

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

BAŞKANLIĞI

**SÜPERFİSİYAL TEMPORAL FASYA KULLANILAN
DENEYSEL KEMİK DEFEKTİ MODELİNDE; TROMBOSİTTEN
ZENGİN PLAZMA, KEMİK İLİĞİ STROMAL HÜCRE ve
ELEKTROMANYETİK ALAN STİMÜLASYONUNUN
OSTEOGENEZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Emin KAPI

Danışman

Doç. Dr. Mehmet BOZKURT

DİYARBAKIR- 2010

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI
BAŞKANLIĞI**

**SÜPERFİSİYAL TEMPORAL FASYA KULLANILAN
DENEYSEL KEMİK DEFECTİ MODELİNDE; TROMBOSİTTEN
ZENGİN PLAZMA, KEMİK İLİĞİ STROMAL HÜCRE ve
ELEKTROMANYETİK ALAN STİMÜLASYONUNUN
OSTEOGENEZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Destekleyen kurum ve proje numarası;

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu
(DÜBAP) / 08-TF-03

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Emin KAPI

Danışman

Doç. Dr. Mehmet BOZKURT

DİYARBAKIR- 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no:</u>
1.1. ÖNSÖZ.....	i
1.2. KISALTMA LİSTESİ.....	ii
1.3. SİMGE LİSTESİ.....	iv
1.4. RESİM ve ŞEKİL LİSTESİ.....	v
1.5. TABLO ve GRAFİK LİSTESİ.....	vii
2.1. ÖZET.....	ix
2.2. ABSTRACT.....	x
3.1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
3.2. GENEL BİLGİLER.....	5
3.2.1. ANATOMİ.....	5
3.2.1.1. Sıçanda kalvaryal anatomi.....	5
3.2.1.2. Zigoma anatomisi.....	6
3.2.1.3. Süperfisiyal temporal fasya anatomisi.....	7
3.2.2. KEMİK İYİLEŞMESİ.....	8
3.2.2.1. Kondral ossifikasyon.....	10
3.2.2.1.1. Perikondral ossifikasyon.....	10
3.2.2.1.2. Enkondral ossifikasyon.....	10
3.2.2.2. İntramembranöz ossifikasyon.....	10
3.2.3. DENEYSEL KEMİK DEFEKTİ MODELLERİ.....	11
3.2.3.1. Femur.....	11
3.2.3.2. Kalvaryum.....	12
3.2.3.3. Radius.....	12
3.2.3.4. Zigoma.....	12
3.2.4. SÜPERFİSİYAL TEMPOROPARYETAL FASYA FLEBİ.....	13
3.2.5. FLEP MANİPÜLASYONU.....	14
3.2.5.1. Prefabrikasyon.....	14
3.2.5.2. Prelaminasyon.....	14
3.2.6. DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	14
3.2.7. SKAFOLDLAR.....	15
3.3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.3.1. PİLOT ÇALIŞMA.....	17

3.3.2.	DENEY GRUPLARI.....	: 21
3.3.3.	CERRAHİ YÖNTEM.....	: 21
3.3.3.1.	Süperfisiyal temporal fasya flebinin kaldırılması.....	: 22
3.3.3.2.	Kemik defektinin oluşturulması.....	: 23
3.3.3.3.	Non-union modelinin oluşturulması.....	: 24
3.3.3.4.	Trombositten zengin plazma preparasyonu.....	: 26
3.3.3.5.	Kemik iliği stromal hücre preparasyonu.....	: 27
3.3.3.6.	İntralüminal bileşenlerin yerleştirilmesi.....	: 28
3.3.4.	MANYETİK ALAN UYGULAMASI.....	: 30
3.3.5.	RADYOLOJİK DEĞERLENDİRMELER.....	: 32
3.3.6.	BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....	: 34
3.3.7.	HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRMELER.....	: 36
3.3.8.	İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	: 37
3.4.	BULGULAR.....	: 38
3.5.	TARTIŞMA.....	: 59
3.6.	SONUÇ.....	: 76
3.7.	KAYNAKLAR.....	: 77

1.1. ÖNSÖZ

“Süperfisiyal Temporal Fasya Kullanılan Deneysel Kemik Defekti Modelinde; Trombositten Zengin Plazma, Kemik İliği Stromal Hücre ve Elektromanyetik Alan Stimülasyonunun Osteogenez Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması” adlı uzmanlık tezi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığı’nın 15 Ekim 2008 gün ve 517 sayılı yazısı ile verilmiş, 18 Haziran 2009 tarih ve 08-TF-03 sayı ile etik kurul onayı alınıp çalışmaya başlanmıştır.

Travma, tümör, osteomiyelit gibi etiyolojik nedenlere bağlı olarak kemik dokusu kayıplarından sonra, bazı durumlarda kırık sahasında kemik dokusu kaybı ile belirgin doku eksiklikleri oluşabilir. Günümüzde, kemik iyileşmesini arttırıcı çeşitli kombinasyonlar uygulanarak ideal bir onarım süreci elde edilmeye çalışılmaktadır. Literatürde, kemik rejenerasyonunu arttırıcı çok sayıda yöntemin mevcut olmasına karşın, klinik uygulamalara aktarılacak üzere planlanan ayrıntılı deneysel çalışmalara halen gereksinim vardır. Bu deneysel çalışmada sıçan zigomatik kemik defekti modelinde, süperfisiyal temporal fasya kullanılarak oluşturulan skafold ile farklı osteoindüktif ve osteokondüktif materyallerin kemik rejenerasyonuna etkisi; biyokimyasal, histopatolojik ve radyolojik olarak ortaya konmaya çalışılmıştır.

Uzmanlık eğitimim boyunca ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde çok değerli destek ve yardımlarını gördüğüm, bilgi ve görgüsünden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Mehmet BOZKURT’a, Yrd. Doç. Dr. Samet Vasfi KUVAT’a, Uzm. Dr. Halit BAYKAN’a, kemik mineral yoğunluğu ölçümleri sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. M. Salih Çelik, Yrd. Doç. Dr. Veysi Akpolat, Özlem Torun Karakoyun ve Özgül İnal’a, biyokimyasal analizleri gerçekleştiren Prof. Dr. Fatma Birgül Işık ve Arş. Gör. Dr. Beri Hocoğlu Bozarslan’a, histopatolojik preparatların incelenmesini üstlenen Prof. Dr. Bülent Mızrak’a, elde edilen bulguların yorumlanmasında ve istatistiksel değerlendirmelerde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yusuf Çelik’e, çalışmanın mali desteğini üstlenen Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonuna (DÜBAP), deney hayvanı laboratuvarı çalışanlarına, tüm uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma, klinik görevli arkadaşlarıma, her zaman bana destek olan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime, her an yanımda olan sevgili eşim Gülay’a ve oğlum Eymen’e sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

1.2. KISALTMA LİSTESİ

ABD; Amerika Birleşik Devletleri

ALP; Alkalen phosphatase (alkalen fosfataz)

ANOVA; Analyze /compare Means / One way anova (tek yönlü varyans analizi)

bFGF; Basic fibroblast growth factor (bazik fibroblast büyüme faktörü)

BMC; Bone mineral capacity (kemik mineral kapasitesi)

BMD; Bone mineral density (kemik mineral yoğunluğu)

BMP; Bone morphogenetic protein (kemik morfogenetik protein)

BMSC; Bone marrow stromal cell (kemik iliği stromal hücre)

BUA; Broadband ultrasonic attenuation (geniş bantlı ultrasonik zayıflama)

COX; Cyclooxygenase (siklooksijenaz)

CT; Computerized tomography (bilgisayarlı tomografi)

DPA; Dual photon absorptiometry (çift foton absorbsiyometrisi)

DXA; Dual photon X-ray absorptiometry (çift foton X-ışını absorbsiyometrisi)

DÜSAM; Dicle Üniversitesi Selahattin Payzın Deneysel Araştırma Merkezi

EDTA; Etilen diamin tetra asetic acid

EGF; Epithelial growth factor (epitelyal büyüme faktörü)

ELFMF; Extremely Low Frequency Magnetic Fields (çok düşük frekanslı manyetik alan)

FDA; (US) Food and drug administration (Amerikan gıda ve ilaç dairesi)

HCl; Hydrochloric acid (hidroklorik asit)

IGF; Insulin growth factor (insülin büyüme faktörü)

IL; Interleukin (interlökin)

IU; International unit

MRG; Manyetik rezonans görüntüleme

N; Normal

PDGF; Platelet derived growth factor (trombosit kaynaklı büyüme faktörü)

PEMF; Pulsed electromagnetic field (pulsu elektromanyetik alan)

PF-4; Platelet factor-4 (trombosit faktörü-4)

PPP; Platelet poor plasma (trombositten fakir plazma)

PRP; Platelet rich plasma (trombositten zengin plazma)

SEMF; Sinusoidal electromagnetic field (sinüzoidal elektromanyetik alan)

SOS; Speed of sound (ses hızı)

SPA; Single photon absorptiometry (tek foton absorbsiyometrisi)

SPSS; Statistical Package for the Social Science (toplumsal bilim istatistik paketi)

SXA; Single energy X-ray absorptiometry (tek enerjili X-ışını absorbsiyometrisi)

TGF; Transforming growth factor (transforme edici büyüme faktörü)

TNF; Tumor necrosis factor (tümör nekroz faktörü)

USA; United States of America (Amerika Birleşik Devletleri)

VEGF; Vascular endothelial growth factor (damar kaynaklı büyüme faktörü)

1.3. SİMGE LİSTESİ

A; Amper

a; Arter

°C; Degree Celcius (santigrad derece)

cm; Centimeter (santimetre)

gr; Gram

Hz; Hertz

kDA; Kilodalton

kg; Kilogram

lt; Liter (litre)

mg; Miligram

µg; Microgram (mikrogram)

ml; Mililiter (mililitre)

mm; Milimeter (milimetre)

µm; Micrometer (mikrometre)

mrem; Milirem

µs; Microsecond (mikrosaniye)

mT; Militesla

n; Nerve (sinir)

ng; Nanogram

nm; Nanomol

rpm; Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)

v; Ven

1.4. RESİM ve ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no:

Resim 1: Sıçan kafatasının yukarıdan görünümü.....	5
Resim 2: Sakrifiye denekte kafatasının yukarıdan, kas tabakası planından görünümü.....	6
Resim 3: Sıçan kafatasının yandan görünümü.....	6
Resim 4: Sakrifiye edilmiş sıçanda zigomanın yandan masseter ve temporal kas ayrıştırıldıktan sonraki görünümü.....	7
Resim 5: Temporoparyetal fasya flebi kaldırılması amacıyla planlanan deri insizyonu.....	18
Resim 6: Flebin pedikül üzerinde aksiyel olarak eleve edilmiş görünümü.....	19
Resim 7: Flebin zigoma kemiği üzerinde ilerletilmiş görünümü.....	19
Resim 8: Flep pedikülünün metilen mavisi ile boyanmış görünümü.....	20
Resim 9: Flebin damar yapısının mikroanjiyografik görüntüsü.....	20
Resim 10: Deney hayvanına verilen ameliyat pozisyonunun görünümü.....	22
Resim 11: Süperfisiyal temporal fasyanın eleve edilmiş görünümü.....	22
Resim 12: Temporal ve masseter kasları kenara alındıktan sonra zigomatik kemiğin açığa çıkarılması.....	23
Resim 13: Zigomadan eksize edilmesi planlanan 4 mm'lik kemik segmentinin işaretlenmesi.....	23
Resim 14: Zigomadan kemik segmentinin eksize edilmesi.....	24
Resim 15: Temporal fasya içerisine silikon blok yerleştirilmesi.....	25
Resim 16: Prelamine fasya ve silikon bloğun kemik defekti içerisine yerleştirilmiş görünümü.....	25
Resim 17: İnsizyonların kapatılmasından sonraki erken postoperatif görünüm.....	26
Resim 18: Kemik iliği aspiratı alınacak kemiklerin işlem öncesi görüntüleri.....	28
Resim 19: Kemik defektine PRP enjeksiyonunun uygulanışı.....	29
Resim 20: Faraday kafesinin görünümü.....	30
Resim 21: Kafes içerisindeki manyetik alan yoğunluğunun ölçülmesi.....	31
Resim 22: Manyetik alan ölçümünün yapıldığı Teslametrenin görünümü.....	31
Resim 23: Faraday kafesi içerisine yerleştirilen sıçanların görünümü.....	32
Resim 24: Çekim öncesi fiberglas kutuya yerleştirilen sıçanın görünümü.....	32
Resim 25: DXA cihazının çekim sırasındaki görünümü.....	33
Resim 26: DXA işlemi sonucunda elde edilen kemik yoğunluk ölçümlerinin	

görünümü.....	: 33
Resim 27: Kemik mineral ölçümlerinin R1 ve R2 şeklinde kayıt altına alınması.....	: 34
Resim 28: İdrar örneği elde etmek amacıyla kullanılan metabolik kafesin görünümü..	: 34
Resim 29: Mikroskopik analizde saptanan hücresel farklılıkların gruplar arası dağılımı (hematoksilen&eozen, Masson's trichrome, x40).....	: 54
Şekil 1: Süperfisiyal temporal fasyanın anatomik olarak şematize edilmiş görünümü (çizgili alan).....	: 8
Şekil 2: Kemik rejenerasyon süreci ve büyüme faktörlerinin etkisi.....	: 9
Şekil 3: Süperfisiyal temporal fasya flebinin şematik çizimi.....	: 13
Şekil 4: Deney gruplarının şematik görünümü.....	: 21
Şekil 5: Süperior plandan sağ zigomada oluşturulan defektin şematik çizimi.....	: 24
Şekil 6: PRP elde edilmesinde uygulanan aşamaların şematik çizimi.....	: 27
Şekil 7: Kemik iliği elde edilmesinde uygulanan prosedürlerin şematik çizimi.....	: 28
Şekil 8: Kemik defektine BMSC uygulanmasının şematik çizimi.....	: 29

1.5. TABLO ve GRAFİK LİSTESİ

Sayfa no:

Tablo 1: Donör sıçanlardan elde edilen trombosit zengin plazmadaki trombosit değerleri (K/ μ L).....	: 38
Tablo 2: Gruplarda yer alan sıçanların idrar hidroksiprolin (μ g/ml) sonuçları.....	: 38
Tablo 3: Deneklerin alkalen fosfataz (ALP) aktivitelerinin (U/L) sonuçları (N: 40-150).....	: 39
Tablo 4: Deneklere uygulanan osteokalsin ölçümlerinin (ng/ml) sonuçları (N: 3.1-13.7).....	: 39
Tablo 5: Deneklerden elde edilen doku hidroksiprolin (mg/gr yaş doku) sonuçları.	: 40
Tablo 6: İdrar hidroksiprolin, ALP, doku hidroksiprolin ve osteokalsin değişkenlerinin gruplararası karşılaştırma sonuçları.....	: 40
Tablo 7: İdrar örneklerinden elde edilen hidroksiprolin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçları.....	: 43
Tablo 8: ALP değerlerinin ikişerli grup ortalamalarının Bonferroni testi ile karşılaştırma sonuçları.....	: 44
Tablo 9: Osteokalsin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçları.....	: 45
Tablo 10: Dokudan elde edilen hidroksiprolin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçları.....	: 46
Tablo 11: Deneklerden alınan örneklerin histopatolojik incelemesinde değerlendirilen parametrelerin gözlenme oranları.....	: 47
Tablo 12: Histopatolojik parametrelerin gruplar arası skorlama sonuçlarının dağılımı.....	: 50
Tablo 13: Deneklerden alınan doku preparatlarında histopatolojik olarak saptanan kemik köprüleşme oranları.....	: 52
Tablo 14: Kemik köprüleşme oranları açısından gruplar arası skorların dağılımı.....	: 52
Tablo 15: Deneklerin BMD (gr/cm^2) sonuçları.....	: 54
Tablo 16: DXA analizinin postoperatif 1. gün ve 6. aydaki bulgularının farklarının karşılaştırma sonuçları.....	: 57
Tablo 17: DXA analizi ile elde edilen R1 ve R2 değerlerinin 1. gün ve 6. aydaki farklarının grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçları	: 57

Grafik 1: İdrar hidroksiprolin değişkenlerinin gruplararası karşılaştırma sonuçları..	: 41
Grafik 2: ALP ortalama değerlerinin gruplararası karşılaştırma sonuçları.....	: 41
Grafik 3: Osteokalsin ortalama değerlerinin gruplararası karşılaştırma sonuçları....	: 42
Grafik 4: Doku hidroksiprolin ortalama değerlerinin gruplararası karşılaştırma sonuçları.....	: 42
Grafik 5: Histopatolojik değerlendirmede belirlenen pozitif bulgu oranına göre gruplar arası farklılıkların dağılımı.....	: 51
Grafik 6: Kemik köprüleşme oranları açısından gruplar arası farklılıkların dağılımı	: 53

2.1. ÖZET

Herhangi bir nedenle ortaya çıkan kemik defektlerinin onarımı, plastik ve rekonstrüktif cerrahide önemli bir yere sahiptir. Bu defektlerin tedavilerinde amaç, defektin bulunduğu alandaki doku devamlılığının yeniden sağlanmasıdır. Bu defektler bazı durumlarda karşımıza geniş boyutlu olarak çıkabilir. Bu gibi geniş defektlerde spontan iyileşme sınırlıdır ve sıklıkla cerrahi müdahaleye gereksinim duyulur. Cerrahi müdahale aşamasında en sık kullanılan seçeneklerden birisi otojen kemik greftleridir. Ancak bu uygulamanın donör alan problemini bulunması ve sınırlı boyutta elde edilme imkanı bulunduğu için alternatif yöntemler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Bu deneysel çalışmada, kemik rejenerasyonuna olumlu etkilerinin olduğu ileri sürülen PRP, BMSC ve manyetik alan uygulamasının; süperfisiyal temporal fasya ile sarılan zigomatik kemik defekti modelinde, kemik iyileşme hızına etkisi değerlendirilmiştir.

Deneklerin zigomatik kemiğinde 4 mm'lik defekt oluşturulduktan sonra etrafı süperfisiyal temporal fasya flebi ile sarılmış ve non-union modeli oluşturulmuştur. Cerrahi sonrasında defekt alanına PRP, BMSC ve elektromanyetik alan uygulamasının farklı kombinasyonları uygulanmıştır. Uygulama sonrasında deneklerin kemik rejenerasyonları hidroksiprolin, ALP aktivitesi ve osteokalsin ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Tüm denekler kemik yoğunluğu ölçümüne tabi tutulmuşlardır. Deney sonunda alınan biyopsiler histopatolojik olarak incelenmiş ve kemik rejenerasyonu oranları mikroskopik olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmadan elde edilen bulgular sonucunda, PRP ve PEMF uygulamasının, kemik rejenerasyonu açısından oldukça yararlı ve etkili bir kombinasyon olduğu saptandı. Çalışmada kullanılan süperfisiyal temporal fasya flebinin de otojen, vasküler ve 3 boyutlu olması nedeniyle ideal bir kemik rejenerasyon ortamı sağlayan iyi bir skafold seçeneği olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, kritik boyutlu ya da iyileşmeyen kemik defektlerinde bu kombinasyonun oldukça kullanışlı bir tedavi seçeneği olduğu ve klinik uygulamalarda güvenle kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler; Kemik defekti, trombosit zengin plazma, mezenkimal kök hücre, elektromanyetik alan, doku mühendisliği

2.2. ABSTRACT

Comparison of Effects for Platelet Rich Plasma, Bone Marrow Stromal Cell and Electromagnetic Field Stimulation Superficial Temporal Fascia Used at Experimental Bone Defect Model

Reconstruction of bone defects that occur because of any reason has an important place in plastic and reconstructive surgery. The objective of the treatments of these defects is to reinstate the continuity of tissues placed in the area in which the defect has occurred. Spontaneous healing is limited in such large defects and often requires surgical intervention. Autogenous bone graft is one of which are used most frequently in the surgical intervention process. However, studies on alternative methods are carried out since this implementation has donor site complications and has a chance to obtain them in limited sizes.

In this experimental study, the effect of the PRP, BMSC and magnetic field implementations which propound that they have a positive impact on bone regeneration were evaluated with the bone recovery speed in the zygomatic bone defect model enwrapped with superficial temporal fascia.

After creating a 4 mm defect on the zygomatic bone of the experiments, the defect was encompassed with a superficial temporal fascial flap and a non-union was created. After surgery, different combinations of the PRP, BMSC and electromagnetic field implementations were implemented on the defected area. After implementation, bone regenerations of the experiments were evaluated with hydroxproline, ALP activity and osteocalcin measurements. All the experiments were subjected to bone density measurement. At the end of the experiment the conducted biopsies were histopathologically examined and the bone regeneration rates were microscopically evaluated.

As a result of the findings, it was detected that the PRP and PEMF implementation was rather a beneficial and an effective combination in terms of bone regeneration. It was observed that the superficial temporal fascial flap used in the experiment was also a well scaffold choice providing an ideal bone regeneration area because of its autogeneous, vascular and three dimensional structures. As a result, it is thought that this combination in the non-healing bone defects is a rather useful treatment choice and it can be used in a reliable way in clinical applications.

Keywords; Bone defect, platelet rich plasma, mesenchymal stem cell, electromagnetic field, tissue engineering

3.1. GİRİŞ ve AMAÇ

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl 6.2 milyonun üzerinde kemik fraktürü vakası ile karşılaşmakta ve bunların % 5-17'si yetersiz iyileşme (delayed union) ya da iyileşmeme (non-union) problemi ile sonuçlanmaktadır (1,2). Bu olguların tedavi sürecinde etkili yöntemlerin uygulanması gerekmektedir. Aksi takdirde etkilenen kişilerin yaşam kaliteleri önemli ölçüde bozulmakta ve bu olgular tekrarlayan cerrahi girişimlere ihtiyaç duymaktadırlar (1-3). Sonuçta direkt ya da indirekt olarak birey ve toplum sağlığı ile ekonomisi zarar görmüş olmaktadır.

Konjenital ya da travma, tümör eksizyonu, osteomyelit, implant gevşemesi gibi sonradan ortaya çıkan nedenlere bağlı kemik defektlerinin onarımı, plastik ve rekonstrüktif cerrahide önemli bir yere sahiptir (4,5). Bu defektlerin tedavilerinde temel odak nokta, defektin bulunduğu alandaki doku devamlılığının yeniden sağlanması ve defekt alanındaki proksimal ile distal kemik ucu arasındaki yeni kemik oluşumu ve büyümesinin sağlanması üzerine yoğunlaşmıştır (2,6-12). Bu defektler bazı durumlarda karşımıza geniş boyutlu olarak çıkabilir (13). Bu gibi geniş defektlerde spontan iyileşme sınırlıdır ve sıklıkla cerrahi müdahaleye gereksinim duyulur (6,12-15). Geniş boyutlu defektlerde iyileşmeme problemiyle karşılaşıldığı zaman defekt alanında köprüleşme olmaz ve gevşek fibröz doku oluşur (16). Bu problemin önüne geçmek amacıyla uygulanan ve kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkisi bulunan, osteointegrasyonu artırıcı çeşitli ajan ve yaklaşımlar bulunmaktadır (12,14,17,18). Bu yöntemler arasında çeşitli kimyasal ve fiziksel prosedürler yer almaktadır (17,19-21). Günümüzde inlay/onlay non-vaskülarize otogreftler, vaskülarize osseöz/osteokutanöz flepler, allogreftler, xenogreftler, sentetik greft materyalleri, büyüme faktörleri, biyomateryaller, çeşitli hücreler ya da kemik yapı iskeleti bileşimlerinin kullanımı ve distraksiyon gibi yöntemler, kemik defekti rekonstrüksiyonunda sık tercih edilen tedavi seçenekleri arasındadır (3,6,12,22-29). Bu yöntemler, farklı indüksiyon mekanizmalarıyla iyileşme oranını % 30-90 arasında arttırabilmektedir.

Non-vaskülarize kemik otogreftlemesi, kemik defekti onarımında altın standart tedaviler arasında yer alır ve uzun zamandan bu yana plastik cerrahi uygulamalarında kullanılan bir yöntemdir (3,4,12,15,22,30-32). Her yıl 2 milyonun üzerinde kemik grefti plastik cerrahi, ortopedik cerrahi, diş hekimliği alanında kullanılmakta ve bunun 500.000 kadarı sadece ABD'de uygulanmaktadır (30). Otolog kemik greftleri kosta, iliak krest ve

kalvaryum gibi donör alanlardan elde edilebilir (13). Bu yöntemin donör saha morbiditesine yol açması, sınırlı boyutta kullanılabilme imkanı, rezorpsiyon potansiyeli ve alınan grefte şekil verme zorluğu gibi birtakım dezavantajları mevcuttur (4,5,12,15,22,28,29,31,33,34). Rezorpsiyon riskini azaltmak amacıyla kemik grefti uygulamalarına çeşitli büyüme faktörlerinin ilavesiyle tatmin edici kalıcı sonuçlar elde edilmeye çalışılmaktadır (22). Bir diğer tedavi seçeneği de allogreft uygulamalarıdır. Bu uygulamaların ise genetik uyumsuzluk, immünolojik reaksiyon ve viral hastalık bulaştırma potansiyeli mevcuttur (3,4,12,28,30,35-37). Otojen ve allogeneik greftlerin kullanımındaki sıkıntılardan ötürü doku mühendisliği yöntemleri güncel tedavide yerini almaya başlamıştır (3,4,15,30,33,38-40). Doku mühendisliği çerçevesinde kemik doku yapı iskeletleri (seramik, kalsiyum sülfat, kalsiyum fosfat, kollajen, sentetik polimerler, demineralize kemik matriks, kemik iliği aspiratları, kanın hücresel bileşenleri ve değişik türde kompozit greftler) yer almaktadır. Bunların avantajları arasında kolay elde edilme, sınırsız kaynak, saklama ve kolay sterilize edilebilme imkanı yer almaktadır (15).

Konsantre trombosit süspansiyonu (PRP; platelet rich plasma; trombosit zengin plazma) otojen kandan elde edilir ve trombosit hücrelerinin yoğunlaştırılmış şeklidir, küçük miktarda plazma içerisinde konsantre trombosit süspansiyonu içerir (15,41-44). PRP ve ürünleri; yara iyileşmesini, hücresel mitogenezi, osteogenezi ve anjiyogenezi artırıcı özelliği nedeniyle klinik uygulamalarda yeri bulunan güncel bileşimlerdir (42,44,45). PRP'nin kemik ve yumuşak doku iyileşmesinde olumlu etkilerinin bulunduğu dair yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur (15). PRP baş-boyun cerrahisi, oküler cerrahi, plastik cerrahi, maksillofasiyal cerrahi, kardiyovasküler cerrahi gibi alanlarda sık kullanılmaktadır (31,41,42,46). PRP; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF; platelet derived growth factor), insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1; insulin growth factor-1), transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) ve 2, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF; basic fibroblast growth factor), trombosit faktörü-4 (PF-4; platelet factor-4) gibi çeşitli büyüme faktörlerini içermektedir (3,15,31,35,37,41,42,44,47-54). Yara iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunu hızlandırıcı etki, bu faktörler sayesinde olmaktadır (35,41,47). Bununla birlikte, trombosit ve ürünlerinin osteojenik hücreler üzerindeki fizyopatolojik etkisi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır ve PRP'nin kemik iyileşmesindeki etkinliği üzerine tartışmalar sürmektedir (41,45). Yapılan deneysel çalışmalarda PRP'nin tek başına ya da kombine kullanımıyla ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir (31,44,55).

Kemik iliği stromal hücreleri (BMSC; bone marrow stromal cell), erişkin kemik iliğinden elde edilir ve iskelet ile sert dokuların rejenerasyonu ile ilgilenen plastik cerrahi, ortopedi, oral ve maksillofasiyal cerrahi alanlarında sık kullanılır (2,35,37,56-66). BMSC'nin spontan iyileşmeyen kritik boyutlu kemik defektlerinde kullanımı oldukça güncel bir yöntemdir (67). Bu hücrelerin kullanımı ile kemik iyileşme süresinin kısaldığı öne sürülmektedir (66). Mezenkimal kök hücreler hücresel terapide önemli bir kaynaktır ve diferansiasyon açısından farklı subpopülasyonlarda hücreler içerir (4,68,69). Pluripotent BMSC, osteoblastların progenitör hücrelerini içerir (67). BMSC'nin kemik, kıkırdak, tendon, adiposit, hepatosit, nöronal hücre, kas hücresi, endotelial hücre ve ligament gibi hematopoietik olmayan dokulara dönüşme potansiyeli vardır (31,35,47,56,66,70-75). Günümüzde kemik iliğinin diferansiasyonu üzerine çok geniş çaplı çalışmalar yapılmaktadır (70). Bunun yanı sıra, in vivo çalışmalarda kemik ve yumuşak doku iyileşmesini hızlandırıcı birkaç kombinasyon üzerine çalışmalar yapılmıştır (76-78). BMSC'nin trombosit süspansiyonuyla tatbik edilmesi, bu kombinasyonlardan biridir (45). Mezenkimal kök hücreler ve büyüme faktörlerinin kullanımı ise inceleme aşamasında olan güncel tedaviler arasındadır. Halen ideal kombinasyon, büyüme faktörü konsantrasyonu ve uygulama sıklığı açısından elde edilen bilgiler sınırlıdır.

Manyetik ve elektromanyetik alan stimülasyonu, 21. yüzyılda sağlık problemlerinin iyileştirilmesinde kullanılmaya başlanan bir yöntemdir. Manyetik alan uygulaması non-invaziv, güvenli ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Klinik ve hayvan çalışmalarında osteogenezisin in vivo olarak elektriksel uyarılar ile regüle edildiği gösterilmiştir (79). Pulsu elektromanyetik alan stimülasyonunun (PEMF; pulsed electromagnetic field), kritik boyutlu kemik defektlerinde gözlenme potansiyeli olan gecikmiş iyileşme ya da iyileşmeme gibi problemleri azalttığı öne sürülmektedir (80). Bu uygulamanın kemik formasyonuna etkili kullanışlı bir metod olduğu öne sürülmektedir ve kemik yaralanmalarında etkilerine dair birkaç çalışma yapılmıştır (17,20).

Süperfisiyal temporoparyetal fasya, insan ve deney hayvanlarında anatomisi iyi tanımlanmış bir sahadır. Vasküler pedikülü sabit ve güvenilirdir ve sıçanlarda alt preauriküler seviyededir. Süperfisiyal temporal fasya flebi ince, bükülebilir, minimal kalınlıkta ve stabil bir fleptir. Bu vaskülarize pediküllü flep sıklıkla lokal olarak fasiyal bölge rekonstrüksiyonunda kullanılır (81).

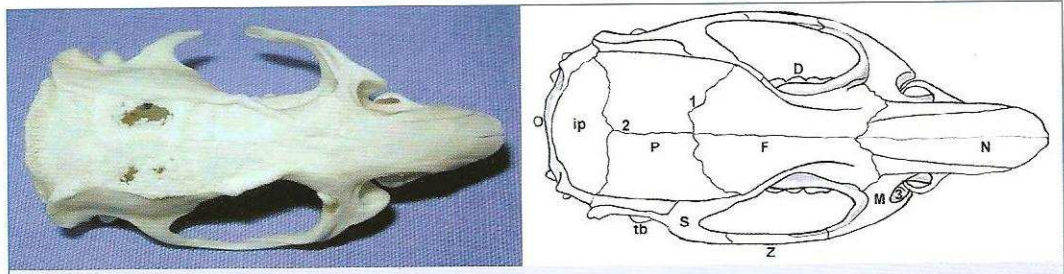
Bu deneysel çalışmada, kemik rejenerasyonuna olumlu etkilerinin olduğu ileri sürülen PRP, BMSC ve manyetik alan uygulamasının; süperfisiyal temporal fasya ile sarılan zigomatik kemik defekti modelinde, kemik iyileşme hızına etkisi karşılaştırılmıştı. Sonuçlar radyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bu uygulamaların osteojenik etkilerinin varlığının bilinmesine rağmen, kombine kullanıldıklarında oluşturdukları etkileri net olarak belli değildir. Kemik rejenerasyonunun optimize edilebilmesi için osteojenik kapasiteyi arttıran kombinasyonlara ihtiyaç duyulduğu bilinen bir gerçektir (14). Bu çalışmanın, literatürde bu konudaki çalışmaları destekleyici ve yol gösterici çalışmalardan biri olduğunu düşünmekteyiz.

3.2. GENEL BİLGİLER

3.2.1. ANATOMİ

3.2.1.1. Sıçanda kalvaryal anatomi

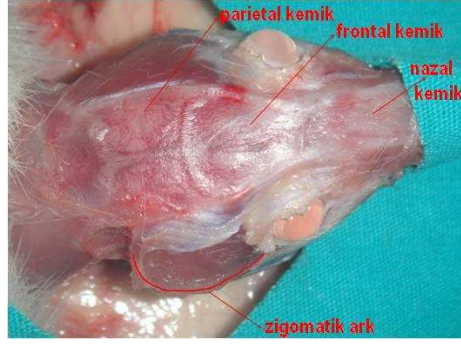
Sıçanlarda uzun bir kafa yapısı mevcuttur ve kalın bir boyunla gövdeye bağlanmaktadır. Kafatası aksiyel iskelet yapısındadır. Üstten bakıldığında önde iki taraflı olarak nazal kemik, arkasında da frontal kemiği içerir (Resim 1). Nazal kemiğin posterolateralinde maksillanın zigomatik çıkıntısı bulunur. Frontal kemiklerin arkasında ise iki taraflı olarak parietal kemikler yer alır. Frontal ve parietal kemikler arasında koronal sütür, her iki parietal kemik arasında ise sagittal sütür yer alır. Parietal kemiklerin arkasında ise interparietal kemik, parietal kemiklerin lateralinde ise skuamöz kemik bulunur. Skuamöz kemiğin posterolateralinde ise timpanik bülla denilen oluşum yer alır. Maksillanın zigomatik çıkıntısı ile skuamöz kemik arasında ark şeklinde yerleşim gösteren zigoma bulunur. Maksillanın alt sınırında ise alveoler arkta çıkan molar dişler göze çarpar (82).



D: Molar dişler; F: Frontal kemik; M: Maksillanın zigomatik çıkıntısı; N: Nazal kemik; O: Oksipital kemik; P: Parietal kemik; S: Skuamöz kemik; ip: İnterparietal kemik; tb: Timpanik bülla; 1: Koronal sütür; 2: Sagittal sütür; 3: İnfraorbital sütür

Resim 1: Sıçan kafatasının yukarıdan görünümü

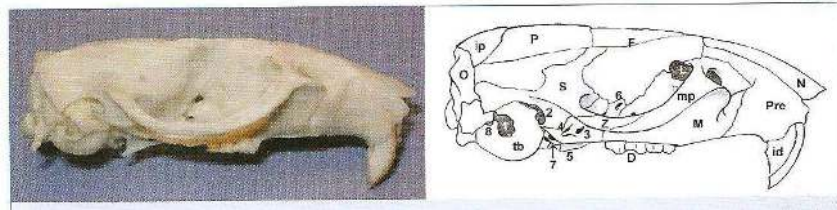
Nazal kemik ve maksillanın zigomatik çıkıntısı arasında oküler oyuk bulunur. Bu oyuga göz yerleşmiştir. Kemik yapının üzeri fasya ve kas tabakası ile örtülüdür (Resim 2).



Resim 2: Sakrifiye denekte kafatasının yukarıdan, kas tabakası planından görünümü

3.2.1.2. Zigoma anatomisi

Yandan bakıldığında kafatası iskeletinde en çok göze çarpan yapı, zigomatik kemiktir. Bu kemik, kafatasının yandan en çıkıntılı bölümüdür (Resim 3). Yaklaşık 1 mm kalınlığında ve 2 cm uzunluğundadır, tübüler ve kavisli bir şekli mevcuttur. Önde maksiller kemiğin malar proçesi ile başlar ve arkaya doğru konveks şekilde uzanarak temporal kemiğin skuamöz bölümü ile birleşir. Ön birleşim yerinde bulunan oyukta lakrimal kemik ve kanalını barındırır. Arka birleşim yerinin arkasında ise akustik kanal ve posterior glenoid foramen bulunur. Skuamöz kemik ile sütür hattı oluşturan fibröz yapıda bir birleşim yeri mevcuttur (82).



D: Molar dişler; F: Frontal kemik; L: Lakrimal kemik ve kanal; M: Maksilla; N: Nazal kemik; O: Oksipital kemik; P: Parietal kemik; Pre: Premaksilla; S: Skuamöz kemik; Z: Zigoma; id: İnsisör dişler; ip: İnterparietal kemik; mp: Malar proçesi; tp: Timpanik bülla; 1: Eksternal akustik meatus; 2: Posterior glenoid foramen (transvers sinüsten internal maksiller vene dal verir); 3: Alışfenoid kanal (internal karotis girişi); 4: Foramen ovale; 5: Pterigoid proçesi; 6: Optik foramen (nervus optikus çıkımı); 7: Birbirine komşu iki açıklıktan arkadaki timpanik büllaya yakın olan petrotimpanik fissür (internal karotisin pterigopalatin dalı ve pterigoid ven pleksusu geçer), öndeki ise internal maksiller arterin geçtiği orta foramen laserumdur.

Resim 3: Sıçan kafatasının yandan görünümü

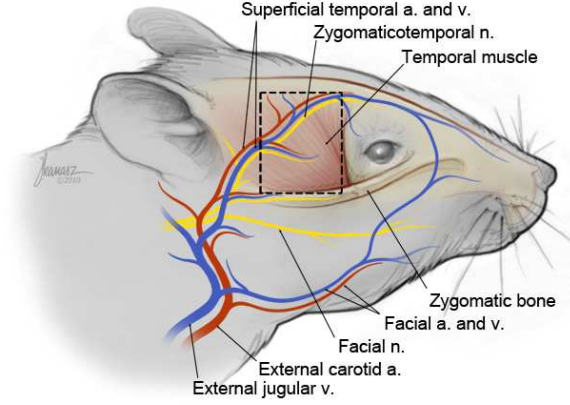
Zigomatik kemiğin etrafı fibröz doku, fasya ve kas tabakası ile sarılmıştır (Resim 4). Üstte temporal kas, içte masseter kasının derin bölümü ve dışında da masseter kasının yüzeyel bölümü yer alır. Kemiğin iç yüzeyinde bulunan oyuk içerisinde kaslarla aynı planda yer alan parotis, fasiyal sinir ve dalları, fasiyal arter ve ven bulunur. Zigomanın arka iç kısmında ise temporomandibuler eklem ve mandibulanın koronoid proçesi bulunmaktadır. Tüm bu yapılar yakın bir komşuluk içerisinde dirler (82).



Resim 4: Sakrifiye edilmiş sıçanda zigomanın yandan masseter ve temporal kas ayrıştırıldıktan sonraki görünümü

3.2.1.3. Süperfisiyal temporal fasya anatomisi

Süperfisiyal temporal fasya, arkada kulak önünden önde lakrimal kemik ve kanala, yukarıda ise göz ve frontal-parietal kemik hizasına kadar uzanan, yaklaşık 1 cm çaplı bir tabakadır. Bu tabaka oldukça ince, bükülgen ve vasküler ağdan zengindir. Hemen cilt altında kıl foliküllerinin altında yüzeyel planda yer alır. Fasya tabakasının altında ise temporal kas bulunur. Arteria karotis kommunis'in eksternal dalının uzantısı olan arteria temporalis süperfisiyalis tarafından beslenir. Venöz drenajı ise vena jugularis eksterna'ya dökülen vena temporalis süperfisiyalis tarafından sağlanır (Şekil 1) (82).

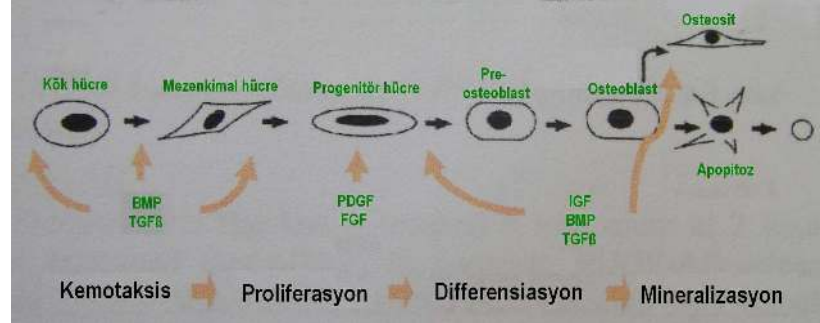


Şekil 1: Süperfisiyal temporal fasyanın anatomik olarak şematize edilmiş görünümü (çizgili alan)

3.2.2. KEMİK İYİLEŞMESİ

Organizmada herhangi bir nedenle hasar gören dokular belirli bir oranda kendilerini yenileyebilirler. Doku rejenerasyonu multipl sinyaller ile doku bileşenleri arasındaki kompleks etkileşimler sayesinde olmaktadır. Bu sinyallerin açığa çıkması belli bir düzen içerisinde gerçekleşir ve kayıp doku orijinal ya da orijinale yakın şekilde tamamlanmış olur (60). Kemik dokusu bu onarım işini en iyi yapan dokulardan biridir. Kemik iyileşme süreci; doku yanıtı, remodelling ve lamellar kemik yapısının oluşumu ile karakterizedir. Kemik dokuda herhangi bir nedenle ortaya çıkan defekt, başlangıç doku yanıtına neden olur ve diğer dokularda gerçekleştiği gibi, birtakım hücresel ve moleküler sinyallerin açığa çıkmasına neden olur. Bu sinyaller osteoindüktif (yeni kemik oluşumunu arttırıcı) özelliktedir. Bu aşamada çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri rol oynamaktadır. Sinyallerin oluşumu kemik defekti bölgesine osteojenik hücrelerin migrasyonuna neden olur ki, bu aşama kemik iyileşmesinin temel basamaklarından birini oluşturur (4,45,70). Normal kemik iyileşme sürecinde, mezenkimal kök hücreler osteoblast ve osteositlere farklılaşır (1,4,16,60). Bu dönüşüm, kemik iyileşmesinin sinyal oluşumu aşamasından sonraki en temel basamaktır (16). Osteoblastik progenitör hücreler, kemik stromal

fibroblastik sistemin bağ dokusu bileşenleri arasında yer alır ve kompleks bir mekanizmaya sahip kemik iyileşme sürecinin en kritik elemanları arasındadır (Şekil 2) (4).



Şekil 2: Kemik rejenerasyon süreci ve büyüme faktörlerinin etkisi

Başlangıçta defekt bölgesine inflamatuvar hücrelerin göçü oluşur, bu süreç 1-5. günler arasında gerçekleşir. Erken dönemde ortama gelen nötrofiller ve makrofajlar hasarlı dokuyu ortadan kaldırmaya çalışır. Bu dönemde defekt bölgesinde fibroblastların ve vaskülarizasyonun arttığı gözlenir. Bu bölge daha sonra fibröz bir yapı haline dönüşür. Bu yeni dokuya kemik kallusu denir. Bu arada kırık bölgesindeki periosteum ve endosteumun osteoblastları çoğalarak kırık bölgesine gelirler ve burada bir hücre tabakası oluştururlar. Onarım sırasında önce primer kemik dokusu gelişir. Bu doku henüz olgunlaşmamış kemik dokusudur. Daha sonra bu doku yavaş yavaş ortadan kalkar ve yerini sekonder, yani esas kemik dokuya bırakır. Böylece onarılmış kemik o bölgede tamamen normal şekline kavuşur ve fonksiyonlarını yerine getirir bir duruma gelir (16).

Kallus formasyonu, ekstrasellüler matriksin kalsifiye olmasıyla sağlanır (16). Kallus formasyonu başladıktan sonra, ortalama 10. günden sonra remodelling fazı başlar. Remodelling ve lamellar kemik yapısının matür hale gelmesi 6-9 aylık bir süreç gerektirir. Bu süre sonunda kemik defektinde normal trabeküler yapının oluştuğu gösterilmiştir (44). Bu sürede yeni oluşan kemik dokusunun osteokondüksiyonu (kemik dokusunda yer alan bileşenlerin etkileşimi) ve direnci artar.

Kemik yapımı ile rezorbsiyonu uyumlu bir denge halinde gerçekleşmektedir. Kemik dokusu yaşam boyu sürekli yeniden oluşum ve rezorbsiyon kapasitesine sahip kompleks aktif bir dokudur, dolayısıyla devamlı olarak yenilenmektedir. (79,83). Bu

yenilenme özellikle mekanik, kimyasal ve hormonal koşullarla yakından ilgilidir. Kondral ve intramembranöz olmak üzere 2 tür kemikleşme vardır. Bunlardan kondral kemikleşme kıkırdak dokusu, intramembranöz kemikleşme ise bağ dokusunun katılımıyla oluşmaktadır.

3.2.2.1. Kondral ossifikasyon

Bu tür kemikleşme hiyalin kıkırdak hücreleriyle oluşmaktadır. Bu nedenle intrakartilaginöz kemikleşme de denmektedir. Organizmanın uzun ve bazı kısa kemikleri bu şekilde gelişmektedir. Kondral kemikleşme perikondral ve enkondral olmak üzere 2 tiptir;

3.2.2.1.1. Perikondral ossifikasyon;

Kıkırdak yüzeyindeki mezenkim kaynaklı hücreler osteoblastlara dönüşerek bu bölgede birikirler ve osteosit haline dönüşürler. Bu olayı kalsifikasyon izler. Sonuçta diyafizin ortasında ve daha sonra da uçlara doğru gelişen bir perikondral kemik dokusu ortaya çıkar. Kemikleşme tamamlandıktan sonra perikondrium, periosteum adını alır. Bu kemik kompakt bir yapıdadır ve bu yolla kemiğin enine büyümesi sağlanır (16).

3.2.2.1.2. Enkondral ossifikasyon;

Bu tür kemikleşmede kıkırdak hücreleri önemli rol oynar. Özellikle uzun kemiklerin şekillenmesi bu yolla olur. Bu tür kemikleşme esas olarak kıkırdak hücrelerinin özellikle uzun kemiklerin diyafiz bölgesinde birtakım değişimleri şeklinde olmaktadır. Meydana gelecek ilk kemik önce diyafizi saran perikondriumda intramembranöz yolla olmakta ve periost şekillenmektedir. Diyafizdeki kemikleşme primer kemikleşmedir ve bölge tamamen kemikleşinceye kadar devam eder. Bunu epifiz bölgesindeki kemikleşme izler ve sekonder kemikleşme merkezi haline gelir.

3.2.2.2. İntramembranöz ossifikasyon

Kemiğin intramembranöz yolla oluşumu bağ dokusu tarafından gerçekleştirilir. Organizmada kafatasının frontal, parietal, temporal gibi kemikleri ve mandibula, bu tür kemikleşmeyle oluşmaktadır. Bu kemiklere membran kemikleri de denmektedir.

İntramembranöz kemik rejenerasyonu inflamasyon, onarım ve remodelling fazlarına ayrılır. İnflamasyon fazında öncelikle kapiller invazyon oluşur. Defekt alanına sitokin göçü ve makrofaj aktivasyonu gerçekleşir. Onarım fazında ise mezenkim hücreler damarlar etrafında toplanır ve çoğalır. Aradaki boşluklar ekstrasellüler matriks ve içindeki kollajen liflerce doldurulur. Mezenkim hücreleri osteoblastlara ve ardından da osteositlere farklılaşırlar. Osteositler kemik doku oluşumunu sürdürürler, ancak bu şekilde oluşan kemik spongiyöz (trabeküler) yapıdadır ve lamel içermez. Araya henüz kalsiyum bileşikler de çökmemiştir ve bu doku osteoid şekildedir. Remodelling fazında trabeküller büyür, çoğalır ve anastomozlaşarak spongiyöz kemik dokusu şekillenmiş olur. Bu tür kemikleşmede periosteum ve endosteum kemikleşmeye katılmayan bağ dokusu tarafından yapılmaktadır. Trabeküller arası boşluklardaki bağ dokusu da kemik iliğinin miyeloid veya hematopoietik dokusuna dönüşmektedir. Bu tür kemikleşmede osteoblastların osteositlere dönüşümü turn-over şeklinde bir devamlılık göstermektedir.

3.2.3. DENEYSEL KEMİK DEFEKTİ MODELLERİ

Sıçanlar segmental kemik rejenerasyonu çalışmalarında sık kullanılan deney hayvanlarıdır. Küçük hayvan modelleri doku mühendisliği ve kritik boyutlu kemik defekti çalışmalarında çok kullanışlı seçeneklerdir (84-86). Ancak deney hayvanlarında uygulanan kemik defekti modellerinde en büyük dezavantaj, fiksator yerleştirilen deneklerde gevşeme olması ve fiksatorlerin küçük deney hayvanlarına adaptasyonlarının zorluğudur.

3.2.3.1. Femur

Femur segmental kemik defekti modeli, deneysel çalışmalarda sık kullanılan bir modeldir. Özellikle distraksiyon osteogenez çalışmalarında oldukça kullanışlıdır. Osteoindüktif veya kondüktif materyallerin ya da farklı maddelerin salınım-perfüzyon tekniklerinin denenmesi planlandığında en uygun uzun kemik modelidir. Çalışmaya göre, oluşturulan kemik defekti alanına uygulanan implantasyondan sonraki değişik sürelerde, implantın yerleştirildiği femur bölgesinde kemik hacim ölçümleri, biyomekanik ölçümler, micro-CT (computerized tomography; bilgisayarlı tomografi) ve histolojik değerlendirmeler yapılabilir. Özellikle osteokondüktif ve osteoindüktif materyal çalışmaları için fonksiyonel/biyomekanik çalışmalara da izin verdiğinden dolayı sıklıkla

tercih edilmektedir. Mekanik stimölasyona imkan tanıyan bir model olduğu için fonksiyonel bazlı çalışmalarda özellikle kullanışlıdır.

3.2.3.2. Kalvaryum

Kalvaryal kemik defekti modeli, fasiyal bölge kemikleriyle embriyolojik açıdan benzeştiği için oldukça kullanışlıdır. Bu modeldeki kemik iyileşmesi intramembranöz tarzdadır (14). Kalvaryumda genelde 5 mm'lik kemik defekti kritik boyutlu kemik defekti (spontan iyileşmeme sınırı) modeli olarak kabul edilir (14,87,88). Ancak Plachokova ve ark'larının çalışmalarında 6.2 mm'lik kalvaryal defektin 2 hafta süre sonunda tamamen kapandığı belirtilmiştir (48). Bu modeldeki kritik boyutlu kemik defekti ile ilgili farklı bulgular elde edilmiştir. Önceki çalışmalar, kalvaryum kemik defektlerinde vaskülarizasyonun ve mekanik stimölasyonun yetersiz olduğunu göstermiştir. Biyomekanik testler için çok kullanışlı bir model değildir. Ancak dura ve skalp dokusunun kanlanmasının zengin oluşu, vaskülarizasyon yetersizliğinin olmadığını düşündürmektedir (14).

3.2.3.3. Radius

Bu model özellikle tavşan çalışmalarda tercih edilmektedir. Radiusta oluşturulan kemik defektinin her iki uçtan ulna kemiğine sabitlenip immobilizasyon sağlama imkanı bulunmaktadır. Oluşturulan defekt alanına her tür osteojenik ajanın yerleştirilmesi mümkündür. Bu model kullanılarak yapılan çalışmalarda kritik boyutlu defektin 15-20 mm civarında olduğu saptanmıştır. Sıçanlarda pek kullanışlı olmadığı için deneysel çalışmalardaki uygulama sıklığı azdır. Distraksiyon ya da mekanik/fonksiyonel testlerin uygulanabilme avantajları mevcuttur (89).

3.2.3.4. Zigoma

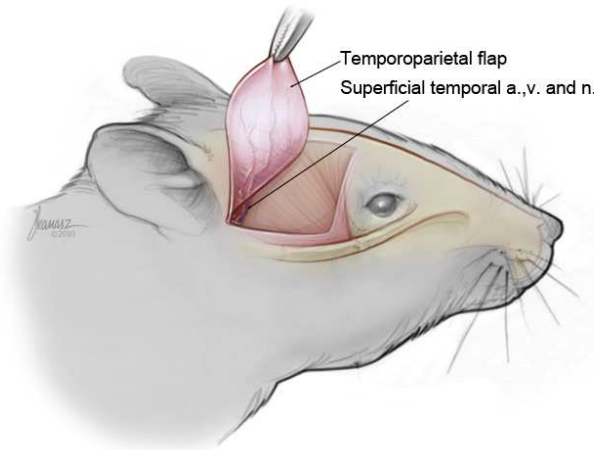
Zigoma kemik defekti modeli çok sık kullanılan bir model olmamakla birlikte; fasiyal bölge defektlerinin incelendiği çalışmalarda alternatif bir modeldir. Kim ve ark zigomatik kemik defektlerinde kritik boyutlu kemik defektini belirlemek amacıyla 3 ve 5 mm'lik defektler oluşturmuşlar ve kemik rejenerasyonunu karşılaştırmışlardır (13). Elde ettikleri bulgular, 3 mm'lik defektin rejenere olduğu ve 5 mm'lik defektin iyileşmeme

sınırı olduğu yönünde idi. Buna göre 5 mm'den büyük zigomatik kemik defektlerinin spontan iyileşmeyeceği yönünde bulgular elde etmişlerdir (13). Özçelik ve ark ise 3 mm'lik zigoma defektinde 10 hafta sonunda 0.42 mm'lik azalma saptamışlardır (90). Bu modelin avantajı, yüz kemikleriyle aynı rejenerasyon mekanizmasına sahip olması, farklı cerrahi seçenekleri ve alternatiflerine imkan tanınması ve immobilizasyon sıkıntısının olmamasıdır.

3.2.4. SÜPERFİSİYAL TEMPOROPARYETAL FASYA FLEBİ

Süperfisyal temporal fasya flebi, ince ve zengin bir damar ağına sahiptir. Bu nedenle en kullanışlı fasya flepleri arasında sayılmaktadır. Bu flep ilk defa Claude Dufourmental adlı araştırmacı tarafından 1958 yılında kulak rekonstrüksiyonunda kullanılmıştır. 1980 yılında ise Robert Smith tarafından alt ekstremité rekonstrüksiyonunda serbest doku aktarımı şeklinde kullanılmıştır. Bu flebin sıçandaki modeli ise ilk defa Ksenija Stefanoviç ve ark tarafından kullanılmıştır (91).

Süperfisyal temporal ven, süperfisyal temporal arterin eksternal ve süperior bölümünde yer alır. Damarlar sıçanın skalp dokusunun subkutanöz gevşek bağ dokusu tabakasında yer alır. Arter ve ven ortak bir perivasküler kılıf içerisinde seyrederek. Her iki damar fasyal dokuya girmeden birkaç milimetre önce gözle görülebilir (92). Flep pedikülünü oluşturan yüzeyel temporal arter ve ven, küçük çaplı ve ince duvarlı yapılardır. Flebin pedikül damarları iri hayvanlarda bile 0.3-0.4 mm çaplarındadır ve pedikül boyu kısadır (Şekil 3) (91).



a; arter, v; ven, n; sinir

Şekil 3: Süperfisyal temporal fasya flebinin şematik çizimi

3.2.5. FLEP MANİPÜLASYONU

Flep manipölasyonu aktarılabacak flebin, alıcı sahanın gereksinimlerine uygun olacak şekilde önceden hazırlanması amacıyla uygulanan girişimlerdir. Bu girişimler delay (geciktirme), ekspansiyon (genişletme), prefabrikasyon ve prelaminasyon uygulamalarını içerir (93).

3.2.5.1. Prefabrikasyon;

Flep prefabrikasyonu, flebin arter ve konkomitan venini ve çevre adventisyayı içerecek şekilde eleve edilmesiyle başlar. Bu flep fasyayı veya kas dokusunu bir miktar ihtiva edebilir. Flep transfer edilmeden önce matürasyonu beklenir. Matüre olduktan sonra lokal ya da serbest doku aktarımı şeklinde transfer edilir. Bu teknik özellikle ince fleplerin elde edilmesinde kullanılır (93).

3.2.5.2. Prelaminasyon;

Bu uygulama ilk defa Pribaz ve Fine tarafından tanımlanmıştır (94). Bu teknikte kompozit doku aktarımı gereken, ancak donör sahada istenen şekilde doku bulunmayan durumlarda gereken dokunun hazırlanması sözkonusudur. Bu prosedür iki aşamalıdır. İlk aşamada donör sahadan aktarılabacak dokuya kıkırdak, deri, mukoza grefti, doku ekspansiyonu gibi işlemler uygulanır. İkinci aşamada ise hazırlanan flep transfer edilir (93).

3.2.6. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği uygulamaları, sentetik içerikli materyallerin manipüle edilip, canlı organizmada kullanıldığında, yeni oluşan dokunun oluşum cevabına yakın cevap elde edilmesini sağlayan bileşimler üretilmesini sağlar (28). Doku mühendisliğinin temel kritik basamağı, ekstrasellüler matriks bileşenleri ile dokulardaki normal organize hücrelerin fonksiyonlarının arttırılmasıdır. Hasarlanmış doku sahasında büyüme faktörlerinin önemi ve rejenerasyonu başlatıp hızlandırıcı özellikleri bilinmektedir. Ekstrasellüler matriks büyüme ve morfogenezi modüle eder. Aynı zamanda birçok büyüme faktörünün

salınımının regülasyonunu sağlar. Biyoteknolojideki güncel gelişmeler, büyüme faktörlerinin açığa çıkarılması ile doku mühendisliği ve biyomateryaller üzerine ışık tutacak birçok katkı sağlamıştır.

Kemik rejenerasyonu alanındaki doku mühendisliği stratejileri 3 temel komponenti içerir. Bu komponentler osteojenik hücrelerin uygulanması, osteoindüktif faktörler ve yapı iskeleti (skafold) oluşturulması şeklinde sınıflandırılır (37). Doku mühendisliğinde skafold ve intralüminal bileşenler en kullanışlı preparasyon seçenekleri gibi durmaktadır (29,38). Doku mühendisliği uygulamaları ile skafold oluşturulup, çeşitli kombinasyonlarda kullanılması üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (71,72). Bu amaçla özellikle biyoeriyebilen ve biyouyumlu skafold materyalleri, osteokondüktif büyüme faktörleriyle kombine edilmekte ve yeni kemik oluşumu stimüle edilmektedir (30). Vacanti ve ark'ları skafold ve büyüme faktörlerini birlikte kombine kullanmış ve yeni doku morfogenezinin tatmin edici şekilde sağlandığını belirtmişlerdir (95). Yamada ve ark ise enjekte edilebilen skafoldlar üretilen doku mühendisliği kemik ürünü elde etmişler ve minimal invaziv şekilde defekt alanına uygulama imkanı sunmuşlardır (96). Bu araştırmacılar skafold içerisine BMSC ya da PRP yerleştirerek oldukça kullanışlı biyomateraller üretmişlerdir. Bu şekilde uygulanmaya başlayan yeni teknolojilerle enjekteabl doku mühendisliği bileşenlerinin sayısı artmaya başlamıştır (29,96,97).

Doku mühendisliğinin başarısının artmasını sağlayacak koşul, biyomateryallerin moleküler düzeydeki hücresel cevaba etkilerinin ve kemik iliği stromal hücrelerinin biyomateryallerle direkt temasının etkilerinin açığa kavuşmasıdır (72). Doku mühendisliği uygulamaları ile kemik rejenerasyonunun artırılmasına yönelik ilerlemeler kaydedilmekte ve bu konudaki çalışmalar güncelliğini korumaktadır. Çok sayıda biyomateryal seçeneğinin bulunmasına rağmen, tek bir ideal materyal bulunmamaktadır (15,33). Bu konuda halen ideal sonuçların yeterince alınamadığı bildirilmektedir.

3.2.7. SKAFOLDLAR

Skafoldlar, yapı iskeleti olarak oluşturulan üç boyutlu bileşenlerdir. Bu yapılar dokunun içeriği ve biçimine benzer bileşimlerden elde edilip doku iyileşmesini hızlandıran, doku mühendisliği uygulamaları ile üretilen yapılardır (22). Skafoldlar istenen şekil ve boyutta hazırlanma avantajına sahiptirler (4,98,99). Bununla birlikte biyouyumlu,

osteokondüktif, poröz yapıda, mekanik açıdan güçlü ve aynı zamanda bükülgen yapıya sahip olmalıdırlar (4). İdeal bir skafoldun kolay şekil verilebilir, kemik defektinin şeklini alabilen, büyüme ve matürasyonu hızlandıran, çevre dokuya karşı bariyer oluşturan özellikte olması gerekir (56,69).

Mezenkimal kök hücrelerin kemik rejenerasyonunda hücresel büyüme ve farklılaşmada optimal etki sağlaması için üç boyutlu skafoldlara ihtiyaç duyduğu bilinmektedir. Bu nedenle doku mühendisliği çalışmaları ile skafold oluşturulması ve hücrelerarası matriks etkileşiminin artırılması amaçlanmaktadır (56). Üç boyutlu skafoldlar osteoblastların fonksiyonlarının manipüle edilmesinde önemli bir rol oynarlar (4). Kemik iyileşmesini arttıracak en uygun skafoldun oluşturulması için ise kemik biyolojisi ve yapısal karakteristiklerinin iyi anlaşılması gerekmektedir (56). Kemik yapı elemanları hücresel elementleri içermez ve osteoindüktif değildirler, osteogenezise ihtiyaç duyarlar. Skafoldlar da benzer şekilde osteokondüktif bileşenlerdir (15).

Kemik iyileşmesinin normal seyrinde gerçekleşmesi için defekt alanına uzaysal düzlemde uygun bir ortam hazırlamak gerekir. Bu boşluğun vasküler ya da kemik iliği gibi osteojenik hücrelerle dolması en uygun seçenekler arasında sayılmaktadır. Kemik iliğinden direkt olarak alınan mezenkimal hücreler akışkan bir yapıya sahiptir ve defekt alanına bu şekilde uygulanması güçlük teşkil edebilir (57). Bu nedenle otojen kemik iliği grefti ile beraber osteokondüktif kemik yapı iskeleti ürünlerinin kullanımı denenmektedir (35,57). Skafoldlarla beraber progenitör hücrelerin beraber implante edildiği durumlarda, sadece skafold uygulamasına göre daha iyi bir kemik rejenerasyonu elde edildiği gözlenmiştir (69). Skafoldların farklı materyallerle kombinasyonu, bu konudaki deneysel çalışmalarda ele alınmaya devam etmektedir. Ancak, kemik rejenerasyonu amacıyla kullanılacak ideal skafold halen bulunamamıştır (28).

3.3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel çalışmaya başlanmadan önce Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığından yerel etik kurul onayı alındı (18 Haziran 2009 tarih ve 08-TF-03 sayılı). Denekler Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Selahattin Payzın Deneysel Araştırma Merkezinden (DÜSAM) elde edildi. Çalışmaya 165 adet erkek, 250-300 gr ağırlığında, 9 aylık, izogeneik (inbred) Sprague-Dawley albino sıçan dahil edildi. Dişi sıçanların hormonal değişikliklerinin kemik yoğunluğunu etkileme ihtimalini ve menapoz nedenli osteoporoz riskini ekarte etmek amacıyla çalışma erkek sıçanlar üzerinde planlandı. Sıçanlar standart toplu kafeslerde barındırıldı. Yemler standart pellet şeklinde verildi (TAVAS Inc, Adana, Türkiye) ve su ihtiyaçları standart yöntemlerle karşılandı. Oda ısısı yaklaşık 21 °C’de sabit tutuldu. Laboratuvar ışıklandırması 12 saat gündüz ve 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Odanın nem derecesi % 45 ±10 düzeyinde sabit değerde tutuldu. Tüm prosedürler tek cerrah tarafından uygulandı.

3.3.1. PİLOT ÇALIŞMA

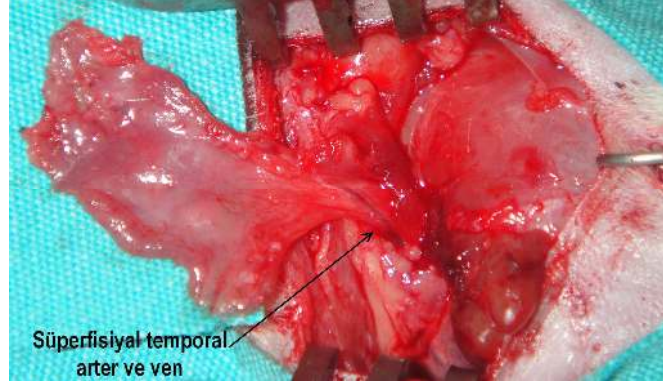
İlk aşamada süperfisiyal temporal fasya flebinin disseksiyonu ile vasküler yapısının yeterliliği ve anatomik özelliklerinin gözlenmesi amacıyla ön çalışma planlandı. Bu amaçla bir adet donör deney hayvanı cerrahi işlem için hazırlandı. Ketamin sodyum (Ketalar[®] flakon; Pfizer Ltd Şti, İstanbul, Türkiye) 90 mg/kg ve xylazine hidroklorid (Rompun[®] flakon, Bayer Inc, Almanya) 10 mg/kg karışımı intraperitoneal olarak uygulanıp genel anestezi sağlandı. Sıçanın kafa bölgesi traşlanıp % 10’luk povidon iyodin solüsyonu (Batticon[®], Adeka İlaç Ltd Şti, Samsun, Türkiye) ile dezenfekte edildi.

Planlanan deri insizyon alanı temporal ve preauriküler alanda deri kalemi ile işaretlendi. Bu çizim yaklaşık 1.5 cm uzunluğunda dikey ve “S” şekilli olarak planlandı (Resim 5).



Resim 5: Temporoparyetal fasya flebi kaldırılması amacıyla planlanan deri insizyonu

Göz arkasından başlayıp arkada lakrimal gland, aşağıda ise kulak altına kadar olan mesafede flep disseksiyonu planlandı. Loop kullanılarak 4x büyütme altında mikrocerrahi teknikler kullanılarak, temporal skalp alanında saç foliküllerinin hemen altına uzanacak şekilde, kıl foliküllerini görecektarzdakyüzeyel planda disseksiyon yapıldı. İnsizyona öncelikle frontal bölgeden başlandı. Yapılan insizyon daha sonra kulağın alt sınırından posterioruna doğru ilerletildi. Anterior ve posterior deri flepleri saç foliküllerinin arasından disseke edildi. Bundan sonra fasyanın üst, arka ve ön kenarları dikkatle kesildi. Ardından üst sınırdan temporal kas üzerindeki nispeten gevşek plana inildi. Disseksiyona, fasyanın kenarlarından devam edilerek alt yüzde bulunan damarlar gözlenene dek devam edildi. Planlanan tüm flep yüzeyi açılınca masseter arka kenarına doğru yüzeyel temporal arter ve ven tanınıp korundu. Pediküle, insizyonun posterior köşesinden ulaşıldı. Damarların çevresi ince duvarlı olduğu için oldukça titiz bir disseksiyon uygulandı. Disseksiyon sonunda yaklaşık olarak 1x1,5 cm'lik fasyal doku eleve edildi. Kanama odakları bipolar koterle koagüle edildi. Süperfisiyal temporal arter ve ven inferior ve posterior sahada aksiyel olarak izole edildi (91,100) (Resim 6).



Resim 6: Flebin pedikül üzerinde aksiyel olarak eleve edilmiş görünümü

Flebin pivot noktası değerlendirildiğinde rotasyona yeteri kadar izin verdiği ve zigomanın her noktasına ilerleyebildiği gözlemlendi (Resim 7).



Resim 7: Flebin zigoma kemiği üzerinde ilerletilmiş görünümü

Ardından flep pedikülü karotid artere kadar dissekte edildi ve pedikül karotid arterden bağlandıktan sonra serbest olarak anatomik yerinden ayrıldı ve 22 no'lu branül ile kanüle edildi. Daha sonra metilen mavisi ile pedikül boyandı ve flep içerisindeki damarlanma ve dalları net olarak izlendi (Resim 8).



Resim 8: Flep pedikülünün metilen mavisi ile boyanmış görünümü

Aynı cerrahi prosedür başka bir donör sıçana uygulandı ve süperfisiyal temporal fasya serbest flep şeklinde pedikülüyle beraber ayrıldı. Ardından 50 gr kurşun oksit, 5 gr jelatin, 100 cc % 0.9 serum fizyolojik karıştırılıp 70 °C'de 50 cc karışım hazırlandı ve enjektör içerisine alındı. Karotid arterdeki kanülden karışım verilerek damarlar boyandı. Daha sonra flep alınıp 4 °C'de 4 saat bekletildi ve ardından mikrovizyon C mamografi cihazı ile görüntü alındı (Resim 9).

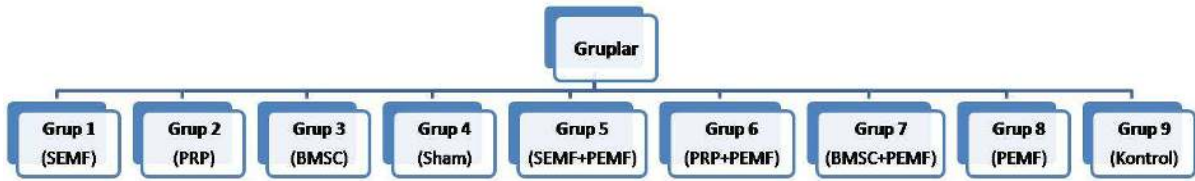


Resim 9: Flebin damar yapısının mikroanjiyografik görüntüsü

Makroskobik ve radyolojik olarak temporal fasya flebinin pedikülünün, flebin her bölgesini yeterli şekilde beslediği gözlemlendi. Bu sonucun elde edilmesinin ardından deney protokolü hazırlandı ve cerrahi planlama yapıldı.

3.3.2. DENEY GRUPLARI

Sıçanlar randomizasyon listesine göre (computer generated randomization list) seçilerek, her bir grup 15 sıçandan oluşacak şekilde 9 grup oluşturuldu. Tüm denekler kodlama sistemine göre işaretlenerek numaralandırıldı. Grup 1 sinüzoidal manyetik alan stimülasyonu (SEMF; sinüzoidal electromagnetic field) verilen grup, Grup 2 PRP verilen grup, Grup 3 BMSC verilen grup, Grup 4 sham grubu (sadece cerrahi işlem uygulanan grup), Grup 5 SEMF + PEMF verilen grup, Grup 6 PRP + PEMF verilen grup, Grup 7 BMSC + PEMF verilen grup, Grup 8 PEMF verilen grup, Grup 9 cerrahi ya da medikal hiçbir işlem yapılmadan referans kafes kontrol grubu şeklinde takip edilen ve biyokimyasal, radyolojik ölçümleri yapıp normal değerler elde edilen ve kayıt altına alınan grup şeklinde ayrıldı (Şekil 4).



Şekil 4: Deney gruplarının şematik görünümü

3.3.3. CERRAHİ YÖNTEM

Deney ve sham gruplarına Ketamin sodyum (Ketalar® flakon; Pfizer Ltd Şti, İstanbul, Türkiye) 90 mg/kg ve xylazine hidroklorid (Rompun® flakon, Bayer Inc, Almanya) 10 mg/kg karışımı intraperitoneal olarak uygulanıp genel anestezi sağlandı. Sıçanların kafa bölgesi traşlanıp % 10'luk povidon iyodin solüsyonu (Batticon®, Adeka İlaç Ltd Şti, Samsun, Türkiye) ile dezenfekte edildi. Operasyondan 1 saat önce sefazolin sodyum 0.25 gr/kg (Sefazol® flakon, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii, İstanbul, Türkiye) intramüsküler yolla uygulandı. Yine operasyondan 1 saat önce cerrahiye bağlı sıvı açığını yerine koymak amacıyla intraperitoneal 1.5 cc serum fizyolojik enjekte edildi.

3.3.3.1. Süperfisiyal temporal fasya flebinin kaldırılması

Öncelikle sıçan yüzüüstü pozisyonda deney masasına sabitlendi (Resim 10).



Resim 10: Deney hayvanına verilen ameliyat pozisyonunun görünümü

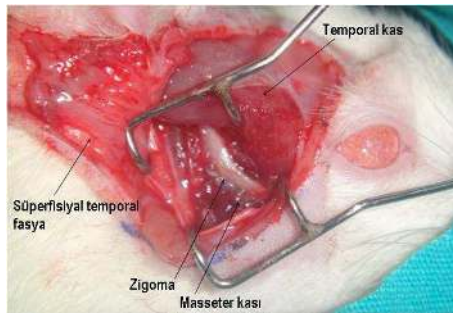
Daha sonra cerrahi saha yeşil örtü ile çevrelendi. Sıçanın sağ preauriküler bölgesine “S” insizyonu yapıldı. Pilot çalışmada uygulanan şekilde göz arkasından lakrimal gland ve kulak altına kadar olan mesafede deri fleplerinin disseksiyonu uygulandı. Anterior ve posterior deri flepleri saç foliküllerinin arasından eleve edildi. Disseksiyona, fasya flebinin kenarları insize edilerek devam edildi. Flep kenarları temporalis kasının üzerindeki gevşek bağ dokusundan ayrıştırıldı. Flebin pedikülüne doğru aynı plandan disseksiyona, alt yüzde bulunan damarlar gözlenene dek devam edildi. Kanama odakları bipolar koterle koagüle edildi. Disseksiyon sonunda yaklaşık olarak 1x1,5 cm’lik fasyal doku eleve edildi (Resim 11).



Resim 11: Süperfisiyal temporal fasyanın eleve edilmiş görünümü

3.3.3.2. Kemik defektinin oluşturulması

Süperfişiyal temporal fasya flebi eleve edildikten sonra ekartörle posteriora alındı ve açılan deri insizyonu, kemik sahasının yeterince manipüle edilebilmesi amacıyla posterior-inferiora doğru 0.5 cm genişletildi. Temporal ve masseter kasının fasyasının zigomatik kemik üzerine gelen kısmı yatay planda açıldı ve künt disseksiyonla kasların arasına girildi. Kasların aşağısında seyreden fasiyal sinir ve transvers fasiyal arter korunarak zigomatik kemiğin periostuna ulaşıldı. Daha sonra ekartör yerleştirilerek temporal ve masseter kası kenara alındı ve zigomanın periostu insize edildi (Resim 12).



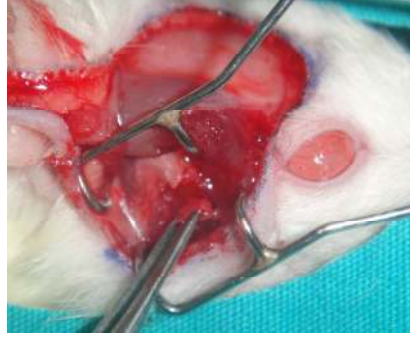
Resim 12: Temporal ve masseter kasları kenara alındıktan sonra zigomatik kemiğin açığa çıkarılması

Ardından periost elevatörü yardımıyla zigomanın periostu çepeçevre disseke edildi. Zigomanın posterior suture hattından itibaren 4 mm'lik mesafe işaretlendi (Resim 13).

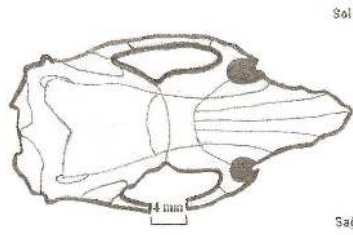


Resim 13: Zigomadan eksize edilmesi planlanan 4 mm'lik kemik segmentinin işaretlenmesi

Düz keskin makas yardımıyla işaretlenen kemik segmenti eksize edildi (Resim 14, Şekil 5).



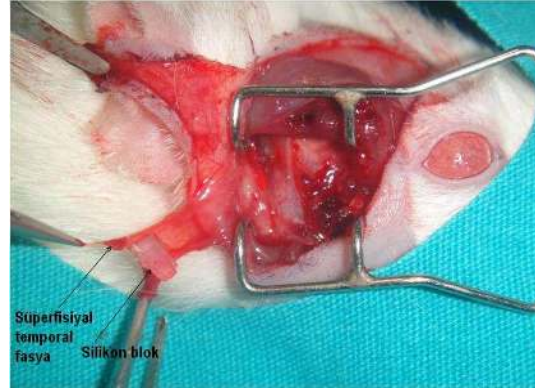
Resim 14: Zigomadan kemik segmentinin eksize edilmesi



Şekil 5: Süperior plandan sağ zigomada oluşturulan defektin şematik çizimi

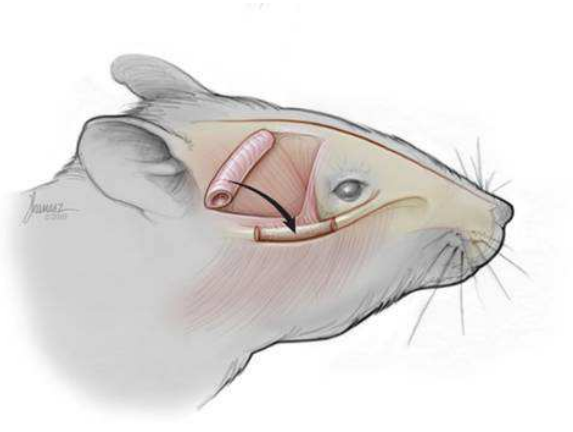
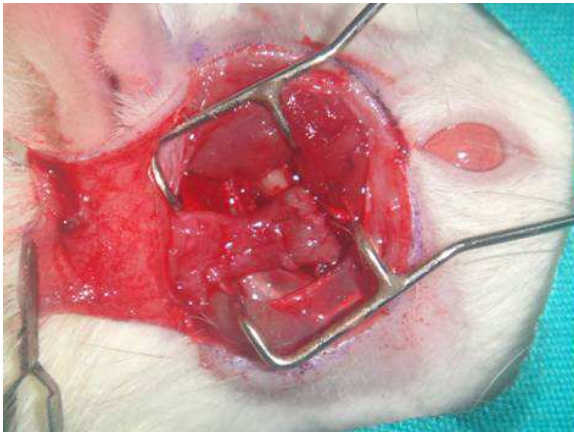
3.3.3.3. Non-union modelinin oluşturulması

Zigomada meydana getirilen kemik defektinde non-union modeli oluşturmak amacıyla 4 mm uzunluğunda ve 1 mm kalınlığında silikon blok hazırlandı. Silikon blok temporal fasyanın distal ucuna yerleştirilip temporal fasya silikonun etrafına tüp şeklinde sarıldı ve poliglekapron 25 (Monocryl®, Ethicon®, Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) 7/0 dikiş ile kenarlarından kendi dokusuna sütüre edildi. Bu şekilde fasya prelamine edilmiş oldu (Resim 15).



Resim 15: Temporal fasya içerisine silikon blok yerleştirilmesi

Daha sonra oluşturulan prelamine fasyanın silikon blok içeren tüp şeklindeki kısmı kemik defektine yerleştirildi. Fasya, kemik defekti etrafına poliglekapron 25 (Monocryl[®], Ethicon[®], Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) 7/0 dikiş ile sütüre edildi (Resim 16).



Resim 16: Prelamine fasya ve silikon bloğun kemik defekti içerisine yerleştirilmiş görünümü

Ardından açılan masseter ve temporal kas fasyası poliglekapron 25 (Monocryl[®], Ethicon[®], Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) 7/0 dikiş ile, cilt insizyonu ise 4/0 ipek (Silk, Doğsan Ltd şti, Trabzon, Türkiye) dikiş ile primer sütüre edilerek kapatıldı (Resim 17).



Resim 17: İnsizyonların kapatılmasından sonraki erken postoperatif görünüm

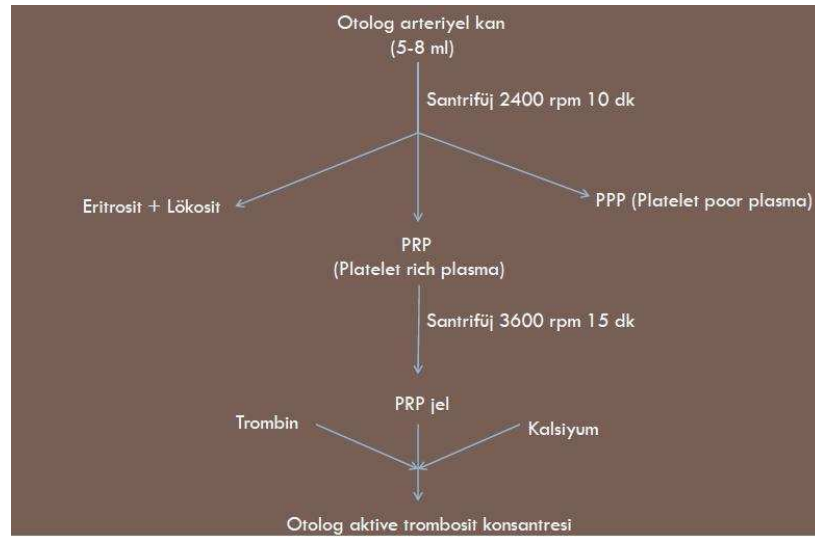
Cerrahi sonunda intraperitoneal salin solüsyonu (10 ml/kg/cerrahi süre-saat) enjekte edildi. Ardından intramüsküler yolla metamizol sodyum (Novalgin® 1 gr/2 ml ampül, Sanofi-Aventis Ltd Şti, İstanbul, Türkiye) 0.25 ml uygulanarak analjezi sağlandı. Anesteziden çıkma süresince saf oksijen solutuldu. Sıçanlar yumuşak plastik kafeslere alındı ve 24 saat boyunca tekli olarak barındırıldı. Sıçanlar günlük olarak su ve yem alımı, inflamatuvar reaksiyon, enfeksiyon ve hareket kabiliyetleri açısından monitörize edildi ve komplikasyon oluşumu ile anormal hareket açısından gözlemlendi. Analjezik dozu operasyon sonrası 12, 24 ve 48. saatlerde tekrarlandı. Cerrahi sonrası 1. günde intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu tekrarlandı. Antibiyotik profilaksisine postoperatif 3. güne kadar devam edildi.

İlk operasyondan 1 ay süre sonra ikinci seans cerrahi planlandı. İkinci seansta, oluşturulan kemik defektinin içerisine yerleştirilmiş olan silikon bloğun çıkarılıp, ardından intralüminal bileşenlerin (PRP ve BMSC) yerleştirilmesi planlandı.

3.3.3.4. Trombositten zengin plazma preparasyonu

Yüksek doz intraperitoneal pentobarbital 1 gr flakon (Pentothal Sodium®, Abbott İlaç Sanayii, İstanbul, Türkiye) uygulanarak kurban edilen donör izogeneik inbred sıçanlardan intrakardiyak yolla 5-8 ml kan alındı. 25 °C'lik oda ısısında alınan kan örneği 1.26 ml % 10 sodyum sitrat antikoagülanı içeren Eppendorf tüpüne alındı. Ardından 2400 rpm hızında 10 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün üst kısımda trombositten fakir plazma (PPP; platelet poor plasma), ortada gri renkli PRP tabakası ve en alt kısımda da eritrosit ve lökosit süpernatantı ayrıştırıldı. PPP kısmı pipet yardımıyla ayrıldı ve

ardından PRP kısmı aspire edilip tekrar 15 dk 3600 rpm’de santrifüj edildi. Bu uygulama ile trombositlerin çökmesi sağlandı. Sonuçta yaklaşık 0.8-1.2 ml PRP elde edilmiş oldu. Elde edilen PRP cerrahi uygulama öncesinde 0.25 cc % 10 kalsiyum klorid solüsyonu ve 0.125 cc 300 IU domuz trombin solüsyonu (Fibriquick® Thrombin, BioMerieux Inc, Durham, NC, USA) ile karıştırıldı ve PRP’nin aktive olması sağlandı (35). Preparasyon sonrasında elde edilen süpernatanttan 0.3 cc örnek alınarak trombosit düzeyi ölçüldü (Şekil 6).



Şekil 6: PRP elde edilmesinde uygulanan aşamaların şematik çizimi

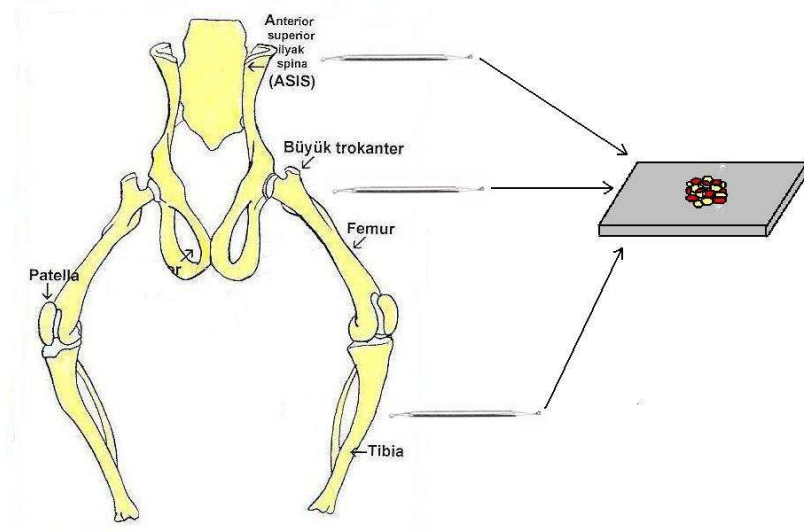
3.3.3.5. Kemik iliği stromal hücre (BMSC) preparasyonu

Yüksek doz intraperitoneal pentobarbital 1 gr flakon (Pentothal Sodium®, Abbott İlaç Sanayii, İstanbul, Türkiye) uygulanarak kurban edilecek donör izogeneik inbred sıçanların kalça ve bacakları traşlandı. Sıçanlar supin pozisyonda sabitlendi. Kemik iliği Ueno ve ark'larının 2008 yılında tariflediği şekilde; tibia, femur ve iliak krestten, dental küret yardımıyla aspire edilerek elde edilmek üzere cerrahi işlem planlandı (101). Bu amaçla tibia, femur ve pelvis sahasına medial vertikal insizyonla ulaşıldı. İnsizyon patellanın 1 cm medialinden yapıldı. Kuadriseps tendonu ve patellar ligament retrakte edildi. Femurun distal kondili ve tibianın proksimali ortaya kondu. İliak krest benzer şekilde yumuşak dokulardan ayrıştırıldı ve ortaya kondu. Her üç kemik tamamen çıkarılarak aspirasyona hazır hale getirildi (Resim 18).



Resim 18: Kemik iliği aspiratı alınacak kemiklerin işlem öncesi görünüşleri

Kemiklerin medüllası ve diafizlerine minidrill ile küçük delikler açıldı. Kemiklerin medüllası ve diafizinden aspirasyon ile yaklaşık 1.5 cc kemik iliği alındı. Alınan kemik iliği hücreleri 20 dk süreyle 1500 rpm hızında santrifüj edildi ve yaklaşık 1 cc'lık solid kısmı alınarak implantasyona hazır hale getirildi (Şekil 7).

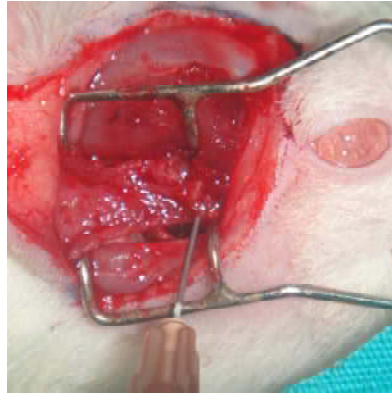


Şekil 7: Kemik iliği elde edilmesinde uygulanan prosedürlerin şematik çizimi

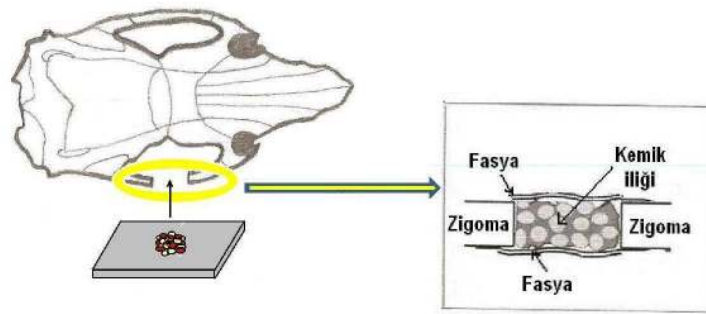
3.3.3.6. İntralüminal bileşenlerin yerleştirilmesi

Denekler Ketamin sodyum (Ketalar[®] flakon; Pfizer Ltd Şti, İstanbul, Türkiye) 90 mg/kg ve xylazine hidroklorid (Rompun[®] flakon, Bayer Inc, Almanya) 10 mg/kg karışımı

ile intraperitoneal olarak anestetize edildi. Sağ zigomatik alandaki eski insizyon sahasından girilerek temporal fasya ve zigomatik kemik defektine ulaşıldı. Anterior ve posterior fasya-kemik periostu birleşim yerinden yapılan 1 mm'lik mini insizyonla silikon blok çıkarıldı. Kemik defekt uçları temizlendi. Ardından insülin enjektörü yardımıyla fasya ve kemik sınırından her gruba, planlanan osteojenik ajan (PRP, kemik iliği aspiratı) enjekte edildi (Resim 19, Şekil 8). Açılan fasya insizyonları siyanoakrilat (İndermil®, Henkel Corporations, Canada, USA) ile kapatıldı. Cilt insizyonu ise 4/0 ipek sütür (Silk, Doğsan Ltd Şti, Trabzon, Türkiye) ile primer kapatıldı.



Resim 19: Kemik defektine PRP enjeksiyonunun uygulanışı



Şekil 8: Kemik defektine BMSC uygulanmasının şematik çizimi

Sıçanlara cerrahi sonrasında sefazolin sodyum 0.25 gr/kg (Sefazol® flakon, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii, İstanbul, Türkiye) intramüsküler yolla uygulandı. Ardından intramüsküler yolla metamizol sodyum (Novalgin® 1 gr/2 ml ampül, Sanofi-Aventis Ltd Şti, İstanbul, Türkiye) 0.25 ml uygulanarak analjezi sağlandı. Cerrahi işlem sonunda

cerrahi sahaya diğ er sıçanlar tarafından zarar verilmemesi amacıyla sıçanlar 24 saat izole edildi.

3.3.4. MANYETİK ALAN UYGULAMASI

Günlük olarak kontrol edilen sıçanlar, cerrahi sonrası 7. güne kadar yara iyileşme süreci için takip edildi. 7. günden itibaren 1 ay süreyle manyetik alan uygulaması planlandı.

Pleksiglas yapıda Faraday kafesi (130x65x80 cm) içerisine manyetik alan düzeneği yerleştirilmesi planlandı. Bu düzenek 2 adet 70 cm çaplı Helmholtz bobinini içerecek şekilde hazırlandı. Bobinler vertikal tarzda yerleştirildi. İki bobin arası mesafe 47 cm olarak ayarlandı ve yerleştirildi (Resim 20).



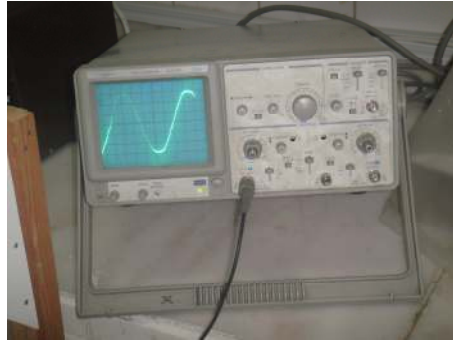
Resim 20: Faraday kafesinin görünümü

Güç kaynağı bu gereçler arasına bağlanıp alternatif akım geçmesi sağlandı. Manyetik alan 125 döngülü 1.5 mm'lik çapta bakır tellerle oluşturuldu. Tellerden oldukça düşük frekanslı (ELFMF; Extremely Low Frequency Magnetic Fields), 40 A 1.5 mT 50 Hz manyetik alan ge i i sağlandı. Manyetik alanın yoğunluğu pleksiglas ve metakrilat kafesin (43x42x15 cm) 15 farklı noktasından    l erek 1.5 mT olduğu g  zlendi (Resim 21).



Resim 21: Kafes içerisindeki manyetik alan yoğunluğunun ölçülmesi

Ölçüm Bell 7030 Gauss/Teslametre ile yapıldı (F.W. Bell, Orlando, FL) (Resim 22). Kafes içerisinde homojen bir akımın sağlandığı gözlemlendi.



Resim 22: Manyetik alan ölçümünün yapıldığı teslametrenin görünümü

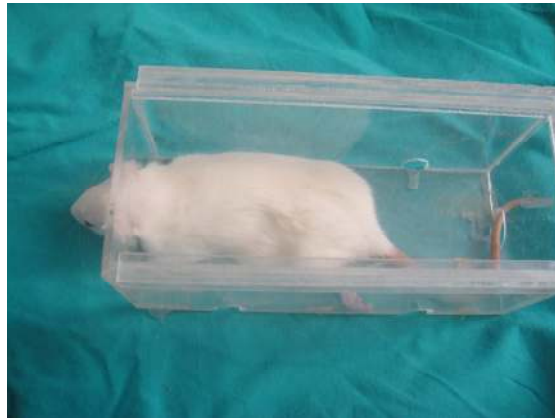
Pulslu manyetik alan elde etmek amacıyla güç kaynağının aralıklı akım sağlayan türü kullanılırken, sinüzoidal manyetik alan uygulaması için ise güç kaynağı değiştirilip sinüzoidal akım sağlayan güç kaynağı düzeneğe takıldı. Puls süresi her iki grupta 25 μ s olacak şekilde ayarlandı. Stimülasyon hergün 8 saat uygulandı. Sıçanların kafeslerin içerisinde rahatça hareket edebilmeleri ve böylece manyetik alanın her sıçana homojen bir şekilde dağılması sağlandı (Resim 23).



Resim 23: Faraday kafesi içerisinde yerleştirilen sıçanların görünümü

3.3.5. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRMELER

Tüm gruplara operasyon öncesi ve sonrasındaki 1. gün, 3. ve 6. ayda kemik yoğunluğunu incelemek amacıyla DXA (Dual Energy X-Ray Absorptiometry, Hologic® Discovery QDR 4500 A, S/N 81053) planlandı. Her çekim öncesinde deneklere ketamin sodyum (Ketalar® flakon; Pfizer Ltd Şti, İstanbul, Türkiye) 90 mg/kg ve xylazine hidroklorid (Rompun® flakon, Bayer Inc, Almanya) 10 mg/kg karışımı intraperitoneal olarak uygulanıp genel anestezi sağlandı. Ardından sıçanlar fiberglas kutulara yerleştirildi (Resim 24).

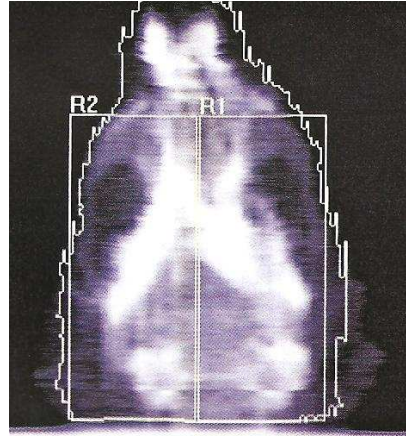


Resim 24: Çekim öncesi fiberglas kutuya yerleştirilen sıçanın görünümü
Görüntülemeler postero-anterior planda alındı (Resim 25).



Resim 25: DXA cihazının çekim sırasındaki görünümü

Çekimler küçük hayvan modunda ve aynı personel tarafından gerçekleştirildi. Cihazın kalibrasyonu düzenli aralıklarla yapıldı. Kemik defekti alanı kantitatif olarak kemik mineral yoğunluğu (BMD; bone mineral density) ölçülerek değerlendirildi. Ölçüm sonucu elde edilen görüntüde kemik defekti alanı R1 (Region-1; Bölge-1) olarak isimlendirildi ve aynı boyuttaki alan karşı taraf zigoma üzerinde işaretlendi (R-2; Region-2, Bölge-2) (Resim 26).



Resim 26: DXA işlemi sonucunda elde edilen kemik yoğunluk ölçümlerinin görünümü

R1 ve R2 alanlarının kemik mineral ölçüm sonuçları kayıt altına alındı (Resim 27).

DXA Results Summary:

Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ²)
GLOBAL	61.47	10.38	0.169
R1	2.74	0.92	0.335
R2	2.84	0.98	0.345
Net	5.47	1.85	0.339

Region	Fat (g)	Lean+BMC (g)	Total Mass (g)	% Fat
GLOBAL	142.5	224.8	367.3	38.8
R1	1.9	6.8	8.7	22.2
R2	2.4	6.8	9.2	25.8
Net	4.2	13.3	17.6	24.0

RBAR101

Resim 27: Kemik mineral ölçümlerinin R1 ve R2 şeklinde kayıt altına alınması

3.3.6. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Operasyon sonrası 5. günde sıçanlar tekli gruplar halinde 24 saat süreyle metabolik kafeslerde bekletilip idrar örneği alındı (Resim 28).



Resim 28: İdrar örneği elde etmek amacıyla kullanılan metabolik kafesin görünümü

Her sıçandan yaklaşık 5-10 cc idrar örneği elde edildi ve idrarda hidroksiprolin düzeyi ölçümü amacıyla numuneler laboratuvara gönderildi. Hidroksiprolin ölçümünde

manuel olarak J. F. Woessner'in modifiye ettiği hidroksiprolin tayin yöntemi kullanıldı (102). Bu yönteme göre önce çözeltiler hazırlandı.

- a- Hidroksiprolin standartı: 25 mg vakumda kurutulmuş L-hidroksiprolin, 250 ml 0.001 N hidroklorik asitte (HCL) çözüldü.
- b- Tampon: 5 gr sitrik asit monohidrat, 12 ml buzlu asetik asit, 120 gr sodyum asetat ve 34 gr sodyum hidroksit 1 lt distile suda çözüldü. Bu çözeltinin pH'sının 6 civarında olduğu gözlemlendi. Buzdolabında toluen altında saklandı.
- c- Kloramin T (sodyum p-toluen sülfon kloramid): 1.41 gr kloramin T 20 ml suda çözüldü. 30 ml metil sellosolve ve 50 ml tampon ilave edildi. Erlen tüpünde saklandı.
- d- Perklorik asit (3.15 m): % 70'lik perklorik asit 27 ml'de seyreltildi, 100 ml'ye tamamlandı.
- e- P-dimetil amino benzaldehit (% 20): 20 gr p-dimetil amino benzaldehit 100 ml metilsellosolve içerisinde çözüldü. 60 °C su banyosunda yarım saat bekletildi. Su banyosundan sonra ise oda sıcaklığında bekletildi.

Ardından örneklerin hazırlanması aşamasına geçildi. Bu aşamada; dokudan alınan bir örnek 6N HCL ile 3 saat 130 °C'de hidroliz edildi. Bu süre sonunda Erlen tüpünün kapağı açıldı ve soğutuldu. 1-2 damla % 0.02'lik metil kırmızısı indikatörü ilave edildi. Bu arada çözeltinin rengi yeşilden sarıya döndü.

Örnekler hazırlandıktan sonra tüplere kondu. Her tüpe 1 ml kloramin T çözeltisi ilave edildi. İyiçe karıştırıldıktan sonra 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu sürenin sonunda her tüpe 1 ml perklorik asit ilave edildi. 5 dk bekletildi. Tekrar her tüpe 1 ml p-dimetil amino benzaldehit çözeltisi ilave edildi. İyiçe karıştırıldıktan sonra 60 °C'lik su banyosuna yerleştirildi. 20 dk sonra çıkarıldı. 5 dk soğumaya bırakıldı ve 557 nm'de distile suya karşı absorbanans değeri okundu. Bu değeri standart eğriden değerlendirilerek miktarları bulundu.

Operasyon sonrası 10. günde sıçanların kuyruk veninden yaklaşık 0.5 cc kan alındı ve ALP (alkalen fosfataz) düzeyi çalışıldı.

Operasyon sonrası 12. haftada ise yine aynı şekilde kuyruk veninden 0.5 cc kan alınarak iyon selektif elektrot yöntemiyle kantitatif kan osteokalsin düzeyleri çalışıldı. Elde edilen veriler kayıt altına alındı.

Sakrifikasyon sonunda alınan kemik doku örneğinden süpernatant elde edildi ve J. F. Woessner'in tariflediği hidroksiprolin ölçüm metoduna göre dokuda hidroksiprolin düzeyi çalışıldı (102). Buna göre; kollajen doku örneğinden elde edilen hidroksiprolinin

pH:6-7’de, kloramin T, HClO₄, p-dimetil amino benzaldehit ile oluşturduğu rengin şiddeti, 557 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart eğriye göre değerlendirilip dokudaki hidroksiprolin miktarı hesaplandı.

3.3.7. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRMELER

Sıçanlar operasyon sonrası 6. ayda yüksek doz intraperitoneal pentobarbital 1 gr flakon (Pentothal Sodium[®], Abbott İlaç Sanayii, İstanbul, Türkiye) uygulanarak sakrifiye edildi. Cerrahi saha derisi disseke edildi ve cerrahi defekt sahası çevre yumuşak doku ve zigomatik defekt alanının her iki tarafını kapsayacak şekilde en-blok olarak alındı. Alınan örnekler % 10 tamponlu formalin solüsyonu içerisinde patoloji laboratuvarına gönderildi. Örnekler, denek numaralarını ve spesimenlerin ait olduğu grupları bilmeyen tek patolojist tarafından değerlendirildi.

Alınan örnekler % 10 nötral tamponlu formalin içerisinde oda ısısında 48 saat bekletilip fikse edildi. Ardından % 4’lük etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) solüsyonunda 3 gün bekletilerek dekalsifiye edildi. Daha sonra parafin bloklar hazırlanarak 3-4 µm’lik doku örnekleri elde edildi. Dokular hematoksilin&eozi ve Masson’s trichrome boyası ile boyandı. Örnekler ışık mikroskobunda değerlendirmeye alındı. Mikroskopik olarak osteoid madde oluşumu ve osteoblast aktivasyonu araştırıldı. Değerlendirmede bir mikroskop görüş alanına giren sahadaki trabeküler kemik oranı ve dansite karşılaştırıldı. Kemik matriksindeki kollajen fibriller, osteositler, küçük kan damarları, osteoklast benzeri hücreler ve inflamasyon incelendi. Fibröz doku tabakası değerlendirildi. Trikrom boyama ile neovaskülarizasyon ve kan damarlarının oranı değerlendirildi. İncelemede (-), (+), (++) ve (+++) olarak semikantitatif değerlendirme yapıldı. Kemik defekt alanındaki köprüleşme oranı değerlendirildi. Skorelama yapılarak 0-4 arasında derecelendirme yapıldı. % 0= defekt boş, 1=defektin % 0-25’i dolu, 2= defektin % 25-50’si kapanmış, 3= defektin % 50-75’i kapanmış, 4= defektin % 75-100’ü dolmuş şeklinde sınıflandırıldı.

3.3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Donör sıçanlardan elde edilen trombosit düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. İdrar hidroksiprolin, ALP, osteokalsin, doku hidroksiprolin ve DXA analizi değişkenlerinin ortalama değerleri hesaplanarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA; Analyze /compare Means / One way anova) testi ile analiz edildi. ANOVA testine göre önemli derecede farklılık saptanan değişkenlerde farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni testi kullanıldı. Bonferroni testi idrar hidroksiprolin, ALP, osteokalsin ve doku hidroksiprolin değerleri için ayrı ayrı yapıldı. Her değişken için ikişerli grup ortalama farklılıkları, ortalama farklılığın standart hata değerleri ve önemlilik düzeyleri (p değeri) belirlendi. Veri analizleri SPSS (Statistical Package for the Social Science) 15.0 programı kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ değerler anlamlı kabul edildi.

3.4. BULGULAR

Takip döneminde sadece 1 sıçanda cerrahi sonrasında yara yeri enfeksiyonu gelişti, antibiyotik tedavisine 1 hafta devam edildi ve inflamasyon bulguları geriledi. Diğer tüm sıçanlar normal ve problemsiz şekilde iyileşti.

Araştırmacılar bulguları yorumlarken deney gruplarını bilmeksizin çift-kör olarak değerlendirdi.

PRP hazırlandıktan sonra alınan örneklerden elde edilen trombosit düzeyleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Donör sıçanlardan elde edilen PRP’deki trombosit değerleri (K/ μ L)

Gruplar	Denek no														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Grup 2 (PRP)	781	751	828	733	722	756	803	708	740	786	767	748	775	703	817
Grup 6 (PRP+PEMF)	778	828	766	768	701	809	744	721	816	786	694	761	750	802	746

Elde edilen trombosit düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri $762,9 \pm 38,31$ olarak bulundu.

Alınan idrar örneklerinde saptanan hidroksiprolin düzeyleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Gruplarda yer alan sıçanların idrar hidroksiprolin (μ g/ml) sonuçları

Denek no	Gruplar								
	Grup 1 (SEMF)	Grup 2 (PRP)	Grup 3 (BMSC)	Grup 4 (Sham)	Grup 5 (SEMF+PEMF)	Grup 6 (PRP+PEMF)	Grup 7 (BMSC+PEMF)	Grup 8 (PEMF)	Grup 9 (Kontrol)
1	4.3	3.5	4.7	2.8	3.0	8.2	6.6	5.3	4.3
2	3.9	7.2	4.9	3.0	5.0	6.9	6.8	7.2	2.9
3	4.1	7.5	6.9	3.4	6.9	6.8	6.9	7.2	5.7
4	3.7	7.5	5.0	3.7	6.7	7.2	7.1	7.0	2.4
5	5.7	7.5	6.8	4.0	7.2	6.7	5.7	7.2	2.4
6	4.1	7.5	5.0	3.7	7.5	6.3	7.2	7.2	2.6
7	4.3	7.7	5.3	3.7	7.5	6.8	7.5	7.8	3.0
8	6.3	2.3	5.4	4.1	7.6	6.8	7.3	4.5	3.0
9	4.3	4.0	4.1	3.8	7.8	6.9	6.8	6.9	3.4
10	6.0	3.0	2.9	4.1	7.8	6.9	6.9	6.7	2.7
11	4.6	5.7	5.1	3.6	6.7	6.4	6.8	6.7	3.2
12	4.7	5.8	5.0	3.5	6.8	6.9	6.7	6.6	3.1
13	4.4	5.6	5.3	3.7	6.6	6.8	6.9	6.8	3.4
14	4.5	5.7	4.9	3.4	6.5	7.0	6.8	6.9	3.1
15	4.6	5.6	5.4	3.6	6.9	6.9	6.7	6.5	3.5

Kan ALP ölçümleri sonucunda elde edilen değerler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Deneklerin ALP aktivitelerinin (U/L) sonuçları (N: 40-150)

Denek no	Gruplar								
	Grup 1 (SEMF)	Grup 2 (PRP)	Grup 3 (BMSCc)	Grup 4 (Sham)	Grup 5 (SEMF+PEMF)	Grup 6 (PRP+PEMF)	Grup 7 (BMSC+PEMF)	Grup 8 (PEMF)	Grup 9 (Kontrol)
1	87	154	145	108	154	208	194	137	116
2	89	146	135	124	137	296	168	145	148
3	132	136	162	116	151	296	178	146	139
4	110	138	156	98	142	208	197	151	133
5	116	176	142	127	146	288	169	136	132
6	117	165	137	87	157	288	157	156	120
7	53	126	140	87	135	219	188	148	150
8	137	169	141	93	140	243	154	150	68
9	117	153	138	84	156	217	197	139	132
10	145	147	152	129	138	267	151	143	133
11	112	139	147	143	144	284	196	152	135
12	135	140	150	115	139	203	197	158	135
13	114	187	145	97	142	224	178	155	113
14	130	137	138	75	151	217	169	159	140
15	104	138	139	58	150	276	176	146	103

Sıçanlardan alınan kandan elde edilen osteokalsin değerleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4: Deneklere uygulanan osteokalsin ölçümlerinin (ng/ml) sonuçları (N: 3.1-13.7)

Denek no	Gruplar								
	Grup 1 (SEMF)	Grup 2 (PRP)	Grup 3 (BMSC)	Grup 4 (Sham)	Grup 5 (SEMF+PEMF)	Grup 6 (PRP+PEMF)	Grup 7 (BMSC+PEMF)	Grup 8 (PEMF)	Grup 9 (Kontrol)
1	4.0	7.4	4.5	3.5	6.5	16.4	15.2	7.8	3.1
2	6.5	5.1	7.0	5.8	6.2	19.0	12.1	5.7	4.5
3	5.9	6.5	4.9	5.3	8.7	17.3	13.0	6.4	5.5
4	6.3	7.2	6.5	4.7	7.9	18.8	15.1	6.5	4.2
5	4.8	5.3	7.0	3.9	8.5	16.4	14.4	5.9	3.7
6	5.6	6.4	6.8	4.9	6.5	15.9	12.4	7.9	3.9
7	5.8	7.2	5.6	5.2	6.9	14.8	13.6	7.4	4.2
8	6.4	5.9	5.9	4.7	7.4	18.9	15.8	6.8	5.0
9	6.1	6.7	4.8	3.6	7.2	17.8	12.7	8.0	5.3
10	5.9	6.3	5.1	3.8	8.6	17.3	13.6	5.7	4.5
11	5.6	6.9	5.7	4.1	8.2	15.6	15.4	6.0	3.9
12	4.8	7.4	6.5	5.0	7.8	14.8	14.0	6.7	3.4
13	6.3	7.0	6.7	5.7	8.9	14.4	13.8	7.5	4.6
14	6.1	5.9	4.8	4.4	6.4	14.1	13.2	7.8	4.1
15	5.8	6.2	6.9	4.2	7.1	16.3	16.0	6.9	5.2

Alınan doku örneklerinden elde edilen hidroksiprolin düzeyleri Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5: Deneklerden elde edilen doku hidroksiprolin (mg/gr yaş doku) sonuçları

Denek no	Gruplar								
	Grup 1 (SEMF)	Grup 2 (PRP)	Grup 3 (BMSC)	Grup 4 (Sham)	Grup 5 (SEMF+PEMF)	Grup 6 (PRP+PEMF)	Grup 7 (BMSC+PEMF)	Grup 8 (PEMF)	Grup 9 (Kontrol)
1	19.5	38.5	30.4	16.4	18.6	43.5	47.1	20.0	16.7
2	12.9	17.9	21.8	14.4	50.7	49.4	23.9	13.4	12.9
3	35.9	26.4	27.4	33.0	22.1	61.7	15.3	17.0	28.8
4	31.2	26.4	25.9	25.5	20.0	75.5	43.5	41.7	20.0
5	10.0	11.9	24.7	14.6	27.8	57.5	27.9	33.6	13.7
6	10.3	24.2	29.6	20.7	26.9	54.8	31.5	25.1	13.0
7	13.4	23.1	20.0	19.8	28.3	59.4	30.7	24.8	14.5
8	32.6	25.5	13.7	21.5	25.7	52.3	32.1	26.4	13.5
9	13.2	20.1	14.1	20.7	30.1	58.6	29.9	28.6	11.4
10	34.3	28.3	16.9	20.9	27.5	57.4	33.6	22.4	34.3
11	21.3	24.1	22.4	18.4	24.6	59.2	31.6	25.6	17.8
12	19.2	24.4	21.6	22.7	27.1	53.2	35.1	20.1	16.9
13	23.1	23.9	23.2	20.5	24.8	56.7	29.4	30.0	18.4
14	20.1	22.1	22.5	19.9	29.8	57.1	31.6	26.3	17.1
15	22.0	25.0	22.1	21.6	27.7	56.9	30.9	25.8	16.9

İdrar hidroksiprolin, ALP, doku hidroksiprolin ve osteokalsin değişkenlerinin gruplararası karşılaştırma sonuçları Tablo 6’da sunulmuştur.

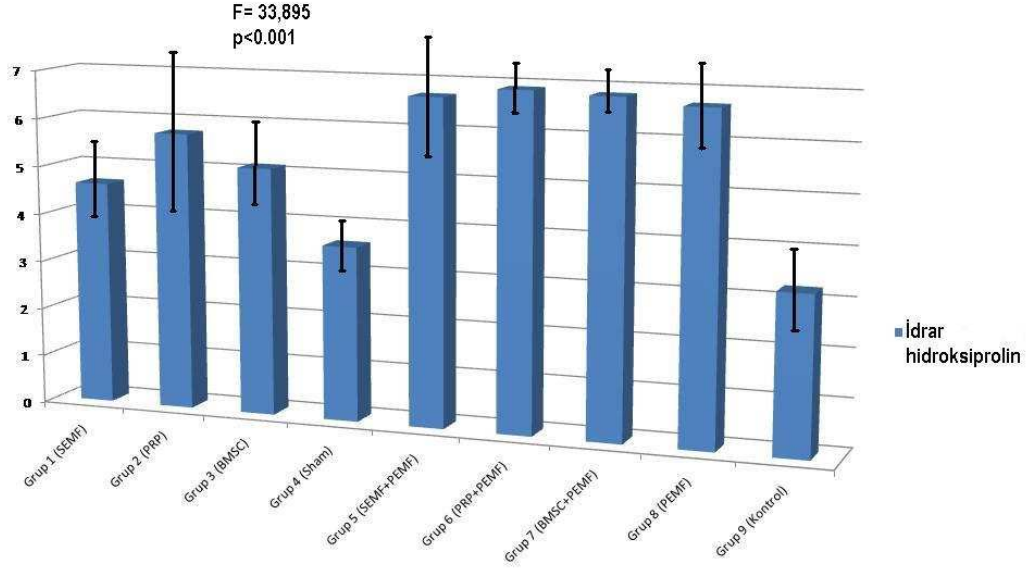
Tablo 6: İdrar hidroksiprolin, ALP, doku hidroksiprolin ve osteokalsin değişkenlerinin gruplararası karşılaştırma sonuçları

Parametreler	Gruplar									F	p
	Grup 1 (SEMF)	Grup 2 (PRP)	Grup 3 (BMSC)	Grup 4 (Sham)	Grup 5 (SEMF+PEMF)	Grup 6 (PRP+PEMF)	Grup 7 (BMSC+PEMF)	Grup 8 (PEMF)	Grup 9 (Kontrol)		
	$\bar{x} \pm SD$										
İdrar hidroksiprolin	4,63±0,76	5,74±1,80	5,11±0,94	3,60±0,36	6,70±1,23	6,90±0,42	6,84±0,40	6,70±0,81	3,24±0,83	33,895	<0.001
ALP	113,20±23,18	150,07±17,17	144,47±7,70	102,73±23,10	145,47±7,23	248,93±36,66	177,93±16,42	148,07±7,32	126,47±20,61	69,473	<0.001
Osteokalsin	5,73±0,69	6,49±0,72	5,91±0,91	4,59±0,73	7,52±0,92	16,52±1,63	14,02±1,25	6,87±0,82	4,34±0,70	287,340	<0.001
Doku hidroksiprolin	21,26±8,73	24,12±5,64	22,42±4,93	20,70±4,48	27,44±7,24	56,88±6,86	31,60±7,30	25,38±6,80	17,72±6,18	47,684	<0.001

F: ANOVA test değeri

ANOVA testi sonuçlarına göre; grupların ortalama değerlerinin karşılaştırılması sonucunda, her dört parametre açısından gruplar arasında önemli derecede farklılık saptandı ($p<0.001$) (Grafik 1, 2, 3, 4).

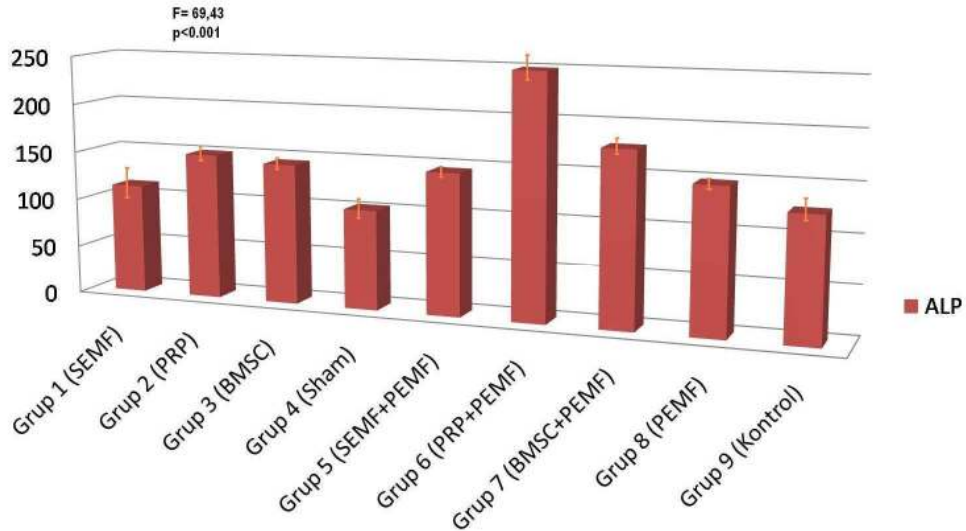
Grafik 1: İdrar hidroksiprolin değişkenlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları



F : ANOVA test değeri

İdrar hidroksiprolin ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçlarına göre; gruplar arasında önemli derecede farklılık saptandı ($p<0.001$).

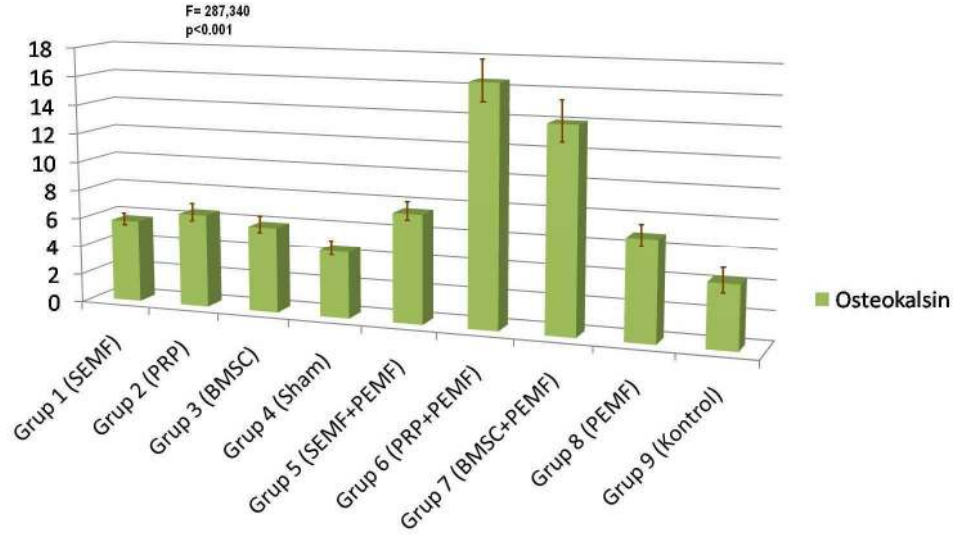
Grafik 2: ALP ortalama değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları



F: ANOVA test değeri

ALP ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçlarına göre; gruplar arasında önemli derecede farklılık saptandı ($p<0.001$).

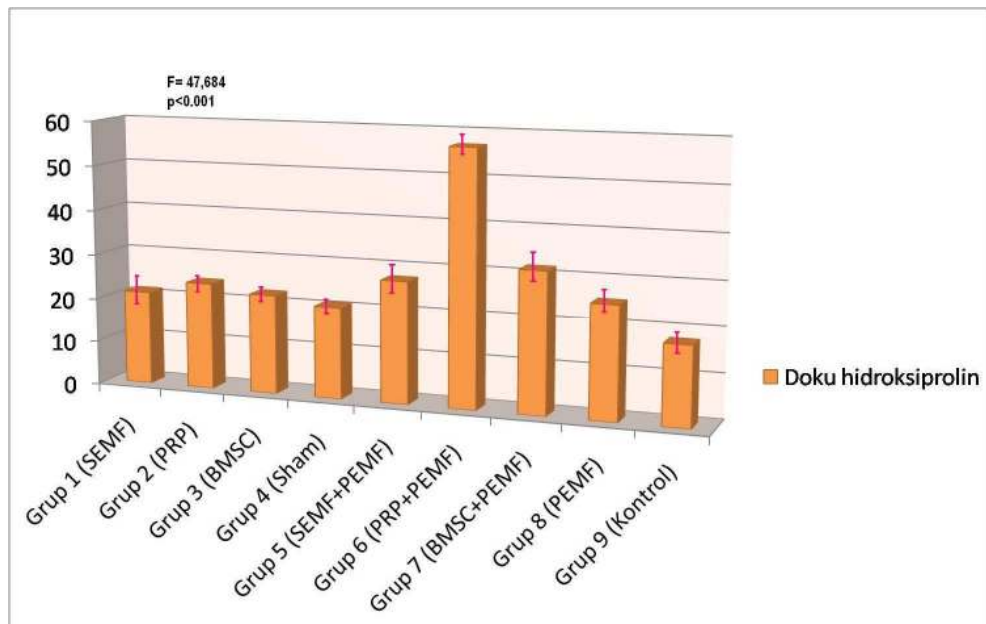
Grafik 3: Osteokalsin ortalama değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları



F: ANOVA test değeri

Osteokalsin ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçlarına göre; gruplar arasında önemli derecede farklılık saptandı ($p<0.001$).

Grafik 4: Doku hidroksiprolin ortalama değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları



F: ANOVA test değeri

Doku hidroksiprolin ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçlarına göre; gruplar arasında önemli derecede farklılık saptandı ($p<0.001$).

ANOVA testine göre önemli derecede farklılık saptanan değişkenlerde farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak amacıyla uygulanan çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni testine göre; idrar örneklerinden elde edilen hidroksiprolin değerlerinin grup ortalamalarının sonuçları Tablo 7’de sunulmuştur.

Tablo 7: İdrar örneklerinden elde edilen hidroksiprolin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçları

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama fark $\pm$ Standart hata</i>	<i>p</i>
<i>Grup 1- Grup 2</i>	1,10 $\pm$ 0,34	=0,064
<i>Grup 1- Grup 3</i>	0,48 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 1- Grup 4</i>	1,02 $\pm$ 0,34	=0,131
<i>Grup 1- Grup 5</i>	2,06 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 1- Grup 6</i>	2,26 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 1- Grup 7</i>	2,21 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 1- Grup 8</i>	2,06 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 1- Grup 9</i>	1,38 $\pm$ 0,34	=0,004
<i>Grup 2- Grup 3</i>	0,62 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 2- Grup 4</i>	2,13 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 2- Grup 5</i>	0,96 $\pm$ 0,34	=0,232
<i>Grup 2- Grup 6</i>	1,16 $\pm$ 0,34	=0,039
<i>Grup 2- Grup 7</i>	1,10 $\pm$ 0,34	=0,064
<i>Grup 2- Grup 8</i>	0,96 $\pm$ 0,34	=0,232
<i>Grup 2- Grup 9</i>	2,49 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 3- Grup 4</i>	1,50 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 3- Grup 5</i>	1,58 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 3- Grup 6</i>	1,78 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 3- Grup 7</i>	1,73 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 3- Grup 8</i>	1,58 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 3- Grup 9</i>	1,86 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 4- Grup 5</i>	3,09 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 4- Grup 6</i>	3,29 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 4- Grup 7</i>	3,24 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 4- Grup 8</i>	3,09 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 4- Grup 9</i>	0,36 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 5- Grup 6</i>	0,20 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 5- Grup 7</i>	0,14 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 5- Grup 8</i>	0,00 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 5- Grup 9</i>	3,45 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 6- Grup 7</i>	0,05 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 6- Grup 8</i>	0,20 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 6- Grup 9</i>	3,65 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 7- Grup 8</i>	0,14 $\pm$ 0,34	=1,000
<i>Grup 7- Grup 9</i>	3,60 $\pm$ 0,34	<0,001
<i>Grup 8- Grup 9</i>	3,45 $\pm$ 0,34	<0,001

İdrar örneklerinden elde edilen hidroksiprolin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçlarına göre; Grup 1 ile 5, 1 ile 6, 1 ile 7, 1 ile 8, 1 ile 9, 2 ile 4, 2 ile 9, 3 ile 4, 3 ile 5, 3 ile 6, 3 ile 7, 3 ile 8, 3 ile 9, 4 ile 5, 4 ile 6, 4 ile 7, 4 ile 8, 5 ile 9, 6 ile 9, 7 ile 9 ve 8 ile 9 arasında anlamlı derecede fark saptandı. Anlamlılık düzeyinin en fazla olduğu gruplar değerlendirildiğinde; ortalama ve standart sapma değerlerine göre Grup 6'dan (PRP+PEMF) elde edilen değerlerin ilk sırada ($\bar{x} \pm SD$; 6,90 $\pm$ 0,42) ve Grup 7'den (BMSC+PEMF) elde edilen değerlerin de ikinci sırada yer aldığı ($\bar{x} \pm SD$; 6,84 $\pm$ 0,40) saptandı.

Deneklerden alınan kan örneğinden elde edilen ALP değerleri Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 8: ALP değerlerinin ikişerli grup ortalamalarının Bonferroni testi ile karşılaştırma sonuçları

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama fark $\pm$ Standart hata</i>	<i>p</i>
<i>Grup 1- Grup 2</i>	36,86 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 1- Grup 3</i>	31,26 $\pm$ 7,28	<0,01
<i>Grup 1- Grup 4</i>	10,46 $\pm$ 7,28	=1,000
<i>Grup 1- Grup 5</i>	32,26 $\pm$ 7,28	<0,01
<i>Grup 1- Grup 6</i>	135,73 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 1- Grup 7</i>	64,73 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 1- Grup 8</i>	34,86 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 1- Grup 9</i>	13,26 $\pm$ 7,28	=1,000
<i>Grup 2- Grup 3</i>	5,60 $\pm$ 7,28	=1,000
<i>Grup 2- Grup 4</i>	47,33 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 2- Grup 5</i>	4,60 $\pm$ 7,28	=1,000
<i>Grup 2- Grup 6</i>	98,86 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 2- Grup 7</i>	27,86 $\pm$ 7,28	<0,007
<i>Grup 2- Grup 8</i>	2,00 $\pm$ 7,28	=1,000
<i>Grup 2- Grup 9</i>	23,60 $\pm$ 7,28	=0,055
<i>Grup 3- Grup 4</i>	41,73 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 3- Grup 5</i>	1,00 $\pm$ 7,28	=1,000
<i>Grup 3- Grup 6</i>	104,46 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 3- Grup 7</i>	33,46 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 3- Grup 8</i>	3,60 $\pm$ 7,28	=1,000
<i>Grup 3- Grup 9</i>	18,00 $\pm$ 7,28	=0,535
<i>Grup 4- Grup 5</i>	42,73 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 4- Grup 6</i>	146,20 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 4- Grup 7</i>	75,20 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 4- Grup 8</i>	45,33 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 4- Grup 9</i>	23,73 $\pm$ 7,28	=0,052
<i>Grup 5- Grup 6</i>	103,46 $\pm$ 7,28	<0,01
<i>Grup 5- Grup 7</i>	32,46 $\pm$ 7,28	<0,01
<i>Grup 5- Grup 8</i>	2,60 $\pm$ 7,28	=1,000
<i>Grup 5- Grup 9</i>	19,00 $\pm$ 7,28	=0,368
<i>Grup 6- Grup 7</i>	71,00 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 6- Grup 8</i>	100,86 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 6- Grup 9</i>	122,46 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 7- Grup 8</i>	29,86 $\pm$ 7,28	=0,003
<i>Grup 7- Grup 9</i>	51,46 $\pm$ 7,28	<0,001
<i>Grup 8- Grup 9</i>	21,60 $\pm$ 7,28	=0,131

Deneklerden alınan kan örneklerinden elde edilen ALP değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçlarına göre; Grup 1 ile 2, 1 ile 3, 1 ile 5, 1 ile 6, 1 ile 7, 1 ile 8, 2 ile 4, 2 ile 6, 3 ile 4, 3 ile 6, 3 ile 7, 4 ile 5, 4 ile 6, 4 ile 7, 4 ile 8, 5 ile 6, 5 ile 7, 6 ile 7, 6 ile 8, 6 ile 9, 7 ile 8 ve 7 ile 9 arasında anlamlı derecede fark saptandı. Anlamlılık düzeyinin en fazla olduğu gruplar değerlendirildiğinde; ortalama ve standart sapma değerlerine göre Grup 6'dan (PRP+PEMF) elde edilen değerlerin ilk sırada ($\bar{x} \pm SD$; $248 \pm 36,66$) yer aldığı saptandı.

Deneklerden alınan kan örneğinden elde edilen osteokalsin değerleri Tablo 9'da sunulmuştur.

Tablo 9: Osteokalsin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçları

<i>Gruplar</i>	<i>Ortalama fark $\pm$ Standart hata</i>	<i>p</i>
<i>Grup 1- Grup 2</i>	0,76 $\pm$ 0,35	=1,000
<i>Grup 1- Grup 3</i>	0,18 $\pm$ 0,35	=1,000
<i>Grup 1- Grup 4</i>	1,14 $\pm$ 0,35	=0,066
<i>Grup 1- Grup 5</i>	1,79 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 1- Grup 6</i>	10,79 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 1- Grup 7</i>	8,29 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 1- Grup 8</i>	1,14 $\pm$ 0,35	=0,066
<i>Grup 1- Grup 9</i>	1,38 $\pm$ 0,35	=0,006
<i>Grup 2- Grup 3</i>	0,58 $\pm$ 0,35	=1,000
<i>Grup 2- Grup 4</i>	1,90 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 2- Grup 5</i>	1,02 $\pm$ 0,35	=0,174
<i>Grup 2- Grup 6</i>	10,02 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 2- Grup 7</i>	7,52 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 2- Grup 8</i>	0,37 $\pm$ 0,35	=1,000
<i>Grup 2- Grup 9</i>	2,15 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 3- Grup 4</i>	1,32 $\pm$ 0,35	=0,011
<i>Grup 3- Grup 5</i>	1,60 $\pm$ 0,35	<0,01
<i>Grup 3- Grup 6</i>	10,60 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 3- Grup 7</i>	8,10 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 3- Grup 8</i>	0,95 $\pm$ 0,35	=0,314
<i>Grup 3- Grup 9</i>	1,57 $\pm$ 0,35	<0,01
<i>Grup 4- Grup 5</i>	2,93 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 4- Grup 6</i>	11,93 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 4- Grup 7</i>	9,43 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 4- Grup 8</i>	2,28 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 4- Grup 9</i>	0,24 $\pm$ 0,35	=1,000
<i>Grup 5- Grup 6</i>	9,00 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 5- Grup 7</i>	6,50 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 5- Grup 8</i>	0,65 $\pm$ 0,35	=1,000
<i>Grup 5- Grup 9</i>	3,18 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 6- Grup 7</i>	2,50 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 6- Grup 8</i>	9,65 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 6- Grup 9</i>	12,18 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 7- Grup 8</i>	7,15 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 7- Grup 9</i>	9,68 $\pm$ 0,35	<0,001
<i>Grup 8- Grup 9</i>	2,52 $\pm$ 0,35	<0,001

Deneklerden alınan kan örneklerinden elde edilen osteokalsin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçlarına göre; Grup 1 ile 5, 1 ile 6, 1 ile 7, 1 ile 9, 2 ile 4, 2 ile 6, 2 ile 7, 2 ile 9, 3 ile 4, 3 ile 5, 3 ile 7, 3 ile 9, 4 ile 5, 4 ile 6, 4 ile 7, 4 ile 8, 5 ile 6, 5 ile 7, 5 ile 9, 6 ile 7, 6 ile 8, 6 ile 9, 7 ile 8, 7 ile 9 ve 8 ile 9 arasında anlamlı derecede fark saptandı. Anlamlılık düzeyinin en fazla olduğu gruplar değerlendirildiğinde; ortalama ve standart sapma değerlerine göre Grup 6'dan (PRP+PEMF) elde edilen değerlerin ilk sırada ($\bar{x} \pm SD$; 16,52±1,63) ve ikinci sırada da Grup 7'den (BMSC+PEMF) elde edilen değerlerin ($\bar{x} \pm SD$; 14,02±1,25) yer aldığı saptandı.

Doku örneklerinden elde edilen hidroksiprolin değerleri Tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10: Dokudan elde edilen hidroksiprolin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçları

Gruplar	Ortalama fark $\pm$ Standart hata	p
Grup 1- Grup 2	2,85±2,40	=1,000
Grup 1- Grup 3	1,15±2,40	=1,000
Grup 1- Grup 4	0,56±2,40	=1,000
Grup 1- Grup 5	6,18±2,40	=0,407
Grup 1- Grup 6	35,61±2,40	<0,001
Grup 1- Grup 7	10,34±2,40	<0,01
Grup 1- Grup 8	4,12±2,40	=1,000
Grup 1- Grup 9	3,54±2,40	=1,000
Grup 2- Grup 3	1,70±2,40	=1,000
Grup 2- Grup 4	3,41±2,40	=1,000
Grup 2- Grup 5	3,32±2,40	=1,000
Grup 2- Grup 6	32,76±2,40	<0,001
Grup 2- Grup 7	7,48±2,40	=0,082
Grup 2- Grup 8	1,26±2,40	=1,000
Grup 2- Grup 9	6,39±2,40	=0,318
Grup 3- Grup 4	1,71±2,40	=1,000
Grup 3- Grup 5	5,02±2,40	=1,000
Grup 3- Grup 6	34,46±2,40	<0,001
Grup 3- Grup 7	9,18±2,40	=0,007
Grup 3- Grup 8	2,96±2,40	=1,000
Grup 3- Grup 9	4,69±2,40	=1,000
Grup 4- Grup 5	6,74±2,40	=0,211
Grup 4- Grup 6	36,17±2,40	<0,001
Grup 4- Grup 7	10,90±2,40	<0,001
Grup 4- Grup 8	4,68±2,40	=1,000
Grup 4- Grup 9	2,98±2,40	=1,000
Grup 5- Grup 6	29,43±2,40	<0,001
Grup 5- Grup 7	4,16±2,40	=1,000
Grup 5- Grup 8	2,06±2,40	=1,000
Grup 5- Grup 9	9,72±2,40	=0,003
Grup 6- Grup 7	25,27±2,40	<0,001
Grup 6- Grup 8	31,49±2,40	<0,001
Grup 6- Grup 9	39,15±2,40	<0,001
Grup 7- Grup 8	6,22±2,40	=0,389
Grup 7- Grup 9	13,88±2,40	<0,001
Grup 8- Grup 9	7,66±2,40	=0,065

Doku örneklerinden elde edilen hidroksiprolin değerlerinin grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçlarına göre; Grup 1 ile 6, 1 ile 7, 2 ile 6, 3 ile 6, 3 ile 7, 4 ile 6, 4 ile 7, 5 ile 6, 5 ile 9, 6 ile 7, 6 ile 8, 6 ile 9 ve 7 ile 9 arasında anlamlı derecede fark saptandı. Anlamlılık düzeyinin en fazla olduğu gruplar değerlendirildiğinde; ortalama ve standart sapma değerlerine göre Grup 6'dan (PRP+PEMF) elde edilen değerlerin ilk sırada ($\bar{x} \pm SD$; 56,88±6,86) yer aldığı saptandı.

Histopatolojik incelemede elde edilen bulgular, Tablo 11'de sıralanmıştır.

Tablo 11: Deneklerden alınan örneklerin histopatolojik incelemesinde değerlendirilen parametrelerin gözlenme oranları

Gruplar	Parametreler			
	İnflamasyon	Kan damarı	Kollajen fibril	Osteosit
Grup 1 (SEMF)				
1	-	+	+	+
2	-	+	-	+
3	-	-	+	-
4	-	+	+	+
5	-	-	-	-
6	-	+	-	+
7	-	-	+	-
8	+	-	-	-
9	-	+	-	+
10	-	-	-	-
11	-	+	-	-
12	-	-	-	-
13	+	-	-	-
14	-	+	+	-
15	-	-	+	+
Grup 2 (PRP)				
1	-	-	+	-
2	-	+	-	-
3	-	-	-	+
4	-	+	+	+
5	+	-	-	+
6	-	-	+	+
7	-	+	-	-
8	-	+	-	-
9	+	-	+	-
10	-	+	+	+

<i>11</i>	-	-	-	-
<i>12</i>	-	+	-	+
<i>13</i>	-	-	+	-
<i>14</i>	-	+	-	-
<i>15</i>	+	-	+	+
Grup 3 (BMSC)				
<i>1</i>	+	+	-	+
<i>2</i>	-	-	+	+
<i>3</i>	+	-	+	-
<i>4</i>	+	+	-	-
<i>5</i>	-	-	-	-
<i>6</i>	-	-	-	+
<i>7</i>	-	+	+	-
<i>8</i>	-	+	+	+
<i>9</i>	-	-	-	-
<i>10</i>	-	-	-	+
<i>11</i>	-	+	+	-
<i>12</i>	-	-	+	+
<i>13</i>	-	+	-	-
<i>14</i>	-	+	-	+
<i>15</i>	-	-	+	-
Grup 4 (Sham)				
<i>1</i>	-	+	-	+
<i>2</i>	-	-	+	+
<i>3</i>	-	+	-	-
<i>4</i>	-	+	-	-
<i>5</i>	-	-	-	-
<i>6</i>	+	-	+	-
<i>7</i>	-	-	-	-
<i>8</i>	-	-	-	-
<i>9</i>	-	-	-	-
<i>10</i>	-	+	-	+
<i>11</i>	-	-	+	-
<i>12</i>	-	-	-	-
<i>13</i>	-	+	-	-
<i>14</i>	-	-	+	+
<i>15</i>	+	-	-	-
Grup 5 (SEMF+PEMF)				
<i>1</i>	+	+	+	-
<i>2</i>	+	+	+	+
<i>3</i>	-	+	-	-
<i>4</i>	-	-	+	+
<i>5</i>	-	-	+	-
<i>6</i>	-	+	+	+
<i>7</i>	-	+	+	+

8	-	+	-	+
9	-	-	+	+
10	-	+	+	+
11	-	+	+	+
12	+	+	+	-
13	-	+	+	+
14	-	+	-	-
15	-	-	+	+
Grup 6 (PRP+PEMF)				
1	+	+	+	++
2	-	++	++	+
3	-	++	+	+
4	+	+	++	++
5	-	+	+	++
6	-	++	+	+
7	-	+++	++	+
8	-	++	+++	++
9	-	+	+	++
10	-	++	++	++
11	-	++	++	++
12	++	++	++	++
13	-	++	++	+
14	-	++	+	++
15	+	+	++	++
Grup 7 (BMSC+PEMF)				
1	-	+	++	+
2	-	+	+	+
3	+	++	++	++
4	-	++	+	+
5	++	+	+	+
6	-	+	++	++
7	+	++	+	+
8	-	++	+	+
9	-	+	++	++
10	-	+	+	+
11	-	+	++	+
12	-	++	++	+
13	-	+	+	++
14	+	+	+	+
15	-	++	+	+
Grup 8 (PEMF)				
1	+	-	-	+
2	-	-	+	+
3	-	+	-	-
4	-	-	-	-

5	-	-	+	-
6	-	+	+	+
7	+	+	+	+
8	-	+	+	+
9	-	-	+	+
10	-	+	-	-
11	-	+	+	+
12	+	+	+	+
13	-	+	-	-
14	-	-	+	+
15	-	-	-	-
Grup 9 (Kontrol)				
1	-	-	++	+++
2	-	+	++	+++
3	-	-	++	+++
4	-	-	+++	+++
5	-	-	++	+++
6	-	+	++	+++
7	-	+	++	+++
8	-	-	+++	+++
9	-	-	++	+++
10	-	+	++	+++
11	-	-	++	++
12	-	+	+++	+++
13	-	-	++	+++
14	-	+	++	++
15	-	-	++	+++

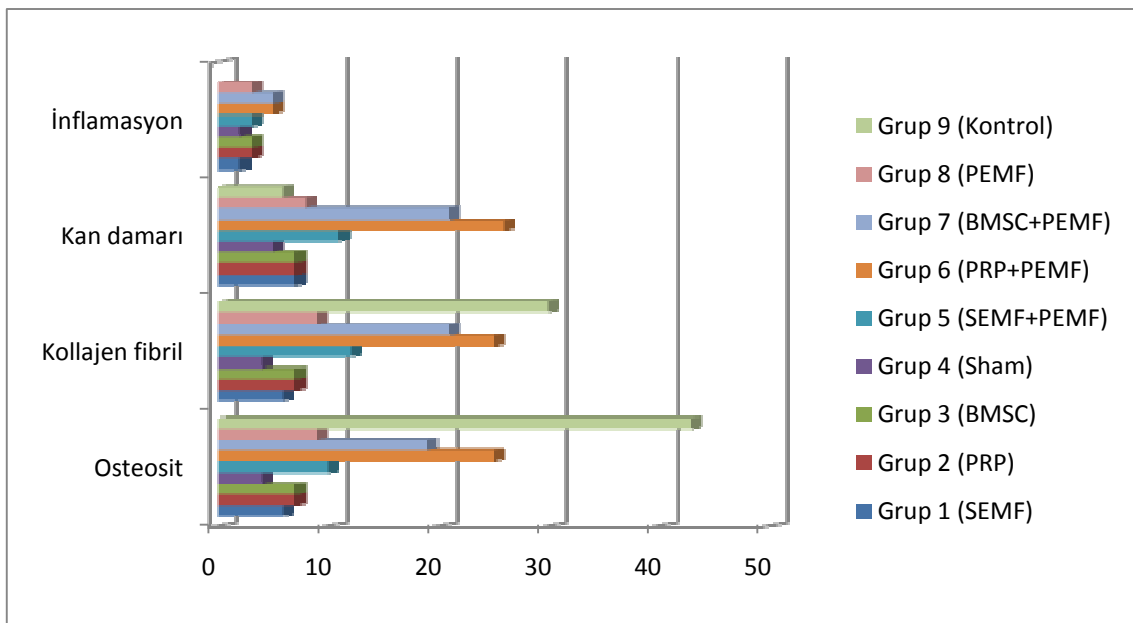
Histopatolojik parametrelerin değerlendirilmesi sonucunda uygulanan skorlama sistemi ile elde edilen sonuçların dağılımı Tablo 12’de sunulmuştur.

Tablo 12: Histopatolojik parametrelerin gruplar arası skorlama sonuçlarının dağılımı

Parametreler	Skorlama	Gruplar								
		Grup 1 (SEMF)	Grup 2 (PRP)	Grup 3 (BMSC)	Grup 4 (Sham)	Grup 5 (SEMF+PEMF)	Grup 6 (PRP+PEMF)	Grup 7 (BMSC+PEMF)	Grup 8 (PEMF)	Grup 9 (Kontrol)
		n								
İnflamasyon	-	13	12	12	13	12	11	11	12	15
	+	2	3	3	2	3	3	3	3	-
	++	-	-	-	-	-	1	1	-	-
	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kan damarı	-	8	8	8	10	4	-	-	7	9
	+	7	7	7	5	11	5	9	8	6
	++	-	-	-	-	-	9	6	-	-
	+++	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Kollajen fibril	-	9	8	8	11	3	-	-	6	-
	+	6	7	7	4	12	6	9	9	-
	++	-	-	-	-	-	8	6	-	12
	+++	-	-	-	-	-	1	-	-	3
Osteosit	-	9	8	8	11	5	-	-	6	-
	+	6	7	7	4	10	5	11	9	-
	++	-	-	-	-	-	10	4	-	2
	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	13

Histopatolojik parametrelerin değerlendirilmesiyle saptanan pozitif bulgu oranlarının gruplar arası farklılıklarının dağılımı Grafik 5'te gösterilmiştir.

Grafik 5: Histopatolojik değerlendirmede belirlenen pozitif bulgu oranına göre gruplar arası farklılıkların dağılımı



Yapılan karşılaştırma sonucunda; inflamasyon açısından gruplar arasında farklılık gözlenmedi. Kan damarı oluşumu açısından Grup 6’da en fazla oranda artış saptandı, daha az oranda ise Grup 7’de artış mevcuttu. Kollajen fibril ve osteosit oranı açısından kontrol grubuna en yakın değerler Grup 6 ve 7’de saptandı.

Deneklerden alınan biyopsi preparatlarının mikroskopik olarak değerlendirilmesi sonucunda, kemik defekti alanındaki köprüleşme oranları değerlendirildi ve gruplar arası skora yapıldı (Tablo 13).

Tablo 13: Deneklerden alınan doku preparatlarında histopatolojik olarak saptanan kemik köprüleşme oranları

Denek no	Gruplar								
	Grup 1 (SEMF)	Grup 2 (PRP)	Grup 3 (BMSC)	Grup 4 (Sham)	Grup 5 (SEMF+PEMF)	Grup 6 (PRP+PEMF)	Grup 7 (BMSC+PEMF)	Grup 8 (PEMF)	Grup 9 (Kontrol)
1	1	0	0	0	1	1	1	0	4
2	0	0	0	0	0	2	1	1	4
3	0	1	1	0	1	3	2	1	4
4	0	1	1	1	0	1	2	0	4
5	0	2	0	0	0	2	1	0	4
6	1	1	1	0	0	1	1	0	4
7	0	1	2	0	1	2	1	0	4
8	0	0	0	0	0	3	2	1	4
9	1	1	1	1	2	1	2	0	4
10	0	2	0	0	0	2	1	1	4
11	0	1	0	0	1	1	2	0	4
12	0	1	0	0	1	3	2	0	4
13	1	0	0	0	0	2	1	1	4
14	0	1	1	0	0	2	1	1	4
15	0	1	0	1	1	1	1	0	4

% 0= defekt boş, 1=defektin % 0-25’i dolu, 2= defektin % 25-50’si kapanmış, 3= defektin % 50-75’i kapanmış, 4= defektin % 75-100’ü dolmuş

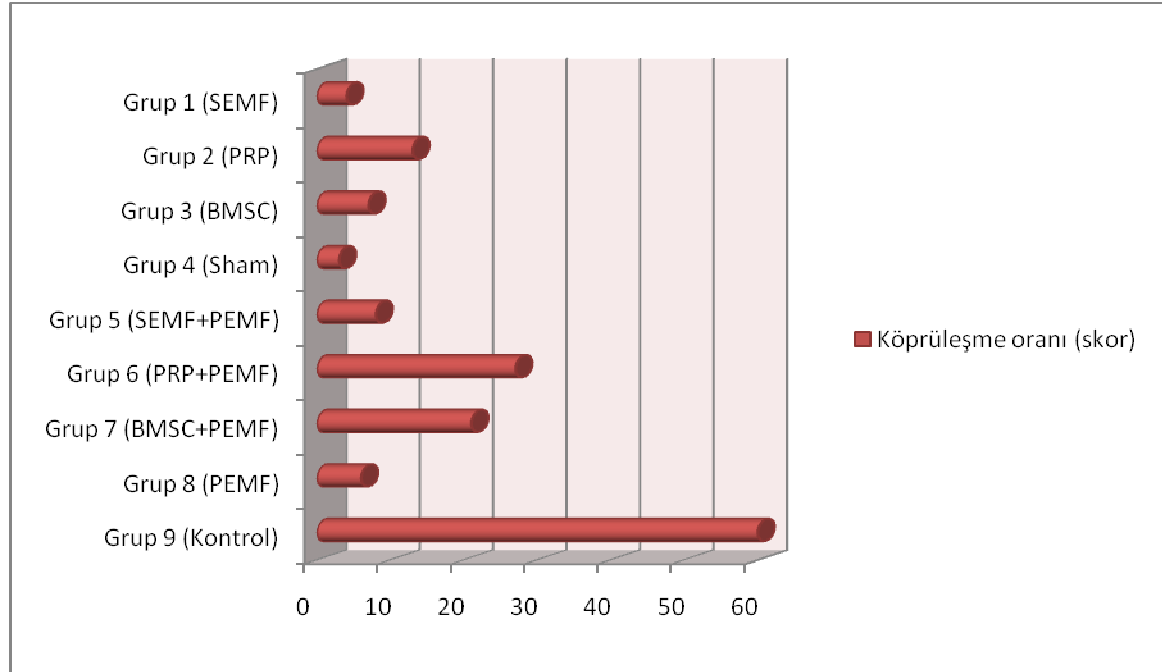
Kemik köprüleşme oranları açısından uygulanan skora sisteminin gruplar arası dağılımı Tablo 14’te sunulmuştur.

Tablo 14: Kemik köprüleşme oranları açısından gruplar arası skorların dağılımı

Skorlama	Gruplar								
	Grup 1 (SEMF)	Grup 2 (PRP)	Grup 3 (BMSC)	Grup 4 (Sham)	Grup 5 (SEMF+PEMF)	Grup 6 (PRP+PEMF)	Grup 7 (BMSC+PEMF)	Grup 8 (PEMF)	Grup 9 (Kontrol)
0	11	4	9	12	8	-	-	9	-
1	4	9	5	3	6	6	9	6	-
2	-	2	1	-	1	6	6	-	-
3	-	-	-	-	-	3	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	15

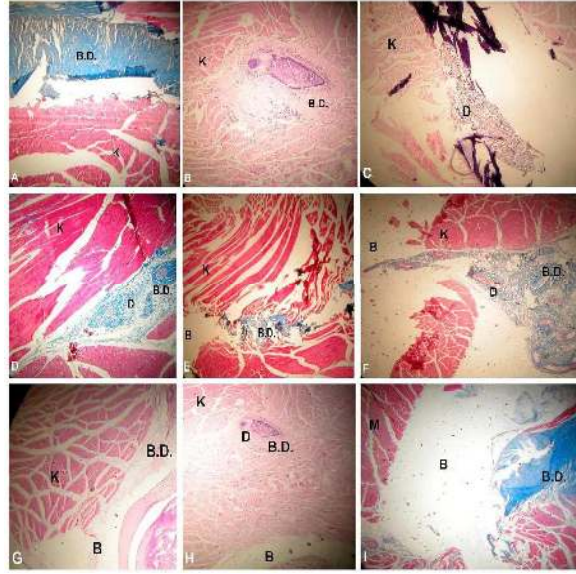
Kemik köprüleşme oranları değerlendirildikten sonra uygulanan skorlama sistemi sonuçlarına göre elde edilen farklılıklar Grafik 6’da sunulmuştur.

Grafik 6: Kemik köprüleşme oranları açısından gruplar arası farklılıkların dağılımı



Yapılan karşılaştırmaya göre; kemik köprüleşme oranının kontrol grubuna en yakın değerler elde edildiği grupların, sırasıyla Grup 6 ve Grup 7 olduğu saptanmıştır.

Histopatolojik incelemede alınan preparatlarda vaskülarizasyon, kollajen ve bağ dokusu, osteoblastik aktivite değerlendirildi ve kayıt altına alındı (Resim 29).



A; Grup 1, B; Grup 2, C; Grup 3, D; Grup 4, E; Grup 5, F; Grup 6, G; Grup 7, H; Grup 8, I; Grup 9
K; Kas, B.D; Bağ dokusu, D; Damar, B; Kemik

Resim 29: Mikroskopik analizde saptanan hücresel farklılıkların gruplar arası dağılımı (hematoksilen&eozen, Masson's trichrome, x40)

Yapılan DXA incelemeleri sonucunda elde edilen R1 ve R2 değerleri sırasıyla kayıt altına alındı (Tablo 15).

Tablo 15: Deneklerin BMD (gr/cm²) sonuçları

Gruplar	BMD (gr/cm ²)							
	Preoperatif		Postoperatif		3. ay		6. ay	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Grup 1 (SEMF)								
1	0.332	0.369	0.266	0.354	0.267	0.340	0.267	0.325
2	0.341	0.338	0.263	0.337	0.267	0.322	0.268	0.319
3	0.358	0.368	0.268	0.353	0.271	0.338	0.273	0.324
4	0.350	0.345	0.274	0.330	0.276	0.324	0.278	0.319
5	0.376	0.373	0.290	0.366	0.293	0.353	0.295	0.348
6	0.330	0.348	0.254	0.334	0.256	0.323	0.258	0.320
7	0.354	0.397	0.283	0.382	0.285	0.371	0.289	0.360
8	0.388	0.395	0.299	0.383	0.299	0.376	0.303	0.363
9	0.371	0.404	0.285	0.404	0.290	0.396	0.290	0.384
10	0.398	0.394	0.296	0.380	0.296	0.373	0.298	0.360
11	0.383	0.385	0.295	0.361	0.299	0.358	0.300	0.343
12	0.358	0.351	0.286	0.337	0.290	0.325	0.291	0.322
13	0.334	0.353	0.259	0.339	0.262	0.325	0.262	0.321
14	0.332	0.335	0.256	0.328	0.260	0.324	0.261	0.321
15	0.347	0.337	0.276	0.329	0.279	0.325	0.280	0.323
Grup 2 (PRP)								
1	0.342	0.359	0.268	0.354	0.274	0.349	0.278	0.349

2	0.366	0.329	0.275	0.327	0.280	0.326	0.283	0.325
3	0.327	0.328	0.256	0.328	0.262	0.325	0.266	0.324
4	0.374	0.375	0.283	0.371	0.287	0.364	0.291	0.363
5	0.367	0.332	0.275	0.330	0.280	0.328	0.285	0.326
6	0.364	0.335	0.288	0.329	0.289	0.327	0.295	0.326
7	0.374	0.356	0.280	0.352	0.286	0.347	0.289	0.343
8	0.356	0.390	0.279	0.388	0.281	0.387	0.289	0.386
9	0.361	0.398	0.275	0.395	0.277	0.390	0.284	0.387
10	0.366	0.379	0.277	0.376	0.279	0.374	0.286	0.372
11	0.377	0.360	0.282	0.357	0.289	0.356	0.291	0.353
12	0.329	0.354	0.256	0.349	0.258	0.347	0.263	0.345
13	0.382	0.393	0.290	0.389	0.297	0.387	0.299	0.386
14	0.375	0.393	0.290	0.392	0.298	0.389	0.300	0.387
15	0.388	0.385	0.295	0.384	0.297	0.382	0.304	0.380
Grup 3 (BMSC)								
1	0.360	0.361	0.280	0.349	0.287	0.345	0.290	0.332
2	0.363	0.350	0.285	0.348	0.291	0.345	0.295	0.330
3	0.372	0.380	0.282	0.367	0.286	0.358	0.291	0.349
4	0.361	0.368	0.277	0.353	0.281	0.341	0.284	0.329
5	0.380	0.371	0.290	0.348	0.291	0.340	0.297	0.327
6	0.377	0.379	0.291	0.361	0.292	0.347	0.300	0.334
7	0.394	0.410	0.304	0.410	0.307	0.396	0.313	0.384
8	0.361	0.423	0.290	0.415	0.298	0.402	0.300	0.390
9	0.357	0.338	0.276	0.329	0.283	0.323	0.285	0.321
10	0.401	0.407	0.308	0.395	0.315	0.386	0.316	0.381
11	0.358	0.391	0.277	0.382	0.281	0.374	0.286	0.366
12	0.396	0.384	0.306	0.375	0.311	0.362	0.315	0.358
13	0.368	0.387	0.276	0.377	0.281	0.365	0.284	0.348
14	0.347	0.337	0.263	0.337	0.270	0.328	0.272	0.322
15	0.389	0.392	0.300	0.389	0.302	0.376	0.307	0.368
Grup 4 (Sham)								
1	0.337	0.327	0.266	0.319	0.270	0.319	0.271	0.319
2	0.355	0.354	0.273	0.347	0.275	0.332	0.278	0.324
3	0.346	0.355	0.260	0.330	0.263	0.318	0.265	0.317
4	0.348	0.375	0.270	0.359	0.271	0.344	0.274	0.329
5	0.354	0.341	0.279	0.335	0.281	0.333	0.283	0.332
6	0.347	0.346	0.252	0.335	0.256	0.326	0.257	0.323
7	0.357	0.348	0.285	0.347	0.288	0.341	0.289	0.334
8	0.357	0.380	0.265	0.368	0.265	0.353	0.266	0.328
9	0.363	0.405	0.287	0.390	0.288	0.375	0.289	0.359
10	0.362	0.399	0.269	0.384	0.271	0.369	0.273	0.355
11	0.336	0.366	0.264	0.364	0.267	0.349	0.267	0.333
12	0.368	0.367	0.267	0.344	0.267	0.337	0.268	0.332
13	0.353	0.361	0.262	0.343	0.265	0.339	0.267	0.331
14	0.338	0.349	0.267	0.334	0.271	0.321	0.272	0.319
15	0.355	0.396	0.276	0.381	0.278	0.366	0.278	0.343
Grup 5 (SEMF+PEMF)								
1	0.361	0.368	0.269	0.364	0.275	0.364	0.279	0.363
2	0.358	0.360	0.276	0.356	0.281	0.353	0.286	0.353
3	0.375	0.357	0.285	0.354	0.289	0.353	0.291	0.352
4	0.370	0.382	0.286	0.378	0.291	0.76	0.294	0.374
5	0.407	0.398	0.315	0.398	0.321	0.397	0.323	0.396
6	0.348	0.336	0.262	0.335	0.271	0.332	0.272	0.332
7	0.380	0.383	0.289	0.379	0.293	0.376	0.298	0.375
8	0.396	0.332	0.306	0.332	0.311	0.328	0.315	0.325
9	0.335	0.351	0.249	0.348	0.254	0.344	0.256	0.341
10	0.375	0.355	0.297	0.353	0.301	0.352	0.304	0.351
11	0.349	0.361	0.261	0.358	0.268	0.354	0.271	0.353
12	0.352	0.350	0.261	0.347	0.267	0.346	0.270	0.342
13	0.351	0.331	0.255	0.328	0.261	0.326	0.263	0.324
14	0.364	0.372	0.271	0.371	0.279	0.368	0.281	0.366
15	0.342	0.395	0.263	0.391	0.270	0.387	0.272	0.386
Grup 6 (PRP+PEMF)								
1	0.366	0.370	0.290	0.368	0.304	0.366	0.309	0.364
2	0.385	0.366	0.306	0.362	0.311	0.362	0.315	0.362
3	0.364	0.358	0.284	0.356	0.298	0.351	0.302	0.350

4	0.376	0.375	0.300	0.369	0.311	0.369	0.318	0.365
5	0.385	0.386	0.303	0.383	0.310	0.382	0.321	0.380
6	0.384	0.353	0.311	0.352	0.323	0.345	0.330	0.343
7	0.354	0.377	0.279	0.370	0.287	0.368	0.295	0.365
8	0.337	0.379	0.257	0.376	0.264	0.375	0.275	0.374
9	0.411	0.401	0.313	0.399	0.321	0.396	0.331	0.396
10	0.382	0.363	0.298	0.363	0.306	0.356	0.317	0.353
11	0.381	0.359	0.309	0.352	0.318	0.352	0.327	0.352
12	0.382	0.403	0.288	0.399	0.295	0.396	0.306	0.391
13	0.367	0.397	0.292	0.389	0.302	0.386	0.311	0.385
14	0.355	0.379	0.281	0.376	0.295	0.375	0.300	0.373
15	0.375	0.371	0.285	0.368	0.293	0.364	0.303	0.363
Grup 7 (BMSC+PEMF)								
1	0.374	0.382	0.290	0.379	0.298	0.376	0.304	0.375
2	0.367	0.383	0.295	0.379	0.302	0.376	0.309	0.374
3	0.388	0.393	0.297	0.390	0.304	0.387	0.310	0.386
4	0.394	0.350	0.295	0.343	0.301	0.343	0.309	0.342
5	0.360	0.347	0.279	0.346	0.285	0.342	0.293	0.341
6	0.350	0.371	0.256	0.368	0.261	0.368	0.270	0.364
7	0.377	0.396	0.283	0.395	0.290	0.390	0.296	0.388
8	0.327	0.385	0.248	0.376	0.254	0.376	0.261	0.375
9	0.358	0.361	0.269	0.359	0.275	0.358	0.282	0.352
10	0.371	0.352	0.294	0.350	0.303	0.347	0.307	0.345
11	0.384	0.376	0.294	0.371	0.299	0.369	0.304	0.357
12	0.364	0.356	0.284	0.352	0.297	0.352	0.300	0.350
13	0.410	0.421	0.318	0.421	0.322	0.317	0.331	0.316
14	0.368	0.344	0.283	0.337	0.294	0.336	0.297	0.334
15	0.384	0.376	0.286	0.375	0.294	0.374	0.299	0.372
Grup 8 (PEMF)								
1	0.383	0.398	0.295	0.398	0.301	0.395	0.304	0.393
2	0.393	0.355	0.297	0.354	0.300	0.354	0.305	0.353
3	0.332	0.398	0.256	0.398	0.263	0.397	0.265	0.396
4	0.357	0.358	0.261	0.358	0.270	0.349	0.271	0.347
5	0.376	0.342	0.285	0.340	0.292	0.339	0.294	0.336
6	0.362	0.334	0.281	0.330	0.286	0.328	0.290	0.327
7	0.368	0.359	0.291	0.357	0.295	0.357	0.300	0.353
8	0.393	0.404	0.303	0.398	0.304	0.394	0.308	0.394
9	0.346	0.387	0.266	0.386	0.273	0.385	0.275	0.384
10	0.361	0.335	0.281	0.334	0.288	0.329	0.290	0.327
11	0.368	0.347	0.282	0.343	0.287	0.343	0.291	0.343
12	0.362	0.380	0.277	0.378	0.279	0.377	0.285	0.375
13	0.358	0.369	0.287	0.363	0.290	0.360	0.296	0.360
14	0.365	0.348	0.287	0.343	0.295	0.343	0.296	0.342
15	0.329	0.358	0.241	0.357	0.245	0.353	0.251	0.351
Grup 9 (Kontrol)								
1	0.327	0.377	0.318	0.360	0.312	0.346	0.307	0.342
2	0.333	0.340	0.325	0.336	0.322	0.334	0.312	0.319
3	0.399	0.376	0.386	0.370	0.381	0.364	0.374	0.354
4	0.430	0.368	0.423	0.355	0.415	0.348	0.400	0.347
5	0.334	0.383	0.321	0.379	0.310	0.365	0.303	0.357
6	0.402	0.402	0.393	0.395	0.389	0.388	0.385	0.384
7	0.356	0.372	0.349	0.361	0.345	0.351	0.337	0.343
8	0.348	0.375	0.344	0.360	0.334	0.358	0.329	0.350
9	0.378	0.367	0.369	0.358	0.354	0.354	0.351	0.342
10	0.356	0.373	0.347	0.361	0.339	0.356	0.333	0.354
11	0.356	0.369	0.344	0.356	0.341	0.350	0.340	0.349
12	0.390	0.351	0.384	0.349	0.378	0.334	0.378	0.332
13	0.382	0.349	0.371	0.347	0.369	0.337	0.368	0.322
14	0.397	0.359	0.385	0.346	0.383	0.344	0.376	0.332
15	0.365	0.395	0.355	0.386	0.355	0.377	0.345	0.374

DXA analizinin postoperatif 1. gün ve 6. aydaki bulgularının farklarının karşılaştırma sonuçları Tablo 16’da sunulmuştur.

Tablo 16: DXA analizinin postoperatif 1. gün ve 6. aydaki bulgularının farklarının karşılaştırma sonuçları

Gruplar	$\bar{x} \pm SD$	F	p
Grup 1 (SEMF)	0,0042±0,00132	193,297	<0.001
Grup 2 (PRP)	0,0089±0,00103		
Grup 3 (BMSC)	0,0087±0,00105		
Grup 4 (Sham)	0,0037±0,00150		
Grup 5 (SEMF+PEMF)	0,0087±0,00129		
Grup 6 (PRP+PEMF)	0,0176±0,00250		
Grup 7 (BMSC+PEMF)	0,0134±0,00124		
Grup 8 (PRP)	0,0087±0,00116		
Grup 9 (Kontrol)	0,0117±0,00546		

DXA analizinden elde edilen verilerin ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında kullanılan ANOVA testi sonuçlarına göre; gruplar arasında önemli derecede farklılık saptandı ($p<0.001$).

ANOVA testine göre önemli derecede farklılık saptanan değişkenlerde farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak amacıyla uygulanan çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni testine göre; DXA analizi ile elde edilen R1 ve R2 değerlerinin 1. gün ve 6. aydaki farklarının grup ortalamalarının sonuçları Tablo 17’de sunulmuştur.

Tablo 17: DXA analizi ile elde edilen R1 ve R2 değerlerinin 1. gün ve 6. aydaki farklarının grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçları

Gruplar	Ortalama fark $\pm$ Standart hata	p
Grup 1- Grup 2	0,00473±0,00083	<0,001
Grup 1- Grup 3	0,00447±0,00083	<0,001
Grup 1- Grup 4	0,00053±0,00083	=1,000
Grup 1- Grup 5	0,00447±0,00083	<0,001
Grup 1- Grup 6	0,01340±0,00083	<0,001
Grup 1- Grup 7	0,00920±0,00083	<0,001
Grup 1- Grup 8	0,00453±0,00083	<0,001
Grup 1- Grup 9	0,01593±0,00083	<0,001
Grup 2- Grup 3	0,00027±0,00083	=1,000
Grup 2- Grup 4	0,00527±0,00083	<0,001
Grup 2- Grup 5	0,00027±0,00083	=1,000
Grup 2- Grup 6	0,00867±0,00083	<0,001
Grup 2- Grup 7	0,00447±0,00083	<0,001
Grup 2- Grup 8	0,00020±0,00083	=1,000
Grup 2- Grup 9	0,02067±0,00083	<0,001
Grup 3- Grup 4	0,00500±0,00083	<0,001
Grup 3- Grup 5	0,00000±0,00083	=1,000
Grup 3- Grup 6	0,00893±0,00083	<0,001

<i>Grup 3- Grup 7</i>	0,00473±0,00083	<0,001
<i>Grup 3- Grup 8</i>	0,00007±0,00083	=1,000
<i>Grup 3- Grup 9</i>	0,02040±0,00083	<0,001
<i>Grup 4- Grup 5</i>	0,00500±0,00083	<0,001
<i>Grup 4- Grup 6</i>	0,01393±0,00083	<0,001
<i>Grup 4- Grup 7</i>	0,00973±0,00083	<0,001
<i>Grup 4- Grup 8</i>	0,00507±0,00083	<0,001
<i>Grup 4- Grup 9</i>	0,01540±0,00083	<0,001
<i>Grup 5- Grup 6</i>	0,00893±0,00083	<0,001
<i>Grup 5- Grup 7</i>	0,00473±0,00083	<0,001
<i>Grup 5- Grup 8</i>	0,00007±0,00083	=1,000
<i>Grup 5- Grup 9</i>	0,02040±0,00083	<0,001
<i>Grup 6- Grup 7</i>	0,00420±0,00083	<0,001
<i>Grup 6- Grup 8</i>	0,00887±0,00083	<0,001
<i>Grup 6- Grup 9</i>	0,02933±0,00083	<0,001
<i>Grup 7- Grup 8</i>	0,00467±0,00083	<0,001
<i>Grup 7- Grup 9</i>	0,02513±0,00083	<0,001
<i>Grup 8- Grup 9</i>	0,02047±0,00083	<0,001

DXA analizi ile yapılan R1 ve R2 ölçümlerinin postoperatif 1. gün ve 6. aydaki değerlerinin farklarının grup ortalamalarının Bonferroni karşılaştırma sonuçlarına göre; Grup 1 ile 2, 1 ile 3, 1 ile 5, 1 ile 6, 1 ile 7, 1 ile 8, 1 ile 9, 2 ile 4, 2 ile 6, 2 ile 7, 2 ile 9, 3 ile 4, 3 ile 6, 3 ile 7, 3 ile 9, 4 ile 5, 4 ile 6, 4 ile 7, 4 ile 8, 4 ile 9, 5 ile 6, 5 ile 7, 5 ile 9, 6 ile 7, 6 ile 8, 6 ile 9, 7 ile 8, 7 ile 9 ve 8 ile 9 arasında anlamlı derecede fark saptandı. Anlamlılık düzeyinin en fazla olduğu gruplar değerlendirildiğinde; ortalama ve standart sapma değerlerine göre Grup 6'dan (PRP+PEMF) elde edilen değerlerin ilk sırada ($\bar{x} \pm SD$; 0,02933±0,00083) ve ikinci sırada da Grup 7'den (BMSC+PEMF) elde edilen değerlerin ($\bar{x} \pm SD$; 0,02513±0,00083) yer aldığı saptandı.

3.5. TARTIŞMA

Kemik dokuda çeşitli nedenlerle meydana gelen defektler, vücudun yara iyileşme süreci ile onarılmaya çalışılır. Kemik doku oldukça vasküler bir yapıya sahiptir, iyileşmede bu vasküler yapının etkisi büyüktür. Kemiğin içeriğindeki kalsifiye bağ dokusu ise kemiğin sert ve güçlü bir yapıya dönüşmesini sağlar. (103).

Genel olarak vücudun herhangi bir yerinde aktive olan yara iyileşmesi süreci kompleks bir fenomendir ve birçok büyüme faktörü tarafından regüle edilir (42,104). Yara iyileşmesi süreci 3 fazdan meydana gelir. Bu fazlarda çeşitli hücrel ve humöral faktörler etkili olur. İlk faz katabolik latent periyoddur ve yaklaşık 1 hafta sürer. Bu süreci 2 haftalık proliferasyon süreci takip eder. Proliferasyon fazı oldukça sellüler ve vaskülerdir (105). Yoğun hücrel dönem doku onarımının başlangıç aşamasına rastlar, bu dönemde matriks ve hücre diferansiasyonu ile hücrel migrasyon gerçekleşir. Hücrel mitoz, neo-anjiyogenez ve makrofaj migrasyonunun aktivasyonu bu dönemde son derece önemlidir. Daha sonra reparasyon ve reorganizasyon fazı başlar. Bu süre birkaç ay sürer.

Kemik doku iyileşmesi de aynı şekilde oldukça koordine ve çeşitli büyüme faktörlerinin etkileşimi ile olmaktadır (4,60,106). Periosteal dokular ve hücreler potansiyel osteoblastik hücrelere dönüşüm gösterme potansiyeli bulunan öncül hücreler içerirler. Bu hücreler kimyasal ya da fiziksel stimülasyon ile aktive olurlar (6). Bu stimülatörler arasında kemik fraktürü, inflamasyon ya da tümör gelişimi gibi herhangi bir nedenle kemik defekti oluşumu sayılabilir (6,107). Kemik dokuda defekt oluştuktan sonra başlangıç aşamasında defekt hematoma ile dolar (22). Hücrelerle makromoleküller arasında etkileşim oluşur. Bu etkileşimi, segmental kemik defekti ve çevresini fibröz doku ve iskelet kasları ile damarların doldurması izler. Sonuçta mezenkimal birikim ve kemik morfogenezi, hipertrofik kondrogenezis, intramembranöz/enkondral ossifikasyon oluşur (16). Daha sonra kallus formasyonu gelişir ve remodelling fazı başlar. Tüm bu süreçlerin koordine bir şekilde birbirini izlemesiyle kemik devamlılığı sağlanmış olur (22). Fizyolojik kemik iyileşmesinde eğer defekt küçük boyutta ise kırık kemik uçlarının arasının yavaş yavaş dolmasıyla iyileşme sağlanırken; kritik boyutlu kemik defektlerinde spontan iyileşme görülmez ve defekt alanı kapanmaz, sonuçta da ek girişimlere ihtiyaç duyulur (14,22). Onarılmayan geniş defektler ise non-union ile sonuçlanır ve defekt alanını fibröz doku doldurur (6).

İnflamasyon, kemik iyileşmesi sürecinde erken dönemde etkili mekanizmalardan biridir. İnflamasyonun kemik oluşumunu, osteoblastik aktiviteyi ve diferansiasyonu direkt ya da indirekt olarak indüklediği gösterilmiştir (1,6,108,109). Bununla beraber, aşırı derecedeki inflamatuvar durumların ise non-union riskini arttırdığı ileri sürülmektedir (2). Kemik iyileşmesinin tüm aşamaları sırasında görevli çok sayıda sitokin mevcuttur. Proinflamatuvar sitokinler arasında; tümör nekroz faktör- α (TNF- α ; tumor necrosis factor), TGF β 1, interlökin-1 (IL-1; interleukin-1), siklooksijenaz-1 ve 2 (COX-1,2; cyclooxygenase 1-2) gibi ajanlar mevcuttur. Bu sitokinlerin ölçümü ile rejenerasyon hakkında birtakım bilgiler edinilebilir (15). Ancak bu belirteçlerin analizleri spesifik değildir, ancak erken dönemde iyileşme periyodunu göstermekte yararlıdırlar. TNF α ve IL-1 erken intramembranöz kemik iyileşmesi döneminde, 5. günde artış gösterir. Onarım fazının 7. gününde ise düzeyi yükselen büyüme faktörlerinin sayısı artar. TGF β 1, kemik dokusunun biyosentezinde ve ekstrasellüler matriks oluşumunda potansiyel kemotaktik bir ajandır. Bu büyüme faktörü kemik rejenerasyonunda ve kondrojenizde aktif rol oynayan bir faktördür (16). İnflamasyon ve osteoblastik aktivite ile diferansiasyon 24 hafta sonunda dramatik biçimde azalmaktadır (6). Çalışmamızda bu belirteçlerin ölçülmesine yer vermememizin nedeni, sözkonusu belirteçlerin sadece erken dönemde bilgi verici olması, aynı zamanda bu belirteçlerin spesifik olmaması ve oluşturduğumuz kemik defekti modelinde non-union modeli oluşturmamızdır. Çalışmamızda bu nedenlerden dolayı, kemik rejenerasyonuna daha spesifik ve daha geç belirteçler arasında sayılan alkalen fosfataz aktivitesi ve osteokalsin düzeyleri ölçülmüştür. Ancak ilerideki çalışmalar, osteoblastik öncül hücrelerin farklılaşması ve inflamasyonun düzenleyici etkisinin anlaşılması üzerine yoğunlaşacaktır.

Kemik iyileşmesini arttırıcı stratejiler, fonksiyonel ve mekanik açıdan yeterli bir kemik dokusu oluşumuna yöneliktir (4). Kemik defekti alanındaki kondrojeniz, osteogeniz ve remodellingin sağlanması, kemik integrasyonu ve biyomekanik devamlılık, ana amaçlar arasındadır (16). Kranioyomaksillofasiyal, plastik cerrahi ve ortopedik cerrahi alanında kemik restorasyonu amacıyla uygulanan girişimler arasında çok çeşitli teknik ve biyomateryal bulunmaktadır (5,110). Kullanılan materyaller arasında otojen yağ, fasya, kıkırdak ve kemik gibi dokular yer almaktadır (5). Kullanılan yöntemler arasında yer alan otojen kemik greftlemesinin, spontan iyileşmeyen kritik boyutlu kemik defektlerinin tedavisinde altın standart olduğu bilinmektedir (3,22,29,110,111). Bu yöntemin avantajları arasında; immünolojik rezistans olasılığının bulunmaması, çevre

damarsal yapılarla etkileşme kabiliyetinin ve anjiyogenik büyüme potansiyelinin bulunması sayılabilir (5). Ancak yeterli miktarda otojen kemik grefti elde edilmesinde sorunlar yaşanabilmektedir (29). Bununla beraber, donör alan morbiditesine yol açması nedeniyle klinisyenler kemik yapı iskeletlerini kullanmayı tercih etmeye başlamışlardır (3,5). Kemik biyolojisinde çeşitli büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin önemli olduğu, in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterildikten sonra, bu bileşenlerin kullanılma oranı artış göstermeye başlamıştır. Bununla birlikte, kemik iyileşmesinin araştırıldığı deneysel ve klinik çalışmalarda; elektrik stimülasyonu, hiperbarik oksijen tedavisi, düşük yoğunluklu pulslu ultrason stimülasyonu, elektromanyetik alan uygulaması, rekombinant büyüme hormonlarının sistemik verilmesi, osteojenik otojen hücresel bileşen ve makromoleküllerin verilmesi, insan kemik morfogenetik proteini (BMP; bone morphogenetic protein) verilmesi, sentetik materyallerin kullanılması gibi yöntemlerle kemik oluşum hızı arttırılmaya çalışılmaktadır (35,37).

Kemik defekti alanına yerleştirilen materyalin, normal kemik iyileşmesine benzer yoğunluk ve özellikte yeni kemik oluşumunu sağlaması, ideal bir kemik iyileşme prosedürüdür (14). Ancak günümüzde bu amaçla kullanılan sentetik materyaller, vücut sıvılarından dolayı korozyona uğramaları ya da osteoindüktif ve osteokondüktif olmayışları nedeniyle pek uygun seçenekler değildir (29). Günümüzde, kemik grefti yerine kullanılan çeşitli kemik yapı iskeleti ürünleri arasında, doku mühendisliği kemik ürünleri güncel kullanımda yeri olan bileşimlerdir (5). BMSC ya da PRP içeren doku mühendisliği ürünleri, bu seçenekler arasında en kullanışlı olanlar arasında sayılmaktadır (5,110). Çalışmamızda pluripotent BMSC, PRP ve elektromanyetik alan stimülasyonu kullanımıyla elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Literatürde bu uygulamalara dair çalışmaların mevcut olmasına karşın, kombine kullanımları halinde elde edilecek sonuçlar ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir. Bu nedenle bu çalışmanın, literatüre bu açıdan katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Kritik boyutlu kemik defekti modelleri, biyomateryal ve diğer uygulamaların test edilmesi amacıyla kullanılan temel modellerden biridir (14). Bu amaçla kalvaryum, femur, radius ve zigoma gibi çeşitli modeller kullanılmaktadır. Sıçan, insan kemik dokusuna kıyasla minimal varyasyonlara sahip bir denektir (79). Sıçanın zigomatik kemiği de anatomik varyasyon ihtimali oldukça az olan bir dokudur. Bu nedenle çalışmada denek olarak sıçan kullanılmıştır. Zigomatik ark membranöz kemikten oluşmaktadır. Bu modelin özellikle kraniyofasiyal kemik defektlerinin rejenerasyonunun incelenmesinde iyi bir

model olduğu bilinmektedir (13). Yapılan deneysel çalışmalarda zigomadaki kritik boyutlu kemik defekti ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde kemik defekti mesafesinin 3-5 mm arasında olduğu gözlenmiştir. Biz de çalışmamızda bu bilgiyi göz önüne alarak 4 mm'lik defekt oluşturduk. Çalışma sonucunda bu defekt büyüklüğünün non-union modeli oluşturmada yeterli olduğunu gözledik.

Çalışmamızda uyguladığımız gibi, tüp şeklinde hazırlanmış defekt alanı fasya gibi örtücü bir yapı ile sarıldıktan sonra kapalı bir skafold elde edilebilmektedir. Fasya ve kas tabakaları anatomik yerlerine dikildikten sonra çiğneme sırasında greft materyallerinin yer değiştirmesi de önlenmektedir. Birçok olumlu yönünün bulunduğunu düşündüğümüz bu modelin avantajları arasında; zigomanın yüz kemikleriyle aynı rejenerasyon mekanizmasına sahip olması, farklı cerrahi yöntemlerin uygulanabilir ve alternatiflere açık olması, skafold oluşturulması için uygun olması, çevre dokuların oldukça vasküler olması ve immobilizasyon probleminin olmaması sayılabilir (13). Zigomatik kemikte oluşturulan ark defektlerinin herhangi bir fiksator kullanımına ihtiyaç göstermemesi de, bu seçeneği tercih etmemizdeki etkenler arasındadır. Sonuçta, bu modelin kraniyomaksillofasiyal cerrahi ile yakından ilgilenen plastik ve rekonstrüktif cerrahi uygulamaları açısından oldukça kullanışlı bir kemik defekti modeli olduğu kanaatine vardık.

Kemik defekti sahasına kan akımının artışı, iyileşmeyi hızlandırıcı bir etkidir (16,37). Bununla birlikte anjiyogenezis de başarılı bir kemik iyileşme sürecinde oldukça etkili bir role sahiptir (16,37,112). Anjiyogenezis basamağı, kemik iyileşme sürecinin özellikle erken dönemindeki en önemli fazlardan biridir (1,14). Anjiyogenezisle bağlantılı olarak, non-union'da en önemli patofizyolojik mekanizma, kemik dokusunun beslenmesinin yetersizliğidir (1,2). Bu nedenle kemik rejenerasyonu çalışmalarında kullanılacak skafoldun oldukça vasküler olması tercih edilir (5). Temporal fasya flebi malar, mandibular ve zigomatik bölge rekonstrüksiyonunda sık tercih edilen ve spesifik bir artere sahip kullanışlı bir fleptir (22). Biz çalışmamızda, süperfisiyal temporal fasyanın vaskülarize olmasından dolayı, kemik rejenerasyonunu arttırıcı etkisinin olduğu ve fasyanın içerisinden enjekte edilen materyalin sızmasının önleneceği düşünerek bu dokuyu skafold oluşturma amaçlı olarak tercih ettik. Bu flep ilk aşamada kemik defektinin oluşturulması sırasında eleve edildi ve aynı seansta tübülerize edilip içerisine silikon blok yerleştirildi. Silikon blok hem flebe şekil vermede ve kollapsın önlenmesinde, hem de non-union modeli oluşturmada kullanıldı. Bu nedenle bu uygulamanın bir tür prelaminyasyon olduğu düşünülebilir. Tek seansta prelaminyasyon ve non-union modeli oluşturulmasına müsait ve aksiyel bir arteri bulunduğundan dolayı defekt alanına osteoindüktif büyüme

faktörlerinin ulaşmasını kolaylaştırıcı bir flep modeli olduğu için, kemik rejenerasyonu çalışmalarında kullanılabilecek oldukça avantajlı bir skafold modeli olduğunu düşünmekteyiz.

Kemik defekti alanının erken dönemde 3 boyutlu skafold ile doldurulup yeni sentez edilmiş kemik dokusu ile doldurulması, normal kemik iyileşmesine yakın sonuçlar elde edilmesine olanak sağlar (22). Kemik yapı iskeleti kullanılan durumlarda başarının sağlanabilmesi, mekanik olarak stabil ve güçlü yeni kemik oluşumunun sağlanmasının yanısıra, yerleştirilen materyaller ile yeni kemik dokusunun etkileşimine bağlıdır. Bu aşamada kemik yapı iskeleti ile hücrelerin adezyonlarının rolü büyüktür. Hücresel adezyon ve hücresel cevaplar, osteointegrasyon ve osteokondüksiyonun sağlanmasında görev alırlar (72). İdeal bir skafoldun osteojenik, kemik hücre büyümesini kolaylaştırıcı olması gerekmektedir (5,56,113). Tüm bu nedenlerden dolayı çalışmamızda kullandığımız prefabrike flebin, daha önce sıralanan avantajlarına ek olarak; üç boyutlu, istenen şekil ve boyutta hazırlanabilen, biyouyumlu, sıvı geçişine karşı bariyer oluşturan bir skafold olması, tercih edilme nedenlerini arttırmaktadır.

İyileşmeme problemi, 4-6 aylık konsolidasyon süresinin dolmasına rağmen kemikte kaynama olmaması ile tariflenir. İyileşmeme problemi hipertrofik kallus şeklinde kemik fragmanları birleşmeden olabildiği gibi, kallus formasyonu olmadan atrofik şekilde de olabilir (2). Çalışmamızda zigomatik kemikte oluşturduğumuz 4 mm'lik defekt sahasına 1 ay süreyle yerleştirdiğimiz silikon blok sayesinde non-union modeli oluşturulmuştur. Elde edilen model atrofik bir non-union modelidir. Sonuçta tüm gruplarda standart ve birbirine eşdeğer non-union modeli oluşturulmuş ve denekler arası cerrahi farklılıklar ortadan kaldırılmıştır.

Herhangi bir doku hasarı durumunda, travmaya yanıt olarak trombositlerin salınımında artış olduğu bilinmektedir (114-116). Trombositler inflamasyonun başlaması, doku remodellingi ve onarımında etkili önemli bir mediyatördür. Kemik defekti oluşumunun ardından trombositler defekt alanında kaplayıcı bir görev üstlenirler. Trombositler içerisinde yer alan granüller bu açıdan önemli bir role sahiptir.

Trombosit solüsyonundan elde edilen PRP ürünleri plastik cerrahi, gastroenteroloji, travmatoloji, oftalmoloji gibi klinik alanlarda sık kullanılmaktadır. PRP'nin standart trombosit solüsyonuna göre kemik ve yumuşak doku rejenerasyonunu daha fazla arttırdığı savunulmaktadır (117-119). Aynı zamanda PRP'nin sıçan kemik iliği stromal hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu arttırarak, osteojenik hücre farklılaşmasını arttırdığı

gösterilmiştir (35,44,45,120-124). Bunun yanı sıra, kritik boyutlu kemik defektlerinde de rejenerasyonu lokal olarak regüle ettiği bilinmektedir (3,31,37,44,122). PRP; içeriğindeki fibrin, fibronektin ve vitronektin sayesinde koagulan ve aglomerat oluşturunca etki sağlar (44,47). PRP'nin osteoindüksiyon etkisini olmadığını öne sürenler bulunmasına karşın, osteoinduktif olduğu da belirtilmektedir (47). Osteoinduktif etkisinin olduğunu savunanlar, bunun nedeninin, PRP'nin osteoinduktif sitokinler ve büyüme faktörleri içermesine bağlı olduğunu öne sürmektedirler (118,125-127).

Trombosit hücrelerinin içerisinde yer alan α -granüller serotonin, tromboksan ve adenosin salar. Bu ürünler yüzey kaplayıcı süreci başlatır ve otokrin, parakrin olarak büyüme faktörlerinin salınımına yol açar. Salınan faktörler biyoaktif ve osteojenik farklılaşmaya pozitif etkili ürünlerdir (41). PRP bazı hücrel adezyon moleküllerini de ihtiva etmektedir. Bu adezyon molekülleri kemik dokusunda osteokondüksiyon, kemik matriksi oluşumu ve epitelyal migrasyonu sağlar (33). PRP'nin protein içeriği kemik matriksinin osteokondüksiyonunu, bağ doku ve epitelyal migrasyonu sağlar (15,35). PRP'nin adeziv içeriği ise stabilite ve doku kompartmanizasyonunu sağlar. Bunun yanı sıra, PRP'nin yara iyileşmesinde etkili protein bileşiminde çeşitli büyüme faktörlerini içerdiği bilinmektedir (5,29,31,33,37,42,55,128,129). Bunlar arasında PDGF izoformları, TGF- β 1 ve 2, IGF-1, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF; vascular endothelial growth factor) ve epitelyal büyüme faktörü (EGF; epithelial growth factor) yer almaktadır (5,29,33,35,44,111,130). Trombositlerden büyüme faktörleri salınmaya başladığı zaman yüzey reseptörleri ve hedef hücreler arasında etkileşim başlar. İntrasellüler metabolik yollar aktive olur. Protein transkripsiyonu indüklenir. Bu bileşimler transmembranöz reseptörler sayesinde aktive olur. Ardından intrasellüler protein kinaz aktive olur ve hücre büyümesi kontrol edildir. Araştırmalar bu büyüme faktörlerinin PRP içerisinde artırılmasına yöneliktir. Trombositin β granüllerinden salınan bu faktörler kemotaksisi ve osteoblastik prekürsörlerin mitogenezi sağlar, anjiyogenezi ve osteogenezi artırır (31,44,131). PDGF yara iyileşmesi sırasında mitogenez, anjiyogenez ve diğer büyüme faktörlerinde up-regülasyon etkisi yaparak pozitif etkiler oluşturur (3,31,35). PDGF bu sayede kemik proliferasyonunu stimüle eder, kondrosit ve osteoblastik aktiviteyi artırır (3). Her trombosit hücresi yaklaşık 1200 PDGF molekülü içerir ve degranülasyon sırasında bu moleküller açığa çıkar (35). PDGF (27-31 kDa) $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ subüniteleri bulunan ve fibroblastların kemotaktik aktivitesini arttıran, yara iyileşmesinin major stimulanı olan kilit bir moleküldür (3,41,42,48). Aynı zamanda kollajen ve protein sentezini hızlandırır. AA ve BB izoformları kemik hücrelerinin proliferasyonunu artırır. Ancak PDGF'nin kemik

iyileşmesindeki net rolü tam olarak açık değildir (3). TGF- α ve β 1-2 çoğu dokunun oluşum ve gelişimine katkıda bulunur (48). TGF β genel bir büyüme faktörüdür ve osteoblast öncüllerinin mitogenezi hızlandırır ve kemotaksisini sağlar (35,44). Bununla beraber, osteoklast fonksiyonunu da inhibe eder (35). TGF- β , rejenerasyonun latent fazında etkilidir ve uzamış etkiyi sağlar (42). TGF- β (25 kDa dimer) mezenkimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını, kollajen sentezini sağlar ve yeni oluşmuş kollajenin degrade olmasını inhibe eder (41,42). IGF-1 osteoblast sayısını ve kemik oluşumunu artırır (35). IGF-2 (7.6 kDa) kemik matriksin en güçlü büyüme faktörlerinden biridir. Bu bileşen kemik, fibroblast ve sinir dokusunun proliferasyon ve farklılaşmasını stimüle eder (41). Bu faktörler uzun dönem kemik cevabında ve osteoblast prekürsörlerinin modülasyonunda etkilidir. Görüldüğü gibi PRP; büyüme faktörü, sitokin ve adezyon molekülleri bakımından oldukça zengindir. Bu bilgiden hareketle, çalışmamızdaki PRP gruplarındaki olumlu bulguların, esas olarak bu büyüme faktörleri ve sitokinlerin aktivitesine bağlı olduğu düşünülebilir.

PRP’de yer alan büyüme faktörlerinin miktarlarının kantitatif olarak tayini güçtür (35). Aynı zamanda PRP içerisindeki mediatörlerin etkinliklerinin süresi ve derecesi ile ilgili net bilgiler açıklığa kavuşmamıştır (42). Ancak PRP’nin genel olarak erken dönem rejenerasyondaki etkisinin belirgin olduğu öne sürülmektedir (31,48,55,128,129). Bu durumun trombositlerin yaşam süresi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (48,132). Butterfield ve ark 2005 yılında yaptıkları çalışmada maksiller sinüs augmentasyonunda PRP kullanmışlar ve implantasyondan 8 hafta sonrasına kadar stimülatör etkinin devam ettiğini göstermişlerdir (133). Schlegel ve ark’ları yaptıkları çalışmada ise özellikle ilk 2 hafta içinde PRP uygulamasıyla kemik rejenerasyonunun arttığını saptamışlardır (3). 2. haftada mineralizasyonun sadece kemik grefti uygulanan gruba göre % 63 oranında arttığını göstermişlerdir. Çalışmaların çoğunda histolojik ve radyolojik bulgular değerlendirilmiştir (31,51). Otolog kemik grefti ile PRP kombinasyonu uygulanan mandibular defektlerde, sadece kemik grefti yerleştirilen gruba kıyasla trabeküler kemik yoğunluğunda artış olduğu, buna karşın kranial defektlerde herhangi bir kazanç sağlanmadığı ileri sürülmüştür (31,49,117). Bu konuda elde edilen deneysel veriler farklılık göstermekte ve tartışmalara yol açmaktadır (31,50,134). Çalışmamızda kullanılan PRP’nin erken dönemde rejenerasyonu stimüle ettiğini, ardından uygulanan PEMF stimülasyonunun da bu rejenerasyonu devam ettirdiğini düşünmekteyiz. Bu nedenle bu iki kombinasyonun hem kolay uygulanabilir, hem ucuz, hem de oldukça etkili olmasından dolayı, non-union riski bulunan olgularda kullanılabilecek öncelikli seçenekler arasında olmasını önermekteyiz.

PRP otolog kanın santrifüj edilmesiyle elde edilir ve % 338 oranında trombosit içerir (47). PRP elde edilmesinde tanımlanmış farklı metodlar mevcuttur (33,48). Bu teknikler ile PRP'deki trombosit miktarı 4.1-6.5 kat arttırılabilmekte ve 450.000-800.000 arasında değişmektedir (31,33,48,135-138). Ancak literatürde PRP preparasyonu ile elde edilen daha yüksek trombosit değerlerine de rastlanmaktadır. Çalışmamızda elde edilen trombosit düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. Hesaplanan değerlerin literatürde belirtilen değerler arasında olduğu gözlemlendi.

PRP preparasyonu, PRP araştırmalarının en kritik basamağını oluşturur (33,42). PRP çok küçük miktar kan örneğinden elde edilebilir. Preparasyon sonrasında ortalama 0.5 ml PRP elde edilebilmektedir (33). Yüksek miktarda trombosit içerir ve kolay uygulanabilir. PRP preparasyonunda elde edilen trombosit değerleri, büyüme faktörü oranı ve dolayısıyla osteojenik kapasitede etkilidir (31,55). Buna karşın, PRP'nin biyolojik olarak aktif uygun konsantrasyonu halen tam bilinmemektedir (31,52,54). Ancak çok yüksek trombosit değerlerinin inhibe edici etkisinin olduğu da öne sürülmektedir ve yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç olmadığı belirtilmektedir (31,128). PRP'nin elde edilmesindeki farklı tekniklerin farklı sonuçlara yol açtığı düşünülmekle beraber, bu konudaki mekanizmaya ait anlaşılamayan noktalar mevcuttur (50,139-143). Çalışmamızda uyguladığımız PRP preparasyon tekniği sonucunda istenen yeterli trombosit düzeylerinin elde edilebildiğini gözledik. Bu nedenle PRP'nin klinik uygulamalarda rahatlıkla elde edilip geniş serilerde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

PRP preparasyonu sırasında uygulanan teknikler arasında PRP jelin dondurma işlemi de mevcuttur. PRP'nin dondurulup çözüldükten sonraki osteojenik kapasitesinin taze PRP'ye kıyasla karşılaştırılmasına dair yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak taze PRP'nin dondurulmuş PRP'ye oranla daha fazla osteojenik kapasiteye sahip olduğu düşünülmektedir (31). Bu nedenle biz çalışmamızda taze PRP jel preparatı kullanımını tercih ettik.

PRP'nin trombin ve kalsiyum ile muamelesi sonucunda trombosit degranülasyonunu oluşturduğu ve büyüme faktörlerinin açığa çıktığı belirtilmektedir (31,35). Bu aşama oldukça kritik basamaklardan biridir. Çalışmamızda bu basamağı titiz bir şekilde uyguladık ve çalışma sonundaki bulgulara dayanarak, trombosit aktivasyonu konusunda başarı sağladığımız kanaatine vardık.

PRP'nin deneysel ve klinik uygulamalarda tek başına ya da diğer bileşenlerle kombine kullanımına dair yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur (33). PRP ve kemik transplantlarının kombine kullanımının yoğun hücresel aktiviteye yol açtığı gösterilmiştir.

PRP otogreftlerle beraber uygulandığında fibrin jel oluşumunu sağlayarak kohezyon oluşturmaktadır (31,129,140). PRP'nin diğer bileşenlerle kombinasyonu, pıhtı oluşumu nedeniyle iyi birer taşıyıcı olmasından da kaynaklanmaktadır (35,37). Klinisyenler kemik defekti alanına otolog greft materyali yerleştirip aynı alana PRP implante etmekte ve kemik rejenerasyonunu hızlandırmaya çalışmaktadırlar (31,45). Bu uygulama nispeten yeni ve güncel bir uygulamadır. İlk defa Whitman ve ark 1997 yılında trombosit jel preparasyonunu maksillofasiyal cerrahide fibrin glue'ya alternatif olarak kullanmış ve avantajlarını yayınlamışlardır (46). PRP kullanımına dair yapılan sonraki çalışmalar ise Marx ve ark'larına aittir (117). Bu araştırmacılar 1998 yılında otolog kemik grefti yerleştirilen kemik defekti bölgesine PRP uygulayarak kemik iyileşme hızını arttırmaya yönelik çalışmalar yapmışlardır. Gruber ve ark'ları ise yaptıkları çalışmalarda PRP ve kemik iliği kombinasyonunun migrasyon ve proliferasyonu arttırdığını, osteojenik farklılaşmayı ise azalttığını göstermişlerdir (144). Fennis ve ark'larının 2004 yılında yaptıkları araştırmada da, deneysel mandibular rekonstrüksiyonda PRP'nin otojen skafold kombinasyonu ile kullanımıyla kemik iyileşmesinin arttığı gösterilmiştir (129). PRP'nin skafold ile kombine kullanımında kemik formasyonu konusunda oldukça başarılı bir tedavi seçeneği olduğu bildirilmekle beraber, tartışmalı bazı sonuçlar da mevcuttur (29,35). Ancak benzer çalışmalarda PRP'nin osteogenezi arttırmadığı da ileri sürülmektedir (31,54,132,145). Özellikle ortopedik ve spinal cerrahideki füzyon yapıcı etkileri tartışmalıdır (145). Çalışmamızda PRP'nin tek başına ve elektromanyetik alan stimülasyonu ile kombine kullanıldığı deney grupları oluşturulmuştur. Sadece PRP uygulanan grupta kemik rejenerasyonuna ait pozitif bulgular elde edilmesine karşın, en iyi sonucun PRP ve PEMF kombinasyonunda alındığını gözledik. Bunun nedeninin, PRP ve skafoldun oldukça uyumlu davranmasını ve vasküler bir skafold kullanıldığı için PRP ürünleri ile inflamatuvar mediyatörlerin olumlu etkileşimlerinin bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Tek başına PRP kullanılan grupta tam olarak istenen oranda bir rejenerasyon süreci elde edilmemesinin nedeni, literatürde belirtildiği gibi, trombositin geç dönem iyileşme mekanizmasını stimüle etmesindeki yetersizliği olabilir. Ancak kombine kullanımdaki PEMF stimülasyonunun, PRP'deki osteojenik aktiviteyi önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir. Bu nedenle PEMF stimülasyonunun, kemik iyileşmesini artırıcı bileşen uygulanan vakalarda güvenle kullanılabilecek etkili bir destekleyici uygulama olduğu kanaatine vardık. Elde ettiğimiz bulgular, bu konudaki literatür verileriyle uyumluluk göstermekte idi.

PRP doku mühendisliği gelişimiyle paralel olarak multidisipliner araştırmalara konu olan yeni bir bileşimdir (44). Ucuz ve otolog alternatif bir büyüme faktörü kaynağıdır (48). PRP preparasyonu, endüstriyel gelişmelere paralel olarak kolaylaşmaktadır (31,136,140). PRP jel, kemik oluşumunda kullanılan iyi bir skafolddur (35). Otolog kandan elde edildiği için immünoreaksiyon ve hematogen yolla hastalık bulaşma riskini ortadan kaldırır (42). Allogeneik ve otolog kemik greftlemesine alternatif olarak kullanılabilir (35). Osteokondüktif özellikte, kolay elde edilebilen, trabeküler kemik depozisyonunu artırıcı bir etkiye sahiptir (44,47,48,146). Non-toksiktir ve minimal yan etkiye sahiptir (35,97). Enjeksiyonu minimal invazivdir ve enfeksiyon riski düşüktür (35). PRP hayvan deneylerinde sık denenmiş ve insan deneylerinde son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Ancak halen endosseöz yara iyileşmesi ve osteokondüktif fazdaki osteojenik hücre migrasyonuna PRP ve ürünlerinin etkisinin izole olarak araştırıldığı çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle bu konudaki bilgiler halen net olarak açıklığa kavuşmamıştır ve ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır (45,140,147). PRP'nin avantajları ile ilgili elimizde bulunan tüm veriler dikkate alındığında, bununla birlikte çalışmamızda elde ettiğimiz PRP ile ilgili olumlu bulgulara dayanarak, PRP'nin geniş klinik uygulamalarda yer alacağını düşünmekteyiz.

Kemik iliği dokusu; hematopoietik ve mezenkimal kök hücreleri içerir (57). Bu hücreler kemik oluşumu ve kalsifikasyonunu artırıcı etkiye sahiptir (56). Anjiyogenik, miyogenik, osteogenik ve kondrogenik kapasiteye sahiptirler (57). Mezenkimal kök hücre migrasyonu sıklıkla hasar görmüş dokunun remodellingi aşamasında aktive olur. Doku hasarı oluştuğunda, kemik iliği kök hücreleri hasarlanmış alana göç ederler. BMSC, kemik iyileşmesinde anahtar rolü üstlenen hücrelerdir (2). Bu hücreler pluripotent öncü hücrelerdir ve osteoblast, kondrosit, adiposit, kas hücreleri ve nöral hücrelere dönüşüm gösterme kapasiteleri bulunmaktadır (35,56,67,70,112,123,148-151). Aynı zamanda, kültür ortamında kolay izole edilebilme ve laboratuvar koşullarında hızlı proliferasyon olma gibi avantajlı yönleri mevcuttur (12,63,152,153). Mezenkimal hücrelerin çoğalma ve diferansiasyonu medüller kallus oluşumunun kritik basamağını oluşturur (16). Gelişmekte olan ve erişkin dokular, kemik iliği kök hücrelerinin diferansiasyonunu spesifik olarak regüle eden çeşitli faktörlere sahiptir.

Deneyisel in vitro çalışmalarda rejenerasyonu sağlayan osteoblastik hücrelerin birtakım büyüme faktörlerince regüle edildiği gösterilmiştir (16,45,57). Bu büyüme

faktörleri arasında TGF- β , PDGF, VEGF, IGF ve bFGF yer almaktadır (16,45,154-157). Bu bileşenler arasında en önemli yere sahip olanı TGF β 1'dir (16). Osteoindüktif stimülasyon ve kemik formasyonu oluşumunda çeşitli büyüme faktörlerinin kullanımı, deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmektedir. Rekombinant büyüme faktörlerinin en büyük dezavantajı pahalı olmalarıdır (48). Büyüme faktörlerinin farklı kombinasyonlarda kullanımı da güncel çalışmalar arasındadır (48,158).

Birçok çalışmada taze kemik iliğinin izole edilip kullanıldığı yöntemler tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, kemik iliğinin aspire edilip kullanılmasıyla osteoblastik aktivite ve kemik füzyonunun arttığı gösterilmiştir (66). Marx ve ark 1998 yılında kansellöz hücresel kemik iliği greftlerini kemik rejenerasyon modelinde kullanmışlardır (117). Taze kemik grefti ya da otolog kansellöz kemik, hematopoietik kemik iliği hücreleri içermekte ve kemik defektlerinin onarımında oldukça etkili bileşimler arasında sayılmaktadır (33). Taze kemik iliği hücrelerinin osteoblastlara farklılaşabildiği ve in vivo ortamda yeni oluşan kemik dokusuna entegre olabildiği gösterilmiştir (66). Kemik iliği greftleri, kırık ya da kemik defektlerinin doldurulmasında iyi bir kaynaktır (57). Günümüzde bu hücrelerin spontan iyileşmeyen kritik boyutlu kemik defektlerinde terapötik amaçlı kullanımına dair çalışmalar sürmektedir (67). Çalışmamızda iliak, femur ve tibial kemik iliğinin küret ile aspire edilip kullanıldığı deney grupları oluşturulmuştur. Çalışma sonunda elde ettiğimiz veriler, BMSC'lerin bu şekilde kullanımının yeterli bir osteoblastik aktiviteye sahip olmadığı şeklinde idi. Bu bulgu literatür verilerine göre farklılık göstermektedir. Bunun nedeni, yerleştirdiğimiz kemik iliği greftinin içerisinde, ekspande edilmediği için yeterli miktarda büyüme faktörünün bulunmaması olabilir. Ancak kemik iliği ile birlikte PEMF uygulanan grupta ise kemik iyileşmesinde belirgin artış olduğunu gözledik. Bu durum bize, PEMF'nin PRP grubunda olduğu gibi, kemik iliği grubunda da kemik rejenerasyonunun desteklenmesinde oldukça etkili olduğunu göstermiştir. Ancak bu gruptaki rejenerasyonun PRP grubundaki sonuçlara göre daha düşük olması, kemik iliği ekspansiyonunun gerekliliğini ortaya koymaktadır.

İn vitro çalışmalarda kemik iliği mezenkimal hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılmasıyla kemik formasyonunun artırılması sağlanır (10,31,35,56,57,60,61,67,70,71,159-165). Bu çoğaltma işleminde farklı birçok protokol kullanılmaktadır. Hücre kültürü uygulamalarının pahalı olması, hücrelerin multipotansiyelitesini azaltması gibi dezavantajları da mevcuttur (66). İn vitro ortamda

çoğaltılarak uygulanan kemik iliği kök hücrelerinin, in vivo olarak uygulanan ve diferansiye olmayan hücrelerden oluşan kemik iliğine göre daha fazla etkili olduğu öne sürülmektedir (70). Ancak BMSC'lerin in vitro ortamda sınırlı bir replikatif faza sahip olduğu ve osteojenik potansiyelinin azaldığına dair görüşler de mevcuttur (66,67). Bu nedenle kemik iliğinin kültür ortamında ekspande edilip edilmemesi konusunda halen tam anlamıyla bir fikir birliği oluşmamıştır (66). Mezenkimal kök hücrelerin in vivo uygulanması ile oluşan hücresel sinyallerdeki değişiklikler ise tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Spontan proliferasyonla ilgili çalışmaların netliği de hala açıklığa kavuşmamıştır ve ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır (57). Bizim çalışmamızda ise spontan proliferasyonun istenen rejenerasyon oranını sağlayamadığı gözlenmiş olup, bu konuda daha ileri karşılaştırmalı çalışmaların yapılması gerektiğine inanmaktayız.

Non-union ve psödoartroz bulunan olgularda kemik iyileşmesi amacıyla elektrik enerjisinin kullanımı 3 dekattan bu yana Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA; (US) food and drug administration) tarafından onaylanmış ve uygulanmaktadır. Elektrik ve elektromanyetik alan uygulaması kemik hastalıklarında geniş çaplı olarak kullanılmaktadır (79). Elektrik stimülasyonunun rejenere olan kemiklerde iyileşmeyi artırıp konsolidasyon süresini azalttığı; osteogenezi, osteoblast ve osteoklastları regüle ettiği, kemik remodellingini kontrol ettiği deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (17,79,80,83). PEMF stimülasyonunun ise yeni oluşmuş ya da iyileşmeyen kırıklarda, kemik grefti yerleştirilen olgularda rejenerasyonu arttırdığı konusunda literatür verileri mevcuttur (17,20,166). Lokal PEMF uygulamasının ağrı tedavisinde, sinir rejenerasyonunda, inflamasyonda ve kan akımının artırılmasında da etkili olduğu bilinmektedir (83,167). Son yıllarda elektromanyetik alan stimülasyonu ile ilgili deneysel ve klinik çok sayıda çalışma yapılmıştır (83,167,168).

Elektrik ve manyetik alan uygulaması kemik üzerinde piezoelektrik etkisi yaratır. Polarizasyona neden olur ve elektrik enerjisi mekanik enerjiye transforme olur (79). PEMF'nin muhtemel mekanizmasının vaskülarizasyonu, kollajen üretimini, osteojenik hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonunu, yeni oluşan kemik dokusuna kalsiyum alınımını ve kalsifikasyonu arttırması yoluyla osteogenezisi sağlaması olduğu düşünülmektedir (17,80,169-172). Çalışmamızda PEMF uygulanan gruplarda bu etkilerin gözlemlendiği saptanmıştır. Özellikle PEMF ile birlikte uygulanan farklı kombinasyonlarda, PEMF'nin osteojenik etkiyi potansiyalize ettiğini histolojik ve radyolojik olarak saptadık. Bu nedenle de çalışmamızda PEMF uygulamasının en etkili seçeneklerden birisi olduğu kanaatine vardık.

Elektromanyetik alan stimölasyon süresi oldukça önemli bir faktördür (17,80,173). Elektriksel stimölasyon düşük amplitüd ve yüksek frekansta kullanıldığında in vitro ve in vivo kemik formasyonu ve rezorbsiyonunu regüle etmektedir (79). Elektrik stimölasyonunun uygulama sıklığı, frekansı ve süresi değiştirilerek en etkili sonucun alınmasına yönelik denemeler yapılmaktadır (80). Eyres ve ark yaptıkları klinik çalışmada rejenere kemik dokusuna günlük 4 saat pulslu manyetik alan uygulamasının kemik dansitesinde anlamlı ölçüde bir artış oluşturmadığını saptamışlardır (173). Martin ve ark elektromanyetik alan stimölasyonunu günde 2-8 saat arayla uygulamışlardır (174). Ijiri ve ark günde 10 saatlik elektromanyetik alan stimölasyonunun, 5 saatlik uygulamaya göre rejenerasyonu önemli ölçüde arttırdığını göstermişlerdir (18). Benzer şekilde, tavşan kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda, günde 10 saat uygulanan 1.5 ve 15 Hz arasındaki frekanslarda kemik iyileşmesinin olumlu yönde etkilendiği gösterilmiştir (80). Bringhton ve ark ise günde 20 saatlik bir uygulama periyodu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda elektromanyetik alan gücünün 0.2-0.3 mT olduğu değerlerde güçlü osteojenik kapasite olduğu gösterilmiştir (17,175). Chang ve ark 300 µs, 7.5 Hz dozda PEMF uygulamasının osteoklastogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir (176). Kemik iyileşmesinde optimal elektromanyetik alan stimölasyon süresi ve frekansını kullanmak gereklidir (17,83). Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalarda PEMF frekansının 50 Hz ve gücünün 1.5 mT olduğu gözlenmiştir (79). Çalışmamızda güncel metodlar ele alındığında günde 8 saat ve 1.5 mT 50 Hz'lik uygulama metodunu tercih ettik. Bu planlamayla uyguladığımız PEMF'nin optimal etkiyi sağladığını gözledik. Bu etkiyi elde etmemizin en önemli nedenlerinden biri de, çalışmada Faraday kafesini kullanmamızdır. Bu kafesin özelliği; çevredeki manyetik alanın kafes içerisine girmesini, kafes içerisindeki manyetik alanın da dışarı çıkmasını önlemesidir. Böylece kafes içerisinde yeterli ve homojen bir elektromanyetik alan oluşturulması sağlanabilmektedir.

Deney grupları planlanırken oluşturulan skafold içerisine yerleştirilen bileşenlerin tek başlarına ve manyetik alan ile kombine gruplar halinde karşılaştırılması planlanarak deney protokolü hazırlanmıştır. PRP ve kemik iliğinin kombine uygulandığı çalışmaların sayısı çok fazla olduğu ve sonuçları bilindiği için böyle bir grup oluşturulmamıştır. Manyetik alan stimölasyonunda pulslu manyetik alanın etkilerinin daha güçlü olduğu literatür verilerine dayanarak belirlendi ve temel olarak PEMF grupları oluşturuldu. Ancak aynı zamanda PEMF ve SEMF'nin de tek başlarına uygulandığı karşılaştırmalı gruplar da çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın sonunda literatür verileriyle paralellik gösterecek şekilde, SEMF'nin PEMF'ye göre daha az etkili olduğunu saptadık. Ancak bu konudaki

mekanizmanın tam olarak açığa çıkarılması ve bu amaçla farklı frekans ve güçte SEMF uygulamalarının deneysel olarak araştırılması gerekmektedir.

Konnektif dokuların önemli bir elemanı olan kollajen vücut proteinlerinin yaklaşık 1/3'ünü oluşturur. İçerisinde glisin, prolin, hidroksiprolin ve hidroksilizin gibi aminoasitler içermektedir. Dolayısıyla içerdiği bol miktardaki hidroksiprolin düzeyinin araştırılması, yara iyileşmesinin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Prolin ve hidroksiprolin, sekonder amino gruplu aminoasitlerdir. Endojendirler ve kollajen biyosentezinde önemlidirler. Kollajen metabolizması araştırmacıları, proteine bağlı olan hidroksiprolini, kollajen biyosentezinin işareti olarak kullanılmaktadırlar. Kollajen dokulara dayanıklılık sağlayan, yaraların iyileşmesinde tıkaç görevi üstlenerek iyileştirici fonksiyona sahip bir moleküldür. Kollajen molekülleri üçlü heliks yapıya sahiptir. Memeli kollajeninde heliksin X pozisyonunun 100'ü prolin ve Y pozisyonunun 100'ü 4-hidroksiprolindir. Bu iminoasitler, polipeptidlerin eksen etrafında dönmesini kısıtlar ve böylece üçlü heliksin kararlılığını sağlarlar. Hidroksiprolin kalıntıları, dıştaki su molekülleri ile hidrojen bağı yaparak kollajenin üçlü heliksine daha fazla oranda kararlılık kazandırır. Kollajen aynı zamanda bazı X pozisyonlarında 3-hidroksiprolin ve Y pozisyonlarında 5-hidroksilizin içerir. Kemik dokusunda Tip 1 kollajen sık bulunur. Kollajen proteoglikanla (kondroitin sülfat ile) 9:1 oranında elastin alarak tendonları ve kendisinin dört katından çok hidrate kalsiyum fosfat alarak sert doku olan kemikleri oluşturur. Literatürde hidroksiprolinin yara iyileşmesini gösteren bir belirteç olarak kullanıldığına dair çok sayıda çalışma mevcuttur. Yaralarda hidroksiprolin yığılmasının 5. günde arttığını ve 7. günde alınan örneklerin uygun olduğu belirtilmiştir. Bu yüksekliğin 15. güne kadar sürdüğü belirtilmektedir (102). Biz çalışmamızda bu bilgiye dayanarak hidroksiprolin ölçümü amacıyla doku örneklerini cerrahi işlem tamamlandıktan ve intralüminal bileşenlerin yerleştirilmesinden sonraki 5. günde aldık. Bu dönemde yaptığımız hidroksiprolin ölçümünün, literatür verileriyle uyumluluk gösterecek tarzda, yara iyileşmesinin iyi bir göstergesi olduğunu gözledik. Özellikle PRP ve PEMF uygulanan grupta hidroksiprolin düzeyinde saptanan yükselmenin, diğer kemik iyileşme bulgularıyla korelasyon gösterdiğini gözledik. Bu durum da bize hidroksiprolinin güvenilir bir yara iyileşmesi belirteci olduğunu göstermektedir.

Kemik rejenerasyonunun ölçülmesi için değişik immünohistokimyasal ve enzimatik teknikler kullanılmaktadır (6,56). Osteojenik hücrelere dönüşüm gösteren kemik iliği kök hücreleri, bu esnada birtakım ekstrasellüler matriks proteinlerinin açığa çıkmasına neden olurlar (57,70,177). Kemik iliği kök hücrelerinin osteojenik farklılaşması ALP aktivitesi ve

osteokalsin düzeyleriyle değerlendirilebilir (56,70). Bu proteinler kemiğe spesifik veriler elde edilmesini sağlayan belirteçler arasındadır (56). ALP kemik matriks enzimidir ve osteogenezin gösterilmesinde en sık kullanılan belirteçtir (61). Bu enzimin aktivitesinin ölçümü, kemik mineralizasyonu ve osteojenik kapasitenin değerlendirilmesini sağlayan erken dönem belirteçlerden biridir (56,70,178,179). ALP aktivitesi ile kemik formasyonu arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur. Ancak yanlış pozitif sonuçların elde edilebildiğine dair veriler mevcuttur (61,180). Literatür verileri incelendiğinde ALP aktivitesi ölçümünün genelde kemik defekti onarımından 1-3 hafta sonra yapıldığı bildirilmektedir (33,70). Çalışmamızda ALP aktivitesi ölçümü skafold içerisine implantasyon uygulanmasının ardından 10. günde yapıldı. Bu dönemde yapılan ölçümün gruplar arası farklılıkları korele bir şekilde yansıttığını gözledik.

Osteokalsin, osteoblastlardan sekrete edilir (33). Bu bileşen kemikte bol miktarda bulunan non-kollajen bir proteindir (15,33). Kemik rejenerasyonunda osteoblastik fonksiyonun iyi bir göstergesidir (33,35). Osteokalsin, kemik Gla proteini adıyla anılır. 5800 kDa ağırlığındadır. Osteoblast, osteosit, kondroblast ve odontoblastların sentezinin göstergesidir. Vitamin K'ya bağımlıdır. Kalsiyum bağlayıcı protein bu molekülün sentezini regüle eder. Bu molekül mineralize kemik matriksin osteoblastlara farklılaşmasının iyi bir belirteçidir. Bununla birlikte osteokalsin'in osteogenezisteki rolü tam olarak net değildir. Ancak bazı çalışmalar bu molekülün kemik remodellingi ve mineralizasyonunda etkili olduğunu göstermektedir. Osteokalsinin küçük bir miktarı bile sirkülasyona karışır ve serumda tespit edilebilir (15). Osteokalsin seviyelerinin 4 hafta sonra artış göstermeye başladığı ve 12. haftada pik yaptığı gösterilmiştir (11). Serum miktarının ölçümü kemik formasyonu için iyi bir indikatördür (15). Çalışmamızda bu literatür bilgisi ışığında, cerrahi işlem tamamlandıktan ve kemik rejenerasyonu başladıktan sonraki 12. hafta içinde deneklerden kan örneği alınmış ve osteokalsin seviyeleri çalışılmıştır. Osteokalsin seviyeleri özellikle PRP+PEMF uygulanan grupta, diğer gruplara kıyasla anlamlı ölçüde yüksek olarak saptandı. Elde ettiğimiz veriler sonucunda osteokalsin'in en az ALP aktivitesi ölçümü kadar duyarlı ve spesifik bir belirteç olduğu kanaatine vardık.

Son yıllarda, kemik kalitesinin, kantitesinin ve kemik döngüsünün değişik metodların kombinasyonu ile araştırılmasının gerekliliği tartışılmaya başlanmıştır (181). Kalitenin kemik biyopsisi, histopatolojik incelemeler, mikrokompüterize tomografi ve invaziv olmayan manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile birkaç iskelet bölgesinde değerlendirilmesi önerilmektedir (5,48,181). Kemik mineral yoğunluğu ölçümünde

kullanılan teknikler arasında radyografiler, DXA, tek foton absorpsiyometrisi SPA; single photon absorptiometry), çift foton absorpsiyometrisi (DPA; dual photon absorptiometry), bilgisayarlı tomografi, ses hızı (SOS; speed of sound), geniş bantlı ultrasonik zayıflama (BUA; broadband ultrasonic attenuation) ve tek enerjili X-ışını absorpsiyometrisi (SXA; single energy x-ray absorptiometry) kullanılmaktadır. DXA günümüzde bu amaçla kullanılan altın standart yöntemler arasında sayılmaktadır. Bu teknikte, enerji spektrumundaki değişikliklerin yaratacağı problemler, otomatik iç referans sistemi ile çözümlenmiştir. Işın önce absorpsiyon materyali içeren bir ayarlama diskinden, sonra çekim yapılacak dokudan geçer ve dokudan elde edilen değer, absorpsiyon materyalinden alınan değere oranlanarak verilir. Yüksek rezolüsyon ile elde edilen görüntüler, ard arda incelemeler sırasında aynı bölgenin ölçüldüğüne emin olmaya olanak tanıdıkları için, netliğe önemli ölçüde katkıda bulunurlar. Duyarlılık oranı yüksektir. Tüm vücut, ön-arka ve lateral lumbal omurga ve femur ölçümü yapar. Tarama 2 boyutludur (gr/cm^2), alansal yoğunluğu verir. Periferik ölçüm de yapılabilir. Alınan radyasyon dozu 1-5 mrem'dir. Mikrokomputerize tomografi cihazının ve uygulamanın pahalılığı göz önüne alınarak tedavinin monitörizasyonu gibi konular açısından, DXA'nın kullanımının daha yaygın olduğu da bir gerçektir (181). DXA küçük deney hayvanlarında oldukça kullanışlı bir görüntüleme metodudur (79). Tüm bu avantajlardan dolayı çalışmamızda DXA kullanmayı tercih ettik. Nitekim, küçük deney hayvanında uyguladığımız çekimlerin tekrarlanabilir, hassas, kantitatif ölçüme olanak tanınması nedeniyle, çalışma sonunda son derece duyarlı ve ayrıntılı veriler elde etmemize olanak sağlandı.

Doku mühendisliği uygulamaları, kemik rejenerasyonunu hızlandırıcı ve tedavi süresini kısaltıcı etkilere sahip güncel alternatif tedavi stratejileri arasında yer almaktadır (29,35,182). Bu stratejiler içerisinde 3 komponenti içerir; osteojenik hücreler, osteokondüktif faktörler ve skafoldlar. Bu bileşimler kemik mikroçevresindeki rejenerasyonu hızlandırırlar (35). Doku mühendisliği ile üretilen skafoldların üç boyutlu tasarımlarında vasküler invazyona izin vermesi ve osteoprogenitör hücrelerin aranjmanını sağlaması gibi özellikler istenmektedir (28). Büyüme faktörleri doku mühendisliğinde kullanılan vazgeçilmez komponentlerden biridir (29).

Doku mühendisliği kemik greftleri travma, tümör rezeksiyonu gibi çeşitli durumlar sonucunda oluşan segmental kemik defektlerde oldukça kullanışlı bir hale gelmeye başlamıştır (5). Çalışmamızda kullandığımız prefabrike fasya flebi ile oluşturulan skafold ve içerisine enjekte edilen osteojenik ve osteoindüktif ajanlar, oldukça kullanışlı kombine bir tedavi seçeneği sunmaktadır. Çalışmamızdaki gibi, osteojenik ajanların enjekte edilerek

kullanılabilmesi de minimal invaziv bir uygulama sağlayarak işlemi özellikle avantajlı hale getirmektedir.

3.6. SONUÇ

Küçük deney hayvanları üzerinde, kemik iyileşmesi ile ilgili çok sayıda moleküler ve biyolojik analiz yapılmıştır (1,2,6,7,183-186). Şu ana kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, kemik dokusunu indükleyecek materyaller üzerine yapılmış çok sayıda araştırma bulunduğu gözlenmektedir (16,35). Sistemik hormonlar ve büyüme faktörlerinin etkileşimi ile ilgili kemik ve yumuşak dokuyu ilgilendiren çalışmalar ise günden güne gelişim göstermektedir. Güncel teknolojiler ışığında osteojenik hücreler ile skafoldların kombine kullanımı ile kemik iyileşme hızı arttırılabilmektedir (12). Kemik dokusunda remodelling ve rezorbsiyon belli bir dengede dinamik olarak işlediği için, remodellingi hızlandıracak yöntemler kemik iyileşmesini olumlu yönde etkileyecektir (14). Nitekim, çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular sonucunda, PRP ve PEMF uygulamasının, kemik rejenerasyonu açısından oldukça yararlı ve etkili bir kombinasyon olduğunu saptadık.

Çalışmada kullandığımız süperfisiyal temporal fasya flebinin de otojen, vasküler ve 3 boyutlu olması, ideal bir kemik rejenerasyon ortamı sağlanmasında etkili oldu. Sonuç olarak, kritik boyutlu ya da iyileşmeyen kemik defektlerinde bu kombinasyonun oldukça kullanışlı bir tedavi seçeneği olduğunu ve klinik uygulamalarda güvenle kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak kemik ve yara iyileşmesi konusunda elde edilecek ayrıntılı veriler ve bu konudaki mekanizmaların tam olarak anlaşılmasından sonra, ileri doku mühendisliği uygulamaları ile kemik rejenerasyonu konusunda daha gelişmiş modellerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Güncel gelişmelere paralel olarak kemik rejenerasyonunda katedilecek mesafeler, insan ve toplum sağlığı açısından yaşam kalitesini arttırmaya katkıda bulunacaktır.

3.7. KAYNAKLAR

1. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*. 2008 Nov;43(5):931-40. Epub 2008 Jul 14.
2. Kratzel C, Bergmann C, Duda G, Greiner S, Schmidmaier G, Wildemann B. Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008 Oct 8;9:135.
3. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E, Wiltfang J. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2004 Oct;25(23):5387-93.
4. Tsuchiya K, Mori T, Chen G, Ushida T, Tateishi T, Matsuno T, Sakamoto M, Umezawa A. Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*. 2004 May;316(2):141-53. Epub 2004 Mar 4.
5. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Apr 1;73(1):63-72.
6. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, Sasano Y. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis*. 2008 Jul;14(5):457-64.
7. Strube P, Mehta M, Putzier M, Matziolis G, Perka C, Duda GN. A new device to control mechanical environment in bone defect healing in rats. *J Biomech*. 2008 Aug 28;41(12):2696-702. Epub 2008 Jul 21.
8. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005 Dec;36(12):1392-404. Epub 2005 Aug 15.
9. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma*. 2005 Nov-Dec;19(10 Suppl):S4-6.
10. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*. 2000 Sep;18(9):959-63.
11. Alsberg E, Hill EE, Mooney DJ. Craniofacial tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(1):64-75. Review.

12. Mastrogiacomo M, Papadimitropoulos A, Cedola A, Peyrin F, Giannoni P, Pearce SG, Alini M, Giannini C, Guagliardi A, Cancedda R. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. *Biomaterials*. 2007 Mar;28(7):1376-84. Epub 2006 Nov 28.
13. Kim MG, Shin DM, Lee SW. The healing of critical-sized bone defect of rat zygomatic arch with particulate bone graft and bone morphogenetic protein-2. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Mar;63(3):459-66. Epub 2009 Jan 26.
14. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J*. 2009 Jul;28(4):396-400.
15. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)--an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2575-84.
16. Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, Kuo YR, Yang KD, Huang HC, Wang FS. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res*. 2004 May;22(3):526-34.
17. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2000 Aug;11(4):354-60.
18. Ijiri K, Matsunaga S, Fukuyama K, Maeda S, Sakou T, Kitano M, Senba I. The effect of pulsing electromagnetic field on bone ingrowth into a porous coated implant. *Anticancer Res*. 1996 Sep-Oct;16(5A):2853-6.
19. Martin TJ, Ng KW. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J Cell Biochem*. 1994 Nov;56(3):357-66.
20. Ryaby JT. Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S205-15.
21. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*. 1998 Mar;16(3):247-52. Review.
22. Canter HI, Kayikcioglu A, Saglam-Aydinatay B, Kiratli PO, Benli K, Taner T, Erk Y. Mandibular reconstruction in Goldenhar syndrome using temporalis muscle osteofascial flap. *J Craniofac Surg*. 2008 Jan;19(1):165-70.

- 23.** Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Apr;(205):299-308.
- 24.** Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel).* 1990;138(3):185-92.
- 25.** Kamakura S, Nakajo S, Suzuki O, Sasano Y. New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Nov 1;71(2):299-307.
- 26.** Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Müller R, Hubbell JA. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol.* 2003 May;21(5):513-8. Epub 2003 Apr 21.
- 27.** Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 2004 May;22(5):560-7. Epub 2004 Apr 11.
- 28.** Lee YM, Seol YJ, Lim YT, Kim S, Han SB, Rhyu IC, Baek SH, Heo SJ, Choi JY, Klokkevold PR, Chung CP. Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices. *J Biomed Mater Res.* 2001 Feb;54(2):216-23.
- 29.** Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17(5):579-86.
- 30.** Ono M, Kubota S, Fujisawa T, Sonoyama W, Kawaki H, Akiyama K, Oshima M, Nishida T, Yoshida Y, Suzuki K, Takigawa M, Kuboki T. Promotion of attachment of human bone marrow stromal cells by CCN2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 May 25;357(1):20-5. Epub 2007 Mar 19.
- 31.** Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Weiss S, Schneider S, Kramer M, Leo A, Richter W. Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. *Cells Tissues Organs.* 2006;183(2):68-79.
- 32.** Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3(3):192-5.
- 33.** Thorwarth M, Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Schlegel KA. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone.* 2006 Jan;38(1):30-40. Epub 2005 Oct 28.

34. Rueger JM. Bone substitution materials. Current status and prospects Orthopade. 1998 Feb;27(2):72-9.
35. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. Bone. 2004 Oct;35(4):892-8.
36. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop Relat Res. 2000 Feb;(371):10-27. Review.
37. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. Bone. 2007 Feb;40(2):522-8. Epub 2006 Oct 27.
38. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993 May 14;260(5110):920-6. Review.
39. Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG. Bone tissue engineering. Nat Med. 1995 Dec;1(12):1322-4.
40. Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z. Bone and cartilage tissue engineering. Clin Plast Surg. 1999 Oct;26(4):629-45, ix. Review.
41. Lin SS, Landesberg R, Chin HS, Lin J, Eisig SB, Lu HH. Controlled release of PRP-derived growth factors promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2006;1:4358-61.
42. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. Int J Oral Maxillofac Surg. 2002 Dec;31(6):615-9.
43. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. J Oral Maxillofac Surg. 2005 Mar;63(3):362-9.
44. Rai B, Ho KH, Lei Y, Si-Hoe KM, Jeremy Teo CM, Yacob KB, Chen F, Ng FC, Teoh SH. Polycaprolactone-20% tricalcium phosphate scaffolds in combination with platelet-rich plasma for the treatment of critical-sized defects of the mandible: a pilot study. J Oral Maxillofac Surg. 2007 Nov;65(11):2195-205.
45. Kark LR, Karp JM, Davies JE. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. Clin Oral Implants Res. 2006 Jun;17(3):321-7.

46. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov;55(11):1294-9.
47. Ferraz FH, Schellini SA, Schellini RC, Pellizon CH, Hirai FE, Padovani CR. BMP implant associated with platelet-rich plasma in orbit fracture repair. *Curr Eye Res.* 2008 Mar;33(3):293-301.
48. Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Apr;18(2):244-51.
49. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Oct;60(10):1176-81.
50. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Jan-Feb;18(1):93-103.
51. Tözüm TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc.* 2003 Nov;69(10):664.
52. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 May;62(5):555-8.
53. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell.* 1986 Jul 18;46(2):155-69. Review.
54. Roldán JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Açıl Y, Terheyden H. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone.* 2004 Jan;34(1):80-90.
55. Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Apr;15(2):187-93.
56. Donzelli E, Salvadè A, Mimo P, Viganò M, Morrone M, Papagna R, Carini F, Zaopo A, Miloso M, Baldoni M, Tredici G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch Oral Biol.* 2007 Jan;52(1):64-73. Epub 2006 Oct 16.
57. Shirasu N, Ueno T, Hirata Y, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Sawaki M, Wakimoto M, Ota A, Imura H, Matsumura T, Yamada T, Yamachika E, Sano K. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochem.* 2010 May;112(3):270-7. Epub 2009 Apr 29.

58. Jackson IT, Scheker LR, Vandervord JG, McLennan JG. Bone marrow grafting in the secondary closure of alveolar-palatal defects in children. *Br J Plast Surg*. 1981 Oct;34(4):422-5.
59. Malard O, Guicheux J, Bouler JM, Gauthier O, de Montreuil CB, Aguado E, Pilet P, LeGeros R, Daculsi G. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone*. 2005 Feb;36(2):323-30.
60. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res*. 2005 May;20(5):848-57. Epub 2004 Dec 20.
61. Cooper LF, Harris CT, Bruder SP, Kowalski R, Kadiyala S. Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J Dent Res*. 2001 Jan;80(1):314-20.
62. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987 May;20(3):263-72.
63. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 1988;10:63-76. Review.
64. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res*. 1989 Mar;(240):270-80.
65. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.
66. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells*. 2006 Jul;24(7):1728-37. Epub 2006 Apr 6.
67. Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG, Wang CY. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol*. 2002 Jun;20(6):587-91.
68. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
69. Dégano IR, Vilalta M, Bagó JR, Matthies AM, Hubbell JA, Dimitriou H, Bianco P, Rubio N, Blanco J. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue- derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2008 Feb;29(4):427-37. Epub 2007 Oct 22.
70. Song SJ, Jeon O, Yang HS, Han DK, Kim BS. Effects of culture conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2007 Jul;17(7):1113-9.

71. Arinzech TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3631-8.
72. Park EK, Lee YE, Choi JY, Oh SH, Shin HI, Kim KH, Kim SY, Kim S. Cellular biocompatibility and stimulatory effects of calcium metaphosphate on osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3403-11.
73. Caplan AI. Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Oct;(379 Suppl):S67-70.
74. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000 Apr;113 (Pt 7):1161-6.
75. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2615-25.
76. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest*. 1989 Aug;84(2):640-6.
77. Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*. 1991 Jul;62(7):458-67.
78. Brown RL, Breeden MP, Greenhalgh DG. PDGF and TGF-alpha act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Surg Res*. 1994 Jun;56(6):562-70.
79. Akpolat V, Celik MS, Celik Y, Akdeniz N, Ozerdem MS. Treatment of osteoporosis by long-term magnetic field with extremely low frequency in rats. *Gynecol Endocrinol*. 2009 Aug;25(8):524-9.
80. Fredericks DC, Piehl DJ, Baker JT, Abbott J, Nepola JV. Effects of pulsed electromagnetic field stimulation on distraction osteogenesis in the rabbit tibial leg lengthening model. *J Pediatr Orthop*. 2003 Jul-Aug;23(4):478-83.
81. Smith RA. The free fascial scalp flap. *Plast Reconstr Surg*. 1980 Aug;66(2):204-9.

- 82.** Laboratuvar sıçanının anatomisi. Bayramiçli M. In: Deneysel mikrocerrahi, 1st ed. Bayramiçli M (ed). Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ. İstanbul, 2005, pp 119-84.
- 83.** Akpolat V, Celik MS, Ozerdem MS, Akdag MZ, Yavas MC. Examination of long term magnetic fields on rat calvarial and mandibular bone mass. *Biotechnol&Biotechnol Eq.* 2010;24(2):1-4.
- 84.** Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl).* 2005 May;50(5):137-42.
- 85.** Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G, Bail HJ. An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech (Berl).* 2007;52(6):383-90.
- 86.** Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008 Mar;14(1):79-88.
- 87.** Mulliken JB, Glowacki J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg.* 1980 May;65(5):553-60.
- 88.** Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998 Jul;9(4):310-6.
- 89.** Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Apr;85(1):206-17.
- 90.** Özçelik D, Hüthüt I, Kuran I, Bankaoğlu M, Orhan Z, Mayda AS. Comparison of accuracy of three-dimensional spiral computed tomography, standard radiography, and direct measurements in evaluating facial fracture healing in a rat model. *Ann Plast Surg.* 2004 Nov;53(5):473-80.
- 91.** Deneysel flep modelleri. Bayramiçli M. In: Deneysel mikrocerrahi, 1st ed. Bayramiçli M (ed). Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ. İstanbul, 2005, pp 567-8.
- 92.** Hing DN, Buncke HJ, Alpert BS. Use of the temporoparietal free fascial flap in the upper extremity. *Plast Reconstr Surg.* 1988 Apr;81(4):534-44.
- 93.** Flaps. Smith JD, Pribaz JJ. In: Plastic Surgery; Indications, Operations, and Outcomes. Achauer BM, Eriksson E (eds). Volume 1, 2000, Mosby Inc. St. Louis, p 261-90.

- 94.** Pribaz JJ, Fine NA. Prelamination: defining the prefabricated flap--a case report and review. *Microsurgery*. 1994;15(9):618-23.
- 95.** Vacanti JP. Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixter lecture. *Arch Surg*. 1988 May;123(5):545-9.
- 96.** Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*. 2003 Feb;31(1):27-33.
- 97.** Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng*. 2004 May-Jun;10(5-6):955-64.
- 98.** Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*. 1997 Jul;36(1):17-28.
- 99.** Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*. 1998 Aug;19(15):1405-12.
- 100.** Kaplan IB, Gilbert DA, Terzis JK. The vascularized fascia of the scalp. *J Reconstr Microsurg*. 1989 Jan;5(1):7-15.
- 101.** Ueno T, Honda K, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Shirasu N, Sawaki M, Yamachika E, Mizukawa N, Sugahara T. Histological comparison of bone induced from autogenously grafted periosteum with bone induced from autogenously grafted bone marrow in the rat calvarial defect model. *Acta Histochem*. 2008;110(3):217-23. Epub 2007 Dec 21.
- 102.** Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1961 May;93:440-7.
- 103.** Miyazono K, Takaku F. Platelet-derived growth factors. *Blood Rev*. 1989 Dec;3(4):269-76. Review.
- 104.** Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1498-507.
- 105.** Hosgood G. Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet Surg*. 1993 Nov-Dec;22(6):490-5.
- 106.** Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(2):165-81.

- 107.** Shimizu T, Sasano Y, Nakajo S, Kagayama M, Shimauchi H. Osteoblastic differentiation of periosteum-derived cells is promoted by the physical contact with the bone matrix in vivo. *Anat Rec.* 2001 Sep 1;264(1):72-81.
- 108.** Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2003 Mar 1;88(4):650-9.
- 109.** Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF -alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol.* 2005 Mar;77(3):388-99. Epub 2004 Dec 10.
- 110.** Kimelman N, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D. Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng.* 2007 Jun;13(6):1135-50.
- 111.** Wojtowicz A, Chaberek S, Urbanowska E, Ostrowski K. Comparison of efficiency of platelet rich plasma, hematopoietic stem cells and bone marrow in augmentation of mandibular bone defects. *N Y State Dent J.* 2007 Mar;73(2):41-5.
- 112.** Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone.* 2008 May;42(5):932-41. Epub 2008 Jan 26.
- 113.** Kanczler JM, Ginty PJ, Barry JJ, Clarke NM, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo RO. The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials.* 2008 Apr;29(12):1892-900. Epub 2008 Jan 29.
- 114.** Pintucci G, Froum S, Pinnell J, Mignatti P, Rafii S, Green D. Trophic effects of platelets on cultured endothelial cells are mediated by platelet-associated fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Thromb Haemost.* 2002 Nov;88(5):834-42.
- 115.** Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg.* 2002 Apr;30(2):97-102.
- 116.** Martineau I, Lacoste E, Gagnon G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(18):4489-502.

- 117.** Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.
- 118.** Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jul-Aug;14(4):529-35.
- 119.** Kim ES, Park EJ, Choung PH. Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *J Prosthet Dent.* 2001 Oct;86(4):428-33.
- 120.** Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S, Tabata S, Suwa Y. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res.* 1996 Nov;32(3):333-40.
- 121.** Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM, Davies JE. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *J Craniofac Surg.* 2003 May;14(3):292-300.
- 122.** Chaput CD, Patel KV, Brindley GW, Roux MA, Hu N, Dmitriev A, Cunningham B. Influence of a platelet concentrate on prosthetic bone ingrowth in a rabbit model. *J Surg Orthop Adv.* 2007 Winter;16(4):159-63.
- 123.** Picinich SC, Mishra PJ, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells. Cell- & tissue-based therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2007 Jul;7(7):965-73.
- 124.** Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, Agelan A, Manns JM, Wikesjö UM. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1287-92.
- 125.** Canalis E. Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism.* 1981 Oct;30(10):970-5.
- 126.** Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol.* 1995 Jun;66(6):522-30. Review.
- 127.** Lynch SE, Genco RG&Marx RE. Platelet rich plasma: a source for bone grafts. *Tissue Engineering.* 1999;4:71-8.
- 128.** Dugrillon BL, Kluter H. Topical application of platelets for improved wound healing. *Blood Ther Med.* 2002;3:21-6.
- 129.** Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):48-55.

- 130.** Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991 Nov;62(11):710-6.
- 131.** Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993 Mar;7(1):52-62. Review.
- 132.** Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):56-9.
- 133.** Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Mar;63(3):370-6.
- 134.** Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):484-8.
- 135.** Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng.* 2001 Jan 5;72(1):96-107.
- 136.** Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):357-62.
- 137.** Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Nov;114(6):1502-8.
- 138.** Fréchette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res.* 2005 May;84(5):434-9.
- 139.** Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Sep;59(9):1119-21.
- 140.** Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kübler NR, Würzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):60-70.
- 141.** Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Oct;13(5):529-35.

- 142.** Gruber R, Karreth F, Frommlet F, Fischer MB, Watzek G. Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. *J Orthop Res.* 2003 Sep;21(5):941-8.
- 143.** Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials.* 2003 Aug;24(18):3095-100.
- 144.** Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, Watzek G. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets.* 2004 Feb;15(1):29-35.
- 145.** Li H, Zou X, Xue Q, Egund N, Lind M, B nger C. Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bioceramics and platelet-rich plasma. An experimental study on pigs. *Eur Spine J.* 2004 Jul;13(4):354-8. Epub 2004 Jan 17.
- 146.** Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, Haas R, Pertl C. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Oct;14(5):578-83.
- 147.** Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol.* 2003 Jun;74(6):858-64.
- 148.** Zhao Z, Wang Z, Ge C, Krebsbach P, Franceschi RT. Healing cranial defects with AdRunx2-transduced marrow stromal cells. *J Dent Res.* 2007 Dec;86(12):1207-11.
- 149.** Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A. Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials.* 2006 Dec;27(36):6150-60. Epub 2006 Sep 11.
- 150.** Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, Ohgushi H. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng.* 2005 May-Jun;11(5-6):663-73.
- 151.** Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;(355 Suppl):S247-56.
- 152.** Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H, Tomita Y, Kobata Y, Shigematsu K, Takakura Y. Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Apr 15;117(5):1471-9.

- 153.** Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2007 Aug;28(22):3338-48. Epub 2007 Apr 14.
- 154.** Panagakos FS. Insulin-like growth factors-I and -II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. *Biochimie*. 1993;75(11):991-4.
- 155.** Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1998 Oct;283:2-37.
- 156.** Fiedler J, Röderer G, Günther KP, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*. 2002;87(3):305-12.
- 157.** Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Günther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*. 2002 Mar;30(3):472-7.
- 158.** Jansen JA, Vehof JW, Ruhé PQ, Kroeze-Deutman H, Kuboki Y, Takita H, Hedberg EL, Mikos AG. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *J Control Release*. 2005 Jan 3;101(1-3):127-36.
- 159.** Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992;13(1):81-8.
- 160.** Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997 Sep;12(9):1335-47.
- 161.** Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1998 Mar;16(2):155-62.
- 162.** Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998 Jul;80(7):985-96.
- 163.** Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res*. 2003 Jan;21(1):44-53.
- 164.** Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*. 2000 Mar 5;49(3):328-37.

- 165.** Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001 Feb 1;344(5):385-6.
- 166.** Bassett CA. The development and application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for ununited fractures and arthrodeses. *Orthop Clin North Am*. 1984 Jan;15(1):61-87.
- 167.** Kaya S, Celik MS, Akdag MZ, Adiguzel O, Yavuz I, Tumen EC, Ulku SZ, Ayaz SG, Ketani A, Akpolat V, Akkus Z. The effects of extremely low frequency magnetic field and mangan to the oral tissues. *Biotechnol&Biotechnol Eq*. 2008;22(3):869-73.
- 168.** Taylor KF, Inoue N, Rafiee B, Tis JE, McHale KA, Chao EY. Effect of pulsed electromagnetic fields on maturation of regenerate bone in a rabbit limb lengthening model. *J Orthop Res*. 2006 Jan;24(1):2-10.
- 169.** Matsunaga S. Histological and histochemical investigations of constant direct current stimulated intramedullary callus. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1986 Dec;60(12):1293-303.
- 170.** Yen-Patton GP, Patton WF, Beer DM, Jacobson BS. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*. 1988 Jan;134(1):37-46.
- 171.** Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ, Winrow VR, Kanczler JM, Simon B, Abbott J, Blake DR, Stevens CR. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 18;250(2):458-61.
- 172.** Aaron RK, Ciombor DM, Jolly G. Stimulation of experimental endochondral ossification by low-energy pulsing electromagnetic fields. *J Bone Miner Res*. 1989 Apr;4(2):227-33.
- 173.** Eyres KS, Saleh M, Kanis JA. Effect of pulsed electromagnetic fields on bone formation and bone loss during limb lengthening. *Bone*. 1996 Jun;18(6):505-9.
- 174.** Martin RB, Gutman W. The effect of electric fields on osteoporosis of disuse. *Calcif Tissue Res*. 1978 Feb 28;25(1):23-7.
- 175.** Bassett CA, Mitchell SN, Gaston SR. Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am*. 1981 Apr;63(4):511-23.
- 176.** Chang K, Chang WH, Tsai MT, Shih C. Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. *Connect Tissue Res*. 2006;47(4):222-8.

- 177.** Sasano Y, Zhu JX, Kamakura S, Kusunoki S, Mizoguchi I, Kagayama M. Expression of major bone extracellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles. *Anat Embryol (Berl)*. 2000 Jul;202(1):31-7.
- 178.** Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C, Dunn FW, Kawai S, Gall  a S, Stiot V, Blanchet AM, Courtois B, Baron R, Rawadi G. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone*. 2001 Oct;29(4):323-30.
- 179.** Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, L  wik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2000 May;141(5):1667-74.
- 180.** Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol*. 1997 Jun;97(3):561-70.
- 181.** Akpolat V. Osteoporoz tanısında kullanılan kemik mineral yo unlu u  l  m y ntemleri. *Dicle Medical Journal*. 2008;35(3):216-20.
- 182.** Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg*. 2002 Mar;13(2):231-9; discussion 240-3.
- 183.** Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am*. 1984 Feb;66(2):274-9.
- 184.** Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res*. 2005 May;23(3):639-45.
- 185.** Mark H, Nilsson A, Nannmark U, Rydevik B. Effects of fracture fixation stability on ossification in healing fractures. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Feb;(419):245-50.
- 186.** Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittlinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials*. 2000 Jun;21(11):1145-53.