

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVŞAN TİBİALARINDA OLUŞTURULAN
SEGMENTER KEMİK DEFECTLERİNİN VASKÜLER
ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)
YÜKLENMİŞ HİDROKSİAPATİT/JELATİN MATRİKS
İLE TEDAVİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BURAK YAĞMUR ÖZTÜRK**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. HALUK YETKİN**

**ANKARA
EYLÜL 2010**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVŞAN TİBİALARINDA OLUŞTURULAN SEGMENTER
KEMİK DEFECTLERİNİN VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME
FAKTÖRÜ (VEGF) YÜKLENMİŞ HİDROKSİAPATİT/JELATİN
MATRİKS İLE TEDAVİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BURAK YAĞMUR ÖZTÜRK**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. HALUK YETKİN**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından SBE-1/2009/47 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
EYLÜL 2010**

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması sırasında bana yol gösteren ve eğitimime değerli katkıları olan tez danışmanım Prof. Dr. Haluk YETKİN ve tez hazırlanmasının tüm aşamalarında desteğini yanımda hissettiğim Doç. Dr. Akif Muhtar ÖZTÜRK başta olmak üzere; bir parçası olmaktan gurur duyduğum Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nın Öğretim Üyeleri, Sayın Hocalarım Prof. Dr. E. Ertuğrul ŞENER, Prof. Dr. O. Şahap ATİK, Prof. Dr. Selçuk BÖLÜKBAŞI, Prof. Dr. Necdet Ş. ALTUN, Prof. Dr. Erdal CİLA, Prof. Dr. Sacit TURANLI, Prof. Dr. S. Aykın ŞİMŞEK, Prof. Dr. Ulunay KANATLI, Doç. Dr. Alpaslan ŞENKÖYLÜ, Doç. Dr. Hamza ÖZER, Doç. Dr. Hakan Y. SELEK ve Yrd. Doç. Dr. Erdinç ESEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. "Hidroksiapatit/jelatin matriks" polimerinin hazırlanması ve deney sürecindeki destekleri nedeniyle Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda görevli Prof. Dr. Erhan PİŞKİN ve Arş. Gör. Sinan EĞRİ'ye, örneklerin histolojik incelemesini yapan Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN, Doç. Dr. Çiğdem ELMAS, Arş. Gör. Güleser GÖKTAŞ ve Arş. Gör. Dr. Nesrin AKDEMİR'e, kemik mineral yoğunluğu ölçümü aşamasındaki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Feza KORKUSUZ ve Orta Doğu Teknik Üniversitesi Sağlık Merkezi çalışanlarına, istatistik değerlendirme aşamasındaki yardımlarından dolayı Orta Doğu Teknik Üniversitesi İşletme Bölümü Arş. Gör. Ülkem BAŞDAŞ'a, tüm Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi çalışanlarına, asistanlık eğitimim süresince ailem olarak benimsediğim tüm araştırma görevlisi arkadaşlarım ve Ortopedi servis/poliklinik çalışanlarına ve hayat boyu desteklerini yanımda hissettiğim annem, babam ve kardeşim Melih'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	6
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. KEMİĞİN ANATOMİ ve FİZYOLOJİSİ	7
2.2. KIRIK İYİLEŞMESİ	11
2.3. GREFTLER ile KIRIK İYİLEŞMESİNİN UYARILMASI	17
2.3.1. OSTEOJENİK GREFTLER	18
2.3.2. OSTEOİNDÜKTİF GREFTLER	21
2.3.3. OSTEOKONDÜKTİF GREFTLER	28
2.4. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)	40
2.5. VEGF ve ANJİYOGENEZİN KIRIK İYİLEŞMESİNDEKİ ROLÜ	42
2.6. DOKU MÜHENDİSLİĞİ ve MATRİKS HAZIRLANMASI	51
3. GEREÇ ve YÖNTEM	54
4. BULGULAR	61
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ	69
7. KAYNAKLAR	70
8. ÖZET	86
9. SUMMARY	88
10. EKLER	90

1. GİRİŞ

Ortopedik cerrahide, travma başta olmak üzere osteomyelit, konjenital anomaliler ve malignitelerin tedavisi sırasında karşılaşılan kemik defektleri ciddi bir problem teşkil etmektedir. Bu defektlerin tedavisinde çeşitli fiksasyon metodlarına ek olarak yeni kemik oluşumunu uyarmak için greftlemeye başvurulmaktadır. Otojen greftleme bu alanda altın standart olarak kabul edilse de; sınırlı donör alanı yanında lokal ağrı, kanama ve enfeksiyon gibi komplikasyonları nedeniyle her zaman rutin olarak uygulanmamaktadır. Otojen greftlemeye alternatif olarak yeni kemik oluşumunu uyarmayı amaçlayan diğer tedavi seçenekleri allojen greftler, sentetik kemik greftleri, polimerler, büyüme faktörleri ve bunların birden fazlasının bir arada kullanılmasına olanak sağlayan doku mühendisliği ürünü biyouyumlu matrikslerdir(scaffold).

Kırık iyileşmesinde gerekli şartların en önemlilerinden biri de lokal vaskülaritedir. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü(VEGF), kırık hattındaki lokal vasküler rejenerasyonun uyarılmasını sağlayan en önemli faktördür. Bunun yanında VEGF'nin, mezenkimal kök hücre kemotaksisini artırma ve osteoprogenitör hücrelerin üzerine dolaylı etkiyle osteoblast farklılaşması ve proliferasyonunu uyarak yeni kemik oluşumunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.^{1,2}

Yukarıdaki bilgilerin ışığında bu araştırmada, segmenter kemik defektlerinin tedavisinde sentetik kemik grefti olarak hidroksiapatit içeren, biyobozunur jelatin matriks üzerine lokal VEGF uygulamasının etkinliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİĞİN ANATOMİ ve FİZYOLOJİSİ

Kas-iskelet sisteminin en önemli yapıtaşı olarak kemiğin, vücuttaki yumuşak dokular için destek ve koruma, kaslar için mekanik destek sağlayarak hareket oluşumuna yardımcı olma ve mineral metabolizması için fonksiyonel bir merkez teşkil etme gibi görevleri vardır. Kemik doku, iki komponentten oluşmaktadır: 1) Hücreler, 2) İçinde kollajen liflerin yer aldığı, kemiğin dayanıklılığını sağlayan mineralize ekstraselüler matriks.

İnsan vücudundaki kemiğin büyük kısmı, mezenkimal hücreler tarafından kırkırdak mineralizasyonu (endokondral ossifikasyon) ile oluşturulur. Kemik dokunun bir kısmı ise, mezenkimal katmanların bir kırkırdak model olmaksızın doğrudan mineralizasyonu ile (intramembranöz ossifikasyon) meydana gelir. Kemiğin mineralize olmamış kısmına osteoid denir.

Kemik tipleri

Lamellar kemik, üzerine etkiyen yük dağılımına göre karmaşık biçimde düzenlenmiş, kortikal veya kansellöz yapıda izlenen, olgun kemik dokusudur. Örgülü (woven) kemik ise, yüksek hücre döngüsü ve içeriğine sahip, daha az organize katmanları ve daha yüksek su içeriği ile lamellar kemikten daha zayıf ve deforme olabilen bir yapıya sahiptir. Bu kemik tipi, embriyolojik iskelet yapısında ve organize lamellar kemiğin ortaya çıkmasından önce kırık iyileşmesi sırasında izlenir. Kemikteki

remodelizasyon ve şekil değişiklikleri, üzerine etkiyen yük ve strese göre meydana gelmektedir (WOLFF YASASI). Histolojik olarak iki çeşit kemik yapısı mevcuttur:

Kortikal (kompakt) kemik: Sıkı bir şekilde organize olmuş Havers sistemlerinden (osteon) meydana gelir. Her bir osteonun içinde, sinir ve damarların yer aldığı bir santral Havers kanalı bulunmaktadır. Kortikal kemikteki yavaş hücre döngüsü, osteoblast ve osteoklastların aktif olduğu osteonun marjinal kısmında meydana gelmektedir.

Kansellöz (trabeküler) kemik: Daha az yoğun yapıda ve daha hızlı bir hücre döngüsüne sahip tiptir. Kansellöz kemik, kortikal kemikten daha esnek bir yapıdadır ve toplam ağırlık olarak tüm iskeletin %20'sini oluşturur.

Hücreler

Kemikte dört tip hücre vardır:

1. Osteoblastlar: Farklılaşmamış mezenkimal veya stromal hücrelerden köken alan, kemik matriksi sentezi ve sekresyonu yapan hücrelerdir. Yapısal olarak fibroblastlara benzerler.

