HM., et al. Mandibular lengthening by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg.* 51: 506–508, 1973
77. Spector JA., Luchs JS., Mehrara BJ., Greenwald JA., Smith LP., Longaker MT., Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg.* 107: 124, 2001
78. Stewart KJ., Lvoff GO., White SA., Bonar SF., Walsh WR., Smart RC., Poole MD. Mandibular distraction osteogenesis: A comparison of distraction rates in the rabbit model. *J Craniomaxillofac Surg.* 26: 43-49, 1998
79. Swennen G., Dempf R., Schliephake H., Cranio-facial distraction osteogenesis: A review of the literature. Part II: experimental studies. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 31: 123-135, 2002
80. Swenson CL., Arnoczky SP., Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: In vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A(2): 323-332, 2003
81. Tavakoli K., Walsh WR., Smart R., et al. The role of latency in mandibular osteodistraction. *J Craniomaxillofac Surg.* 26: 209, 1998
82. Troulis MJ., Glowacki J., Perrot DH., Kaban LB., Effects of latency and rate on bone formation in a porcine mandibular distraction model. *J Oral Maxillofac Surg.* 58: 507-513, 2000

83. Ueda M., Matsuno M., Kensuke S., Hata KI. Mechanisms of New Bone Formation During Distraction Osteogenesis: A Preliminary Report. Samchukov ML., Cope JB., Cherkashin AM.(eds),Craniofacial Distraction Osteogenesis, 1<sup>st</sup> ed. Mosby Inc., St. Louis, Chapter 3, page 37-41, 2001
84. Urist MR., Bone: Formation by autoinduction. Science 150: 893–899, 1965
85. Warren SM., Mehrara BJ., Steinbrech DS., Paccione MF., et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: Part III gradual distraction versus acute lengthening. Plast Reconstr Surg. 107: 441-53, 2001
86. White SH., Kenwright J., The timing of distraction of an osteotomy. J Bone Joint Surg Br. 72: 356-61, 1990
87. Winn SR., Uludag H., Hollinger JO., Carrier systems for bone morphogenetic proteins. Clin Orthop Relat Res. 367 Suppl: 95-106, 1999
88. Yasui N., Sato M., Ochi T., Kimura T., Kawahata H., Kitamura Y., Nomura S., Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. J Bone Joint Surg. (Br) 79-B: 824-30, 1997
89. Yazawa M., Kishi K., Nakajima H., Nakajima T., Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. J Oral Maxillofac Surg. 61: 587-592, 2003
90. Zakhary K., Motakis D., Hamdy RH., Campisi P., Amar Y., Lessard ML., Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-7 on bone density during distraction osteogenesis of the rabbit mandible. J Otolaryngol. 34(6): 407-14, 2005

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin 01/2007-85 numaralı desteği ile gerçekleştirilmiştir.