2. Osteositler: Kemik matriksindeki kalsiyum ve fosfat konsantrasyonunu kontrol eden, kemik içerisinde en fazla sayıda bulunan hücrelerdir. Osteositler, matriks içerisinde yer alan osteoblastlardan köken alır ve birbirleriyle kanalikül adı verilen sitoplazmik uzantılarıyla haberleşirler. Kalsitonin tarafından uyarılır ve paratiroid hormon (PTH) tarafından inhibe edilirler.

3. Osteoklastlar: Dolaşımdaki monosit progenitörlerinden köken alan, kemik rezorpsiyonundan sorumlu, çok çekirdekli dev hücrelerdir. PTH, D vitamini, prostaglandinler, tiroid hormonu ve glukokortikoidler tarafından uyarılırken, kalsitonin tarafından inhibe edilirler. Kemik rezorpsiyonu, osteoklastların yüzeyindeki asit fosfataz ve karbonik anhidraz enzimatik aktivitesi ile meydana gelmektedir.

4. Osteoprogenitör hücreler: Havers kanalı ve periost yüzeyinde yer alırlar. Gerekli moleküler uyarılar sonucunda osteoblast ve diğer hücelere farklılaşırlar.

Matriks

Kemiğin hücresel olmayan komponentidir. İki kısımdan oluşur:

1. Organik kısım: Gerilim kuvvetlerine dayanıklılık sağlayan tip I kollajen, kompresyon kuvvetlerine dayanıklılık sağlayan proteoglikanlar, glikoproteinler ve fosfolipidlerden oluşmaktadır. Kollajen, tropokollajenin üçlü heliks formudur ve sentezindeki çapraz bağlanma basamağı, gerilim kuvvetlerine dayanıklılığını artırır. Matriksin %40'ını organik kısım oluşturur ve organik kısmın da %90'ı tip I kollajendir.

2. İnorganik kısım: Kemiğin kompresyon kuvvetlerine dayanıklılığını artıran, mineralize kısımdır. Bunun %70'e yakın bölümü kristalize hidroksiapatit [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], geri kalan %30'u ise amorf kalsiyum fosfat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] yapısındadır.

Periost

Kemiğin etrafını saran, dışta fibröz ve içte kambiyum tabakalarından oluşan özelleşmiş bağ dokusudur. Kambiyum tabakası vasküler ve osteojenik özellikleri ile

kortikal kemik üretiminde rol alır. Dış tabaka ise fibröz yapıdadır ve eklem kapsülleri ile devamlılık gösterir. Periost, kırık iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Kemik oluşumu

Kemik oluşumu çoğunlukla bir kırık modelin mineralizasyonu olan endokondral ossifikasyon ile, daha az oranda da intramembranöz ossifikasyon ile doğrudan meydana gelir.

1. Endokondral ossifikasyon: Kemik oluşumu ve iskelet gelişiminin temel şeklidir. Bu tip kemik oluşumunda, başlangıçta mezenkimal doku yoğunlaşması sonucunda bir kırık model ortaya çıkar. Bu yapının içinde vasküler invazyon ile osteoblastlara farklılaşan osteoprogenitör hücreler primer ossifikasyon merkezinin ortaya çıkmasına yol açarlar. Uzun kemiklerin uçlarında yer alan epifiz ise, sekonder ossifikasyon merkezidir. Bu iki merkezin arasında yer alan yapı, uzun kemik büyümesinin meydana geldiği fizis bölgesi olarak isimlendirilir.

Fizis, kondrosit gelişimi ve dönüşümünün gerçekleştiği üç alandan oluşur.

Rezerv alanı: İstirahattaki hücrelerin gelişimlerinin devamı için gerekli ürünleri depo ettikleri yerdir. Bu alan fizisin, epifize yakın kısmında yer alır.

Proliferatif alan: Hücre proliferasyonu ve matriks oluşumunun gerçekleştiği alandır. Burada yüksek oksijen basıncı ve yüksek proteoglikan konsantrasyonu eşliğinde kondrositler uzunlamasına büyümeye olanak sağlayacak şekilde organize olurlar.

Hipertrofik bölge: Olgunlaşma, dejenerasyon ve geçici kalsifikasyon alanlarından oluşan bu bölgede, hücreler ilk aşamada boyut olarak büyürken kalsiyum içerikleri artar, daha sonra apoptoz eşliğinde mineralizasyonun gerçekleşmesi için, ölü

hücrelerdeki kalsiyum içeriği açığa çıkar. Osteoblastlar bu bölgede aktiftirler. Düşük oksijen basıncı ve düşük proteoglikan konsantrasyonu ile kırıkta  kalsifikasyonu uyarılmaktadır.

2. İ ramembran z ossifikasyon: Kırıkta  bir geçiş yapısı olmadan, doğrudan yeni kemik oluşumudur. Embriyolojik hayatta ve kırık iyileşmesi sırasında izlenir. Ossifikasyonun bu tipinde mezenkimal hücrelerin katman veya membranlar şeklinde toplanması sonrası osteoblast invazyonu ile yeni kemik oluşumu meydana gelir.

2.2. KIRIK İYİLEŞMESİ

İ kelet fonksiyonlarının restorasyonu ve optimal tamir ile sonuçlanan kırık iyileşmesi, karmaşık, organize ve fizyolojik bir olaydır. Vücuttaki diğer dokuların aksine kemikte iyileşme sırasında skar oluşumu izlenmez, mekanik stabilitenin devam ettirilebilmesi için normal kemik dokusu ile iyileşme gerçekleşir. Kırık iyileşmesi sırasında, embriyolojik kemik oluşumunun ana basamakları tekrarlanır. Bu süreçte dört farklı temel kırık iyileşme tipi izlenmektedir: Enkondral ossifikasyon, intramembranöz ossifikasyon, apozisyonel kemik oluşumu ve osteonal migrasyon (creeping substitution). Kırık iyileşmesi sürecinde izlenen olaylar, büyüme kırıkta ındakilerle aynıdır. Aralarındaki fark ise, iyileşme sürecindeki değişikliklerin geçici olması ve remodelizasyon sonucu meydana çıkan lamellar kemik oluşumu ile sona ermesidir.³ İyileşme tipi ne olursa olsun, karşı karşıya gelen iki kırık fragmanının arasında iyileşme olabilmesi için mutlaka var olması gereken iki  ge, vaskülarite ve stabilitedir.⁴

Kırık iyileşmesinde önemli rol oynayan dört ana yapı; kemik iliği, korteks, periost ve çevre yumuşak dokulardır.^{5,6} Bu yapılardan her biri, hasar gören dokudaki büyüme faktörleri, hormonlar, besinler, pH, oksijen basıncı ve mekanik stabilite gibi bir çok faktöre bağlı olarak kırık iyileşmesine değişik boyutlarda katkıda bulunmaktadır. Bahsedilen yapıların biyolojik açıdan kırık iyileşmesinde etkilerini gösterebilmeleri için dört temel öğeye ihtiyaç duyulur:^{7,8} 1) Progenitör hücrelerin kırık bölgesinde kırıkta veya kemiğe farklılaşmalarını sağlayacak moleküler sinyal ve mekanik uyarıları almaları, 2) Progenitör hücrelerin tutunabileceği ve hücre farklılaşmasında kritik role sahip büyüme faktörleri ve sitokinlerin depolanabileceği uygun bir ekstraselüler matriks, 3) Kırık iyileşmesinde moleküler açıdan düzenleyici role sahip büyüme faktörleri, hormonlar ve proteinlerin varlığı, 4) İyileşme için gerekli olan oksijen ve besin ile birlikte progenitör hücrelerin hasarlı bölgeye taşınmasını sağlayacak bir vasküler sistem.

Histolojik açıdan klasik olarak kırık iyileşmesi, primer (doğrudan) ve sekonder (dolaylı) iyileşme olarak iki başlık altında sınıflandırılabilir.

Direkt (primer) kortikal iyileşme

Direkt iyileşme, kırık fragmanlarının anatomik redüksiyonu, rijid internal tesbiti ve azalmış interfragmanter gerilimin sağlandığı koşullarda meydana gelir. Bu tip iyileşmede, mekanik devamlılığın restorasyonu için korteks tarafından anatomik remodelizasyon üniteleri (cutting cones) oluşturulur.⁹ Tünel yapısındaki bu üniteler, yeni Havers sistemlerini oluşturur ve bunların içinde ilerleyen damarların yapısındaki vasküler endotel hücreleri ve perivasküler mezenkimal hücreler de, osteoblastları

oluşturacak osteoprogenitör hücelere kaynak oluşturlar. Bu tip iyileşme sırasında, genellikle kallus oluşumu izlenmez.¹⁰

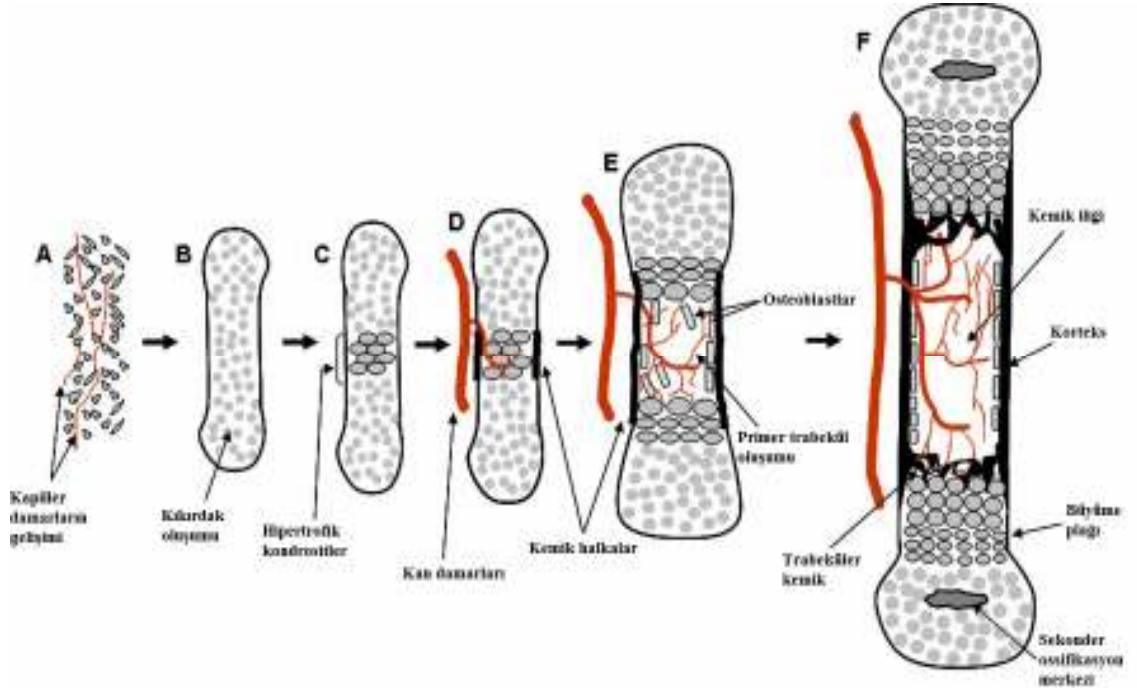
İndirekt (sekonder) iyileşme

Kırıklar çoğunlukla dolaylı(sekonder) iyileşme ile kaynamaktadır. Bu tip iyileşmede, intramembranöz ve endokondral ossifikasyon birlikte izlenmekte ve bunların sonucunda ortaya kallus dokusu çıkmaktadır.¹⁰ Kallus oluşumu, genel olarak kırık hattındaki hareket tarafından uyarılırken, rijid fiksasyon ile inhibe olmaktadır.⁹

Intramembranöz ossifikasyon sırasında, kırık hattına komşu periosttaki farklılaşmamış mezenkimal kök hücelere (MSC) ve uyarılmış osteoprogenitör hücelere, kırık hattındaki oluşumu meydana gelmeden, direkt kemik oluşumunu sağlar. Sonuçta, histolojik olarak “sert kallus” oluşumu izlenir.¹⁰ Bu tip iyileşmede kemik iliğinin kaynamaya katkısı, sadece iyileşmenin erken aşamalarındadır. Bu aşamada, endotel hüceleri polimorfik hücelere dönüşerek osteoblastik bir fenotip sergilemektedir.¹¹

Endokondral ossifikasyon sırasında, farklılaşmamış MSC’ler moleküler uyarılar sayesinde proliferer olur ve farklılaşarak kalsifiye olmalarını takiben kemiğe dönüşürler. Bu tip kırık iyileşmesinde, kırık hattına komşu periost ve yumuşak dokuların etkileri ön plana çıkmaktadır. Bu dokular, erken dönemde ortaya çıkan ve kırık fragmanlarının stabilizasyonunda köprü işlevi gören, histolojik olarak “yumuşak kallus” olarak isimlendirilen iyileşme dokusunun oluşumunda önemli rol oynamaktadır.¹⁰ Bu tip kırık iyileşmesindeki basamaklar, zamana göre altı başlık altında sınıflandırılabilir: A) Hematom oluşumu ve enflamasyon, B) anjiyogenez ve kırık hattındaki oluşumu, C) kırık hattındaki

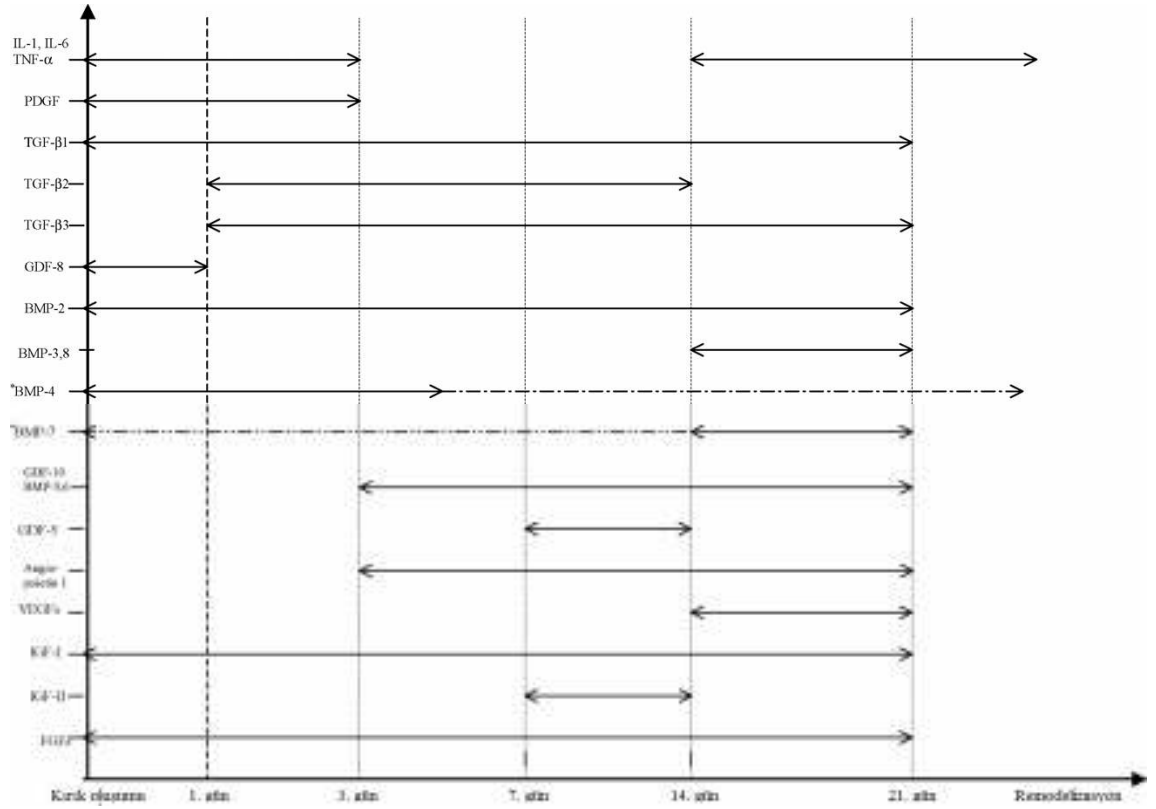
kalsifikasyonu, D) kıkırdak rezorpsiyonu, E) kemik oluşumu, F) kemik remodelizasyonu (Şekil 1).



Şekil 1. Endokondral kemik oluşumu şeması. A) Mezenkimal hücreler yoğun bir şekilde toplanarak (B) kondrositlere farklılaşırlar ve oluşacak kemiğin avasküler kıkırdak modelini meydana getirirler. (C) Orta kısımda yer alan kondrositlerin proliferasyonu sonlanır ve hipertrofiye olmaya başlarlar. (D) Hipertrofik kondrositlerin komşuluğunda yer alan perikondriyal hücreler ostoblastlara dönüşerek bir kemik halka oluştururlar. Bu aşamada, damar oluşumunu uyarıcı etkisi bulunan faktörleri salgılayan ve apoptoza uğrayan hipertrofik kıkırdak dokusu, mineralize matriks oluşumunu düzenler. (E) Osteoblastların ve yeni oluşan damarların ortak etkisi ile primer kemik trabekülleri meydana gelir. Kondrosit proliferasyonunun anjiyogenez eşliğinde devam etmesi sonucu kemiğin uzamasıyla sonuçlanan bir süreç ortaya çıkar. Kemik halkada bulunan osteoblastlar kortikal kemiği oluştururken, primer trabeküllerin yapısındaki osteoblast öncülleri kansellöz kemiği meydana getirir. (F) Kondrosit hipertrofisi, yeni damar oluşumu ve osteoblast etkinliğinden oluşan bir döngü sayesinde kemik uçlarında sekonder ossifikasyon merkezleri meydana gelir.

Bu aşamalardan sadece kırık iyileşmesinde izlenen ve normal kemik oluşumunda yer almayan, “hematom oluşumu ve enflamasyon” aşamasıdır. Vücudun hasarlanmaya verdiği diğer tüm yanıtlarda olduğu gibi bu aşama da, immün bir yanıtın ortaya çıkması ile karakterizedir. Bu süreç içerisinde sitokinler, trombositler, MSC ve Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP) tarafından enflamatuvar bir yanıt oluşturulur.^{12,13} Enflamatuvar hücreler tarafından salgılanan İnterlökin(IL)-1, IL-6 ve Tümör Nekroz Faktörü(TNF)- α 'nın diğer enflamatuvar hücreler üzerinde kemotaktik ve mezenkimal hücreler üzerinde uyarıcı etkisi bulunmaktadır.¹⁴ Kırık sonrası akut dönemde IL-1 ve IL-6'nın maksimum düzeyde ifade edildiği ve kırığın 3. gününden itibaren bu düzeyin sifıra kadar düştüğü gösterilmiştir.¹⁵ Bununla eş zamanlı olarak, trombin ve subendotelyal kollajen tarafından uyarılan trombositler, kırık iyileşmesinin başlatılmasında önemli rol oynadığı bilinen Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü(TGF)- β salgılar.¹⁶ Bu faktörler mezenkimal hücre migrasyonu, aktivasyonu ve proliferasyonu ile birlikte anjiyogenez, akut enflamatuvar hücre kemotaksisi ve trombosit agregasyonunu da uyarmaktadır. Yine aynı zaman diliminde BMPler hem kemik matriksinden salınır, hem de uyarılmış primer mezenkimal hücreler tarafından üretilirler.¹⁷ İlerleyen günlerde MSCler proliferer olur ve kondrojenik veya osteojenik bir hücre tipine farklılaşır.¹⁸ Bu erken aşamada, rejenerasyon yolağının devamı için gerekli olan anjiyogenez de gerçekleşir. Oluşan kallus içerisine vasküler yapıların gelişimi, Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve Anjiyopoetin 1 ve 2 tarafından regüle edilir.^{7,19} Anjiyopoetin 1'in kırık iyileşmesinin ilk fazında aktif olduğu, VEGF'nin ise bunun

ardından, kırık ve kemik oluşumu safhalarında da uyarıldığı gösterilmiştir.⁷ Kırık iyileşmesinde rol oynayan çeşitli faktör ve moleküllerin etkin oldukları zaman aralıkları Grafik 1’de özetlenmiştir.



Grafik 1. Kırık iyileşmesinde rol oynayan sinyal moleküllerinin etkilerinin zamana göre dağılımı. (kesikli çizgiler, çeşitli kaynaklar arasındaki görüş ayrılığını ifade etmektedir)

Kırık iyileşmesinin sonraki aşamalarında ise, anjiyogenezi takiben endokondral ve intramembranöz ossifikasyon süreçleri devam etmektedir. Kırıkta dejenerasyonu ile karakterize matriks kalsifikasyonu ve örgülü kemik oluşumu, remodelizasyon sürecine girildiğinin biyolojik göstergeleridir. Aylar ve bazen de yıllar sürebilen bu süreçte

örgülü kemik, lamellar kemiğe dönüşmekte ve kemik, travma öncesi morfolojisi ve mekanik kuvvetini yeniden kazanmaktadır.

Sonuç olarak, kırık iyileşmesi, kemiklerin fonksiyonel yapısının restorasyonunu sağlayan, özelleşmiş bir biyolojik süreçtir. Bu karmaşık olaylar zinciri sayesinde kemik, vücudun diğer dokularında bulunmayan bir şekilde orijinal haline dönerek gerekli kas-iskelet fonksiyonlarının devamını sağlar.

2.3. GREFTLER ile KIRIK İYİLEŞMESİNİN UYARILMASI

Ortopedik cerrahide, başta travma olmak üzere osteomyelit, konjenital anomaliler ve malignitelerin tedavisi sırasında karşılaşılan kemik defektleri ciddi sorunlar yaratır. Bu defektlerin tedavisinde farklı fiksasyon yöntemlerine ek olarak yeni kemik oluşumunu uyarmak için çeşitli tedavi metodlarına başvurulmaktadır. Bunlardan en sık tercih edileni, kemik oluşumunu çeşitli etki mekanizmalarıyla uyaran ve defekt tedavisinde kemik yerine boşluk doldurmak için kullanılan greftlerdir. Greftlerin kemik iyileşmesine katkıları üç değişik mekanizma ile oluşmaktadır (Tablo 1):

Osteojenite : Yeni kemik oluşturabilme kapasitesidir. Osteoblast ve osteoblasta dönüşme potansiyeli bulunan hücreler osteojeniktir ve bu hücreleri içeren greftler de osteojenik özellik taşımaktadır.

Osteoindüktivite : Kök hücrelerin uyarılarak olgun osteoblast ve osteosite farklılaşmalarını sağlama kapasitesidir. Kemik oluşumu için gerekli koşullardan biridir.

Osteokondüktivite : Canlı kemik dokunun üzerinde büyüüp gelişebileceği bir mekanik temel oluşturma kapasitesidir. Osteokondüktif maddelerin belirli özelliklerinin (örn. por büyüklüğü) osteoindüktivite üzerinde de önemli rol oynadığı bilinmektedir.

Greftler, sahip oldukları yukarıdaki ana etki mekanizmalarına göre üç alt başlık altında incelenecektir.

1. Osteojenik greftler
2. Osteoindüktif greftler
3. Osteokondüktif greftler

Tablo 1. Greft materyallerinin özellikleri.

Grup	Greft	Osteokondüktif	Osteoindüktif	Osteojenik	Avantajları
Kemik	Otogreft	+++	++	++	Altın standart, çeşitli
	Allogreft	+++	+/-	-	şekillerde kullanılabilir
Biyomateryal	DBM	+	++	-	BMP içerir
	Kollajen	++	-	-	Taşıyıcı görevi yapabilir
Seramik	Hidroksiapatit	+	-	-	Biyouyumlu ve yapısal
	Trikalsiyum fosfat	+	-	-	destek sağlar
Faktör	BMP	-	+++	-	Kaynak sınırsızdır

2.3.1. OSTEOJENİK GREFTLER

Otojen greftler osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerin hepsini bünyesinde barındıran tek greft seçeneği olarak, günümüzde füzyon, kaynamama ve segmenter defektlerin tedavisinde altın standarttır.²⁰⁻²⁵ Buna ek olarak trikortikal greftlerin, ameliyatta implantlar ile oluşturulan yapının erken dönemde mekanik kuvvetine destek sağlama gibi bir avantajı da vardır. Bu sayılan özellikleri ile otojen greftler, allojen ve sentetik greftlerden üstündür.

Kapsadıkları osteojenik öncül hücreler ve osteoblastlar ile yeni kemik oluşumunu uyarırken, immünolojik uyumluluk ve hücre dejenerasyonu gibi sorunlar ortaya çıkmamaktadır. Osteonekroz, nadir de olsa rastlanan bir komplikasyon olup, cerrahi teknik ve greft hazırlama aşamalarındaki dikkatli uygulama ile bunun en aza indirgenebileceği belirtilmiştir.²⁶

Farklı otojen greftlerin kendilerine has avantajları bulunmaktadır. Yapısal anatomisi gereği kortikal greftlerin daha üstün mekanik özellikleri varken, kansellöz greftlerin daha fazla ve çeşitli hücre içeriği ve metabolik aktivitesi bulunur. Kansellöz kemiğin kortikal kemiğe göre metabolik açıdan sekiz kat daha aktif olduğu ve kortikal kemiğin ise kansellöz kemiğe göre dört kat daha yoğun yapıda olduğu gösterilmiştir.²⁷

Kansellöz greftin trabeküler yapısı, kolay revaskülarizasyon ve hızlı greft inkorporasyonuna olanak sağlar. Uygulama sonrası mekanik kuvvetinin olmaması ve nekrotik zeminde yeni kemik oluşması ile meydana çıkan zayıflık gibi dezavantajlarına karşın, üstün biyolojik kapasitesi ile greft inkorporasyonunu takiben aylar içerisinde sağlam bir kemik yapı oluşmasına olanak tanır.^{20,28,29} MSCler tarafından kemik iliği boşluklarının infiltrasyonu ile karakterize greft vaskülarizasyonu implantasyon sonrası ilk iki günde başlar ve osteointegrasyonun bu ilk aşamasını, dört hafta sonra izlenen nekrotik kemik rezorpsiyonu ve aktif kemik oluşumu ile birlikte greft remodelizasyonu izler.²⁹ Histolojik olarak bu aşamada trabeküler yapıların üzerinde osteoblastların osteoid depozitleri biriktirdiği izlenebilir.²⁹ Bunu takip eden remodelizasyon süreci ise aylar sürmektedir.³⁰

Kortikal kemik greftleri, kansellöz greftlere göre daha az miktarda osteoblast, osteosit ve büyüme faktörü ihtiva ederler. Ancak, başlangıçta kemik fiksasyonuna sağladıkları mekanik stabilite önemli bir avantajdır. Kortikal greft uygulamalarında, yoğun korteks yapısının rezorpsiyonu ile karakterize osteoklastik aktivite ve kemik kaybı, greftleme girişiminden 2 hafta sonra ortaya çıkar.³⁰ Bunun sonucu olarak da greftin sağladığı mekanik güçte %75'e ulaşan oranlarda kayıp izlenir.³¹ Buna ek olarak, kortikal greftlerin revaskülarizasyon ve remodelizasyon süreçleri de daha uzun sürmektedir. Vasküler penetrasyon oluşmasını zorlaştıran düşük yüzey alanına sahip yapısı nedeniyle kortikal greftlerde revaskülarizasyonun ortaya çıkması yaklaşık 2 ayı bulur.³² Greft inkorporasyonunun yeni kemik oluşumu ile başladığı kansellöz greftlerin aksine, kortikal greftlerde öncelikle osteoklastlar, yoğun yapıdaki korteksleri rezorbe etmelidir. Köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada kortikal greftlerin 6 hafta sonrasında mekanik gücünün azaldığı ve 24. haftaya kadar düşük seviyelerde kaldığı, 48. haftada ise normal seviyelere döndüğü gösterilmiştir.³²

Osteojenik greftlere diğer bir örnek ise, minimal invazif tekniklerle elde edilebilen otojen kemik iliğidir. Başlangıçta yoğun ilgi gören kırık hattına kemik iliği enjeksiyonu uygulamasının, pratikte bazı sorunlara yol açtığı izlenmiştir. Bunlardan ilki, kemik iliği aspiratındaki farklılaşmamış kök hücrelerin düşünüldüğü kadar yüksek sayıda olmamasıdır. Genç erişkinlerde kök hücre sayısı her 50.000 hücre başına 1 iken, yaşlılarda 1.000.000 hücrede 1 olarak hesaplanmıştır.²⁹ Diğer bir sorun ise, kemik iliği aspiratının enjekte edildiği yerden komşu dokulara dağılmasıdır, bu da artmış heterotopik ossifikasyona neden olmaktadır. Bu nedenlerle otojen kemik iliği aspiratı

tek başına bir tedavi seçeneği olarak tercih edilmemekte, ancak bazı klinik durumlarda diğer girişimlere ek olarak kullanılmaktadır.

2.3.2. OSTEOİNDÜKTİF GREFTLER

Osteoindüksiyon, greft içerisinde bulunan çeşitli büyüme faktörlerinin, kök hücrelerin olgun osteoblast ve osteositlere farklılaşmasını uyarmasıdır. Günümüz klinik uygulamalarında bu faktörler üç şekilde karşımıza çıkmaktadır:

1) Otojen greftlerde büyüme faktörleri doğal olarak yeterli miktarlarda bulunmaktadır.

2) Demineralize kemik matriksi (DBM), kemiğin, kalsiyum hidroksiapatit tuzlarından arındırılmış, glikoprotein ve protein yapısındaki moleküllerden oluşan formudur. Düşük miktarlardaki kollajen içeriği ile minimal bir osteokondüktif etkiye sahip olsa da, DBM'nin yeni kemik oluşumuna ana katkısı içerdiği çeşitli büyüme faktörleri sayesinde sahip olduğu osteoindüktif özelliştir.³³⁻³⁵ DBM, günümüzde çeşitli klinik durumlarda yeni kemik oluşumunu uyarmak amacıyla kullanılan ticari bir greft materyalidir.

3) Kemik morfojenik proteini(BMP)-2'nin osteoporotik hastalarda lomber füzyon amacıyla^{36,37} ve BMP-7(OP1)'nin açık tibia kırıklarında ve kaynamamada^{38,39} kullanılmak üzere sınırlı klinik kullanıma girmiş ticari formları bulunmaktadır.

Büyüme faktörlerinin kendi başlarına kemik iyileşmesi üzerine olan etkileri tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu konuda moleküler düzeyde yapılan çok sayıdaki

Çalışma, bu faktörlerin yeni kemik oluşumu üzerine farklı şekillerde uyarıcı etkileri bulunduğunu göstermiştir. Bahsedilen faktörler dört başlık altında incelenebilir:

I. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta ailesi

Kemik Morfojenik Proteinleri

Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta

II. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

III. Fibroblast Büyüme Faktörü

IV. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri

I. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β) ailesi

TGF- β ailesi, kemik morfojenik proteinleri(BMP), dönüştürücü büyüme faktörü-beta(TGF- β), büyüme farklılaşma faktörleri(GDF), Mullerian inhibitör madde, aktivinler ve inhibitörleri içeren büyük bir biyolojik moleküler topluluktur. İnsan genomunda bu grupta şimdiye kadar en az 34 üyenin olduğu tesbit edilmiştir.⁴⁰

Bu grubun üyeleri yüksek moleküler ağırlıklı öncüllerden sentez edilip proteolitik enzimler tarafından aktive edilirler.⁴¹ Etkilerini, hedef hücre zarı üzerindeki serin/treonin kinaz reseptörleri üzerinden gösterirler.⁴² Bu ligand-reseptör etkileşimi, sonuçta hücre çekirdeğinde gen ifadenmesine yol açan bir hücre içi sinyal yolağını aktive eder. BMP-1 ve -8, GDF-1, -5, -8, -10, TGF- β 1, - β 2 ve - β 3, intramembranöz ve endokondral ossifikasyonun farklı evrelerinde kırık iyileşmesini uyararak, TGF- β ailesinin klinik öneme sahip üyeleridir.⁴³

Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)

BMP ailesi üyeleri, primer amino asit dizilimlerine göre dört alt gruba ayrılır. Buna göre BMP-2 ve BMP-4 birinci grupta, BMP-5, BMP-6 ve BMP-7 ikinci grupta, GDF-5(BMP-14), GDF-6(BMP-13) ve GDF-7(BMP-12) üçüncü grupta ve BMP-3(osteogenin) ve GDF-10(BMP3b) dördüncü grupta yer almaktadır.⁴⁴ BMPlar, etkilerini tip-I reseptörleri transfosforile eden tip-II serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlanarak gösterirler.^{45,46} Bu yolla hücre çekirdeği içindeki hedef gen transkripsiyonunu düzenleyen BMPlar, osteoblast, kondroblast, nöron ve epitel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinin büyüme, farklılaşma ve apoptoz aşamalarında kritik rol oynar.⁴⁴ Buna ek olarak BMP-4/BMP-7 ve BMP-2/BMP-7 gibi heterodimerlerin, mezenkimal hücrelerin proliferasyonu ve osteoblastlara farklılaşması aşamalarında artmış osteoindüktif etkiye sahip olduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir.⁴⁷

BMPlerin ana kaynağı, osteoprogenitör hücreler, mezenkimal hücreler, osteoblastlar ve kondroblastlar tarafından üretilen ekstraselüler matrikstir. BMPlar, kondro-osteogenez için gerekli ardışık olaylardan oluşan bir biyolojik yolağı başlatırlar. Bu yolakta kemotaksis, mezenkimal ve osteoprogenitör hücre proliferasyonu ve farklılaşması, anjiyogenez ve kontrollü ekstraselüler matriks sentezi yer alır.^{44,48} Düzenleyici etkileri ise, hedef hücre tipi, hücrenin farklılaşma basamağı, ligandın lokal konsantrasyonu ve çevredeki diğer faktörlerle etkileşimi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.⁴⁹

BMP ailesi üyeleri yapısal ve fonksiyonel olarak büyük benzerlikler göstermekle birlikte, fare ve sıçanlar ile yapılan çalışmalarda herbirinin kırık iyileşmesi sürecindeki ifadenmesi ve üstlendiği görevin farklı olduğu gösterilmiştir.^{17,43,50}

Bunlardan en önemlisi BMP-2'dir. Kırık iyileşmesinin ilk üç haftasında en yüksek düzeylerde izlenen bu molekül, mezenkimal hücrelerin uyarılması, kondrogenez, diğer BMPlerin ifadenmesinin düzenlenmesi ve MSClerin osteoblast yönünde farklılaşması (BMP-6 ve BMP-9 ile birlikte en etkili molekül) gibi önemli rollere sahiptir.⁵⁰ BMP-4'ün de 6. saat – 5. gün arası kallus oluşumunu ve 2 ila 3. haftalar arasında in vitro koşullarda BMP-3 ile birlikte insan kaynaklı monositlerin migrasyonunu uyardığı gösterilmiştir.⁴³ BMP-7 ise, kırık iyileşmesinin 2 ila 3. haftarı arası her iki tip kemik oluşumunda da etkisini göstermekte ve olgun osteoblastların in vitro uyarılmasını sağlamaktadır. Buna benzer olarak GDF-10, BMP-5 ve BMP-6 da 3. gün – 3. hafta arasında her iki tip kemik oluşumunda düzenleyici etkiye sahiptir. Bunların içinden BMP-6'nın ayrıca kondrosit olgunlaşmasını uyardığı öne sürülmüştür. Son olarak GDF-1 ve GDF-5'in 1. ve 2. haftalar arasında mezenkimal agregasyon ile birlikte matriks proteinlerinin yıkımı ve endotelial hücre kemotaksisi yolları ile anjiyogenezi uyardığı bildirilmiştir.⁵⁰ Cheng ve ark. tarafından yapılan analizde 14 tip BMP, osteojenik potansiyelleri açısından deneysel bir modelde incelenmiştir.⁵¹ Buna göre BMP-2, BMP-6 ve BMP-9, MSClerin osteoblast yönünde farklılaşmasını uyaran en güçlü moleküller olarak modelin en başında yer alırken, BMP-3 ve BMP-13 dışındaki diğer BMPlerin osteoblastik öncü hücrelerin ve osteoblastların terminal farklılaşmasını uyarabilecek potansiyele sahip olduğu öne sürülmüştür.

BMPlerin ayrıca kemik oluşumu ve anjiyogenez ile yakından ilişkili olan İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü'nün sentez ve sekresyonunu uyarıcı etkileri olabileceği⁵² ve anjiyogenezle sonuçlanan endotelial hücre

aktivasyonu ile kemik oluşumu üzerinde doğrudan olumlu etkilerinin bulunabileceği bildirilmiştir.^{53,54} Deneysel çalışmalarda BMP-2 ve BMP-7'nin kritik boyutlu defektlerde, kırıklarda ve spinal füzyonda kemik oluşumunu artırdığı gösterilmiştir.^{37,38} Benzer şekilde, tibia kırığı/kaynamaması olan bir grup hasta üzerinde yapılmış bir klinik çalışmada ise BMP-7 uygulamasının otojen greft uygulamasına eşit sonuçlar sağladığı bildirilmiştir.³⁹ Aralarında en önemlisi bir BMP-2 reseptör blokörü olan Noggin'in de yer aldığı BMP antagonistleri ile yapılan deneysel çalışmalarda da BMP'nin kırık iyileşmesindeki önemli rolü gösterilmiştir.^{55,56} Günümüzde, bahsedilen çalışmaların ışığında BMP-2'nin osteoporotik hastalarda lomber füzyon amacıyla ve BMP-7'nin açık tibia kırıklarında ve kaynamamada kullanılmak üzere sınırlı klinik kullanıma girmiş ticari formları bulunmaktadır.

Dönüştürücü Büyüme Faktörü – Beta (TGF- β)

Beş izoformu bulunan bu grubun üyelerinin kemik iyileşmesinin enflamatuvar fazının başlangıcında trombositlerden salınmaları nedeniyle kallus oluşumunun başlangıç safhasında rol oynadıkları düşünülmektedir.^{16,17} Bununla birlikte TGF- β , osteoblast ve kondrositlerce de üretilerek kemik matrikste depolanır.¹⁹ Etkilerini BMP'ye benzer şekilde tip-I ve tip-II serin/treonin kinaz reseptörleri üzerinden gösterir.⁵⁷

TGF- β mezenkimal hücreler üzerine kuvvetli bir kemotaktik etkiye sahiptir ve MSC, preosteoblast, kondrosit ve osteoblast proliferasyonunu uyarır.¹⁹ Buna ek olarak kollajen, proteoglikanlar, osteopontin, osteonektin ve alkalen fosfataz gibi hücre dışı

proteinlerin üretimini de uyarır.⁵⁸ Ana rolünün kondrogeniz ve endokondral kemik oluşumu aşamalarında olduğu düşünülmektedir.⁵⁹ TGF- β 'nın ayrıca, osteoprogenitör hücreleri uyarak BMP sentezini başlattığı,¹⁷ osteoklastik aktivasyonu inhibe ettiği ve osteoklast apoptozunu artırdığı bildirilmiştir.⁶⁰ Deneysel çalışmalarda, kondrogeniz aşamasında en yüksek değerlerine ulaşan TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün, TGF- β 1'e göre kırık iyileşmesinde daha önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Bunu destekleyen diğer bir bulgu da TGF- β 1'in sağlıklı diyafizer kemikte yüksek bazal düzeylerde sentezlenmesi ve kırık iyileşmesi sürecinde bu seviyenin sabit kalmasıdır.¹⁵ Çeşitli çalışmalarda TGF- β 'nın hücresele proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir. Ancak, osteoindüktif potansiyeli sınırlıdır ve yan etki profili de klinik kullanımını daha da sınırlamaktadır.¹⁹

II. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

A ve B zincirlerinden oluşan homo veya heterodimerik bir polipeptid olan PDGF, etkilerini tirozin kinaz aktivitesi olan reseptörler aracılığıyla gösterir. IL-1, TNF- α ve TGF- β , PDGF'nin reseptöre bağlanmasını etkiler.⁴¹ PDGF, trombosit, monosit, makrofaj, endotel hücreleri ve osteoblastlar tarafından sentezlenen ve mezenkimal kökenli hücrelere güçlü mitojenik etkisi olan bir moleküldür.⁶¹ Kırık iyileşmesinin erken safhalarında trombositlerce salınan PDGF'nin enflamatuar hücreler üzerinde önemli kemotaktik, MSC ve osteoblastlar üzerinde ise kuvvetli proliferatif etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır.¹⁹ Nash ve ark. bir tavşan modelinde PDGF ile tedavi edilmiş tibial osteotomilerde kallus yoğunluğu ve hacminde artış olduğunu göstermiştir.⁶² Günümüzde, bu konuda yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen yüz güldürücü sonuçlar sınırlı olduğu için PDGF'nin tedavi potansiyeli tartışmalıdır.

III. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF ailesinde yapısal olarak birbirine benzeyen dokuz adet polipeptid bulunmaktadır. Asidik ve bazik FGFlar, normal erişkin dokuda en yüksek miktarda bulunan molekül tipleridir.⁶³ FGFlar etkilerini tirozin kinaz reseptörü etkileşimi ile gösterirler.⁶⁴ Kemik iyileşmesi sırasında monosit, makrofaj, mezenkimal hücreler, osteoblast ve kondrositler tarafından salınan FGFlar, fibroblast, miyosit, osteoblast ve kondrosit gibi çeşitli hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını uyarırlar. Kırık iyileşmesinin erken evrelerinde dokudaki düzeyleri yükselir ve anjiyogenez ile birlikte mezenkimal hücre çoğalmasında önemli rol oynarlar. α -FGF temel olarak kondrosit proliferasyonunu etkileyerek kondrosit olgunlaşmasını uyarırken, β -FGF osteoblastlar tarafından üretilir ve α analogundan daha etkili olduğu kanıtlanmıştır.¹⁹ Köpekler üzerinde oluşturulan bir tibial osteotomi modelinde FGF-2'nin osteotomi hattına tek enjeksiyonluk uygulamasının kallus boyutunu erken dönemde artırdığı gösterilmiştir.⁶⁵

IV. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF)

IGF-I(Somatomedin-C) ve IGF-II(İskelet Büyüme Faktörü) kaynakları kemik matriksi, endotel hücreleri, osteoblast ve kondrositlerdir. IGF-I serum konsantrasyonları genel olarak Büyüme Hormonu tarafından düzenlenir.^{19,41} IGF'lerin biyolojik davranışları hücreye özelleşmiş bir şekilde, IGF bağlayıcı proteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir.⁶⁶ IGF-I, farklılaşmış osteoblastlar tarafından kemik matriksi sentezini artırarak kemik iyileşmesini olumlu yönde etkiler⁶⁷ ve IGF-II'den daha kuvvetli bir etkiye sahiptir.¹⁹ IGF-II ise etkisini, endokondral kemik oluşumunun daha

sonraki bir aşamasında tip I kollajen üretimi, kırıldak matriks sentezi ve hücrel proliferasyonu uyararak gösterir.⁶⁸ Literatürde IGF'nin kemik iyileşmesi üzerine olan etkileri konusunda yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar bildirilmiş⁵⁹ ve bu konudaki etkinliğinin anlaşılabilmesi için de daha ileri düzeyde çalışmalar gerekmektedir.

2.3.3. OSTEOKONDÜKTİF GREFTLER

Canlı kemik dokunun üzerinde gelişebileceği bir mekanik temel ve yeni oluşan kemiğin içerisini doldurabileceği bir iskelet görevi görebilen materyaller osteokondüktif greftlerdir. Bu grupta allogreftler, kollajen, sentetik polimerler, silikon temelli bileşikler ve seramikler yer almaktadır.

Allogreftler

Allogreftler, kadavra veya total kalça artroplastisi uygulanan donörlerden elde edilen ve otojen greftlere alternatif olarak kullanılan kemik greftlerdir. Enfeksiyöz ve immünojenik potansiyellerini en aza indirmek için bir dizi işlemde geçerler ve bunun sonucu olarak da canlı hücre ihtiva etmedikleri için osteojenik özellik taşımazlar. Defektif dokuya doğal ve iyi kalitede bir kemik desteği sağlasalar da, bakteriyel ve viral hastalık geçişi için risk oluşturmaktadırlar.⁶⁹ Osteoartiküler masif allogreftler, eklemi ilgilendiren tümörlerin tedavisi, yapısal allogreftler ise total kalça artroplastisi revizyonunda segmenter defektlerin tedavisinde tercih edilen allogreftlerdir. Bu iki kortikal allogrefte ek olarak klinik kullanımı en yaygın olan allogreft tipi kansellöz

ipslerdir(yonga). Genellikle 0,5 ila 1 cm³ hacminde hazırlanan ticari formlardaki ipsler, farklı boyutlardaki kemik defektlerin doldurulmasında kullanılmaktadır.

Kollajen

Doğal matriksler yüksek biyoyumlulukları sayesinde greft olarak büyük bir avantaja sahiptirler. Ekstraselüler matrikste bol miktarda bulunan kollajen, bu alanda yaygın olarak kullanılan materyallerin başında gelir. Tip I kollajen, fazla miktarlarda bulunması, elde edilmesinin kolay oluşu, biyoyumluluğu, yapısındaki telopeptidlerin uzaklaştırılmasıyla antijenitesinin en aza indirgenmesi, yapışkanlığı, fibröz dokusu sayesinde kırılgnlık özelliğinin bulunmaması, suture edilebilmesi, sahip olduğu yüksek porozite ile yeni doku oluşumunu desteklemesi, yeni oluşan doku matriksine yapısındaki liflerin inkorpore olabilmesi ve diğler materyallerle kombine edilebilmesi gibi avantajları ile klinik uygulamada en yaygın kullanım alanı bulmuş kollajendir.⁷⁰ Tip I kollajen, doğal yapısında veya denature hali olan jelatin formunda kullanılabilir. Doğal kollajenin iki farklı fiziksel formu vardır. Bunlar, sıvı içeriğı artarak hacim kazanmış hidrojel ve seyrek liflerin organizasyonu ile oluşan kafes şeklindeki yapılardır. Kollajen lifleri farklı metodlarla çapraz bağlanabilmektedir. Bunlardan biri olan dehidrasyon, su içeriğı toplam ağırlığın %1'inin altına düştüğünde meydana gelmekte ve kollajen zincirleri arasında peptid bağların oluşması ile sonuçlanmaktadır. Diğler metod olan gluteraldehid ise, tip I kollajen ve kondroitin-6-sulfat polimerleri oluşturulmasında tercih edilmektedir. Bu işlemler sonucu oluşan kollajenin yapısındaki porozite ve por çapları, ihtiyaca göre şekillendirilebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda kollajen genellikle diğer osteoindüktif, osteokondüktif ve osteojenik faktörlerin taşınması görevini üstlenmiş ve başarılı sonuçlar bildirilmiştir.³³ Kollajen tek başına kullanıldığında sahip olduğu görece düşük yapısal özellikleri ile zayıf bir greft materyali izlenimi vermektedir. Buna karşın, BMP, MSC veya hidroksiapatitle birlikte kullanıldığında greft inkorporasyonunu artırdığı kanıtlanmıştır.^{71,72} Bu bilgiler ışığında kollajen, klinik uygulamalarda diğer greft materyalleri (kemik iliği, bifazik HA/TCP) ile birlikte değişik şekillerde (jel, granül) kullanılmaktadır ve kollajenin tedavi etkinliği hakkında yapılan deneysel araştırmalar devam etmektedir.

Sentetik polimerler

Polimetilmetakrilat(PMMA), bu grupta en sık kullanılan polimer çimentosu olup uzun yıllardır kemik defektlerin doldurulmasında ve kompleks kırıkların rekonstrüksiyonunda kullanılmaktadır. PMMA, uygulanma kolaylığı (kolay şekil alma, çabuk sertleşme) ve üstün mekanik özelliklere sahip olsa da, PMMA parçalarına karşı vücutta dev hücreler aracılığıyla osteolitik yabancı cisim reaksiyonu gelişmekte ve reabzorbsiyon olmamaktadır.⁷³ Bu nedenle de mevcut defektin içinde yeni kemik oluşumu izlenmemektedir. Polimer çimentoların bu dezavantajına ek olarak, yeni kemik oluşumu ve normal kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri olabileceği öne sürülmüştür.

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı parsiyel rezorbe olabilen yeni nesil polimerler bu alanda kullanıma girmiştir. Poliglikolid (PGA) ve Poli-L-Laktid (PLLA)

bu grupta yer alan en önemli polimerlerdir ve vücut içinde yıkıma uğradıkları bölgelerde yeni kemik oluşumuna izin vermeleri en önemli avantajlarıdır.^{73,74} Bu polimerler klinik uygulamada vida, dübel(anchor), raptiye(tac) ve boşluk doldurucu(spacer) olarak kırık fiksasyonu, artroplasti revizyonu ve bağ rekonstrüksiyonu ameliyatlarında yerlerini almıştır. Son zamanlarda ortaya çıkan en önemli kullanım alanları ise, osteojenik hücreler, osteoindüktif büyüme faktörleri ve sentetik osteokondüktif matriksten oluşan kompozit greftlerdir. Deneysel ve klinik çalışmalarda her üç özelliği de taşıyabilecek potansiyele sahip ve otogreftlere alternatif olabilecek kompozit greft bileşenleri araştırılmaktadır. Bunlara örnek olarak kemik iliği/sentetik polimerler, β -TCP/kemik iliği, BMP/PGA ve kemik iliği/BMP/PGA sayılabilir.

Silikon temelli bileşikler

Bu gruptaki maddeler, biyoaktif camlar ve cam iyonomerleri olarak iki başlık altında incelenebilir.

I. Biyoaktif camlar

Biyoaktif camlar, sert, katı, poroziteye sahip olmayan, kalsiyum, fosfor ve silikon dioksit (silikat) moleküllerinin birleşiminden oluşan maddelerdir. İçeriğindeki sodyum dioksit, kalsiyum oksit ve silikon dioksit oranları değiştirilerek maddeye çözünebilir bir formdan rezorbe olmayan bir forma kadar ihtiyaç doğrultusunda farklı fiziksel özellikler verilebilir. İyileşme sırasında, osteointegrasyon ve osteokondüksiyon özelliklerine sahip olan biyoaktif cam ile kemik arasında, yapısındaki doğala benzeyen hidroksiapatit kristalleri sayesinde kuvvetli mekanik bağlar kurulmaktadır.⁷⁵ Seramik-

hidroksiapatit gibi kalsiyum fosfat bileşiklerinden çok daha üstün mekanik özelliklere sahip biyoaktif camın en önemli dezavantajı, uygulama sırasında delinme ve şekillendirilmeye direnç göstermesidir. Bunlar denenirken materyal kırılabilir. Bu nedenle kemiğe fiksasyonu zor olmaktadır, ancak kemik grefti genişleticisi olarak klinikte yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.^{76,77}

II. Cam iyonomerleri

Cam iyonomer çimentoları ilk olarak dişçilik alanında kullanılmıştır. Kalsiyum / alüminyum / florosilikat cam tozundan oluşan iyonomer çimento, polikarboksilik asit ile karıştırılarak poröz yapıda bir çimento hamuru elde edilir. Bu hamur kıvamındaki çimento 5 dk. içinde sertleşir ve bu süreden sonra suda çözünme özelliğini kaybeder. 24 saat sonra ise kortikal kemiğe benzer oranlarda kompresif kuvvet ve elastik modulusa ulaşır. Biyoaktif camlara benzer şekilde osteointegrasyon özelliği ve biyouyumlu olan cam iyonomerinin poröz yapısı da osteokondüksiyona yardımcı olarak kemiğin cam içinde gelişmesine katkı sağlamaktadır.

Cam iyonomerlerinin en büyük dezavantajı biyobozunur olmamaları ve yeni oluşan kemikle yer değiştirmemeleridir. Egzotermik reaksiyon oluşturmada polimerize olmaları ise önemli bir avantaj olup bu nedenle PMMA yerine klinik kullanımları deneme aşamasındadır.⁷⁸ Cam iyonomerleri, yavaş ve kontrollü bir şekilde salınım elde etmek üzere antibiyotik ve yüksek molekül ağırlıklı proteinler ile yüklenebilirler.⁷⁹ PMMA ile karşılaştırıldığında, proteinleri daha etkili bir biçimde salmaları ve ısıya duyarlı proteinlere zarar vermemeleri ise diğer üstünlükleri olarak sayılabilir.

Seramikler

Osteokondüktif özellikleri nedeniyle sentetik kemik grefti olarak kullanılan seramikler, uygulama sonrası oluşturdıkları kimyasal doku yanıtı açısından üç ana başlık altında sınıflandırılabilirler: Biyobozunur seramikler, biyoaktif seramikler ve biyoinert seramikler. Biyobozunur ve biyoaktif maddeler implantasyonu takiben dokuyla doğrudan fiziksel bağlar kurabilme özelliğine sahipken, biyoinert özelliktekiler kemik ile aralarında gerçek bağlar kurmazlar.

I. Biyobozunur seramikler

Kemik transplantasyonunda kullanılan ilk sentetik maddeler olmaları nedeniyle haklarında en fazla klinik tecrübeye sahip olunan gruptur. Bu gruptaki maddelerin doku içinde reabsorpsiyonunu takiben yeni kemik oluşumu meydana gelir. Sentetik greftin rezorpsiyon hızı ve oranını ise büyük ölçüde kimyasal yapısı belirler. Örneğin; Trikalsiyum Fosfat (TCP), Hidroksiapatit(HA)'den ortalama 10 ila 20 kat daha süratli rezorbe olmaktadır.⁸⁰ Buna ek olarak kristalin yapısı da rezorpsiyon miktarını etkileyen faktörlerden biridir. Bazı klinik çalışmalarda TCP'nin tamamen rezorbe olduğu veya HA'ya dönüştüğü ve vücut içinde bu şekilde kaldığı belirtilirken HA'nın uygulandığı kemiğin içinde rezorbe olmadığı, bunun da kallus oluşumu sırasında meydana gelen kemiğin intrinsik kuvvetini olumsuz yönde etkilediği öne sürülmüştür. Seramiklerin kırık iyileşmesine etkisinde diğer önemli bir faktör de porozitedir. Seramiklerin osteokondüktif özelliklerini en fazla sergilediği por boyutlarının 150 ila 500 mikrometre arasında olduğu gösterilmiştir.⁸¹ Greft uygulanırken akılda bulundurulması gereken

önemli bir nokta, TCP örneğinde olduğu gibi porozite artışı ile birlikte greftin kompresif kuvvetinin azalmasıdır. Mercan gibi maddelerden elde edilen seramikler bu duruma istisna teşkil eder çünkü, yapılarındaki porların arasında birleştirici bir biyolojik ağ bulunmakta ve bu yapı materyalin kuvvetini artırmaktadır. Bu örnekten de anlaşılabilceği üzere, seramiklerin yapısı ve mimarisinin rezorpsiyon hızları üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır.

Alçının ısıtılması ile edilen bir biyobozunur kalsiyum sülfat hemihidratı (CaO_4S) olan Paris alçısı, greft materyali olarak kullanılan ilk seramik olup, Dreesmann tarafından 1894 yılında kullanılmıştır.⁸² Kemik içi döngüsü çok süratlidir ve implantasyonu takiben haftalar içinde büyük kısmı rezorbe olur. Osteogenezi inhibe etmediği ve enfekte kavitelere uygulandığında enfeksiyonu ağırlaştırmadığı öne sürülmüştür. Ucuz olması, kolayca hazırlanıp sterilize edilebilmesi ve raf ömrünün uzun olması sahip olduğu diğer avantajlardır.⁸³ Ancak, yapısal kuvvetinin düşük olması ve dokuya destek sağlamamasından dolayı kullanımı, kürete edilen kemik kistleri gibi küçük defektlerin doldurulması ile sınırlıdır. İçeriğindeki por yapısı da yüksek oranda değişkenlik göstermektedir ve porların arasında bağlantılar bulunmaması nedeniyle kemik gelişiminin oluşabilmesi için materyalin tamamen rezorbe olması gerekmektedir. Bunlara rağmen osseöz defektlerin doldurulmasında kullanılmak üzere piyasaya sürülen ticari tablet formları sayesinde kalsiyum sülfat, yakın zamanda tekrar popülerite kazanmıştır.

Kalsiyum fosfat bileşikler, osteokondüktif ve biyobozunur özellikleri nedeniyle günümüz çalışmalarında üzerinde yoğunlaşmış seramiklerdir. Araştırmalarda en çok

kullanılan seramikler HA ve TCP'dir. Aralarındaki rezorpsiyon hızı ve porozite oranlarındaki büyük farklar nedeniyle bu iki molekülün klinik kullanıma en elverişli şekilde, belirli oranlarda birleştirilerek bir arada kullanılması fikri ortaya atılmıştır. HA ve β -TCP içeren bu bileşiklere, bifazik kalsiyum fosfat(BCP) ismi verilmektedir. Daculsi tarafından köpekler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, oluşturulan kemik defektleri farklı oranlarda β -TCP/HA içeren BCP'ler ile doldurulmuş ve bu oranın seramiğin doku içerisindeki davranışı üzerine olan etkileri gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda BCP seramiklerin doku içerisindeki rezorpsiyonlarının β -TCP/HA oranındaki artış ile paralellik gösterdiği belirtilmiş ve yapısındaki β -TCP/HA oranının değiştirilerek greft materyalinin çözünürlüğü ve biyoaktivitesinin kontrol edilebileceği öne sürülmüştür.⁸⁴

Kalsiyum fosfat seramikleri çoğunlukla kalsiyum fosfat tuzlarının yüksek sıcaklıklarda sinterizasyonu ile elde edilir. Bu işlem sırasında su buharı ortamdan uzaklaştırılarak ortaya çıkan toz yüksek basınç altında tablet şekline getirilmektedir. Bu biyomateriyalin piyasada poröz, yoğun yapıda veya granül şeklinde ticari formları mevcuttur. Ayrıca, farklı kristal tipleriyle birlikte uygulanan bir grup enjekte edilebilir formdaki kalsiyum fosfat çimentosu, ağırlık taşımayan kemik defektlerin doldurulması ve doku içine çeşitli moleküllerin ulaştırılması amaçlarıyla kullanılabilir. Bu fiziksel formdaki kalsiyum fosfat, doku içine enjeksiyonu takiben saatler içerisinde yapısındaki HA sayesinde sert bir hal almakta ve 24 saat içinde en yüksek kompresif kuvvetine ulaşmaktadır.⁸⁵ Ancak, porozite oranının kontrol edilememesi ve yüksek yoğunluğu nedeniyle seramiğin uzun zaman boyunca dokunun içinde rezorbe olmaması

gibi dezavantajları vardır. Enjekte edilebilen seramik ile yapılan klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar bildirilmiş ve bu madde, vertebra kompresyon kırıkları başta olmak üzere çeşitli kırıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.⁸⁶

β -TCP, yüksek osteokondüktif özelliği ile birlikte doku içinde kısa sürede ve tama yakın rezorbe olabilme yeteneği ile klinikte sık tercih edilen diğer bir biyoseramiktir. 1 ila 1000 mikrometre boyutları arasında porlara sahiptir ve bu özelliği ile kansellöz kemiğin trabeküler mimarisine yapısal benzerlik göstermektedir. Sahip olduğu bu porozite özelliğinin, fagosit migrasyonu ve rezorpsiyon ile birlikte kemik oluşumunda gerekli hücre, besin ve büyüme faktörlerinin infiltrasyonuna imkan sağladığı kanıtlanmıştır.⁸⁷ Por boyutlarındaki büyüme ile kemiğin greft içerisine gelişiminin ve vaskülarizasyonun da arttığı gösterilmiştir. Bunlara ek olarak doku mühendisliği alanında yapılan çeşitli çalışmalarda β -TCP'nin BMP ile kombinasyonunun kemik rejenerasyonunu artırdığı bildirilmiştir.⁸⁸ Günümüzde β -TCP, ticari olarak poröz veya katı şekillerde, granül ve blok formlarında bulunmaktadır.

Hidroksiapatit(HA), kemik matriksin ana yapıtaşı olması nedeniyle doku mühendisliği ve biyomateryal alanlarında en sık kullanılan biyoseramiktir. HA 4 x 50 x 50 nanometrelik boyutları ile vücutta nanokristal formunda bulunmaktadır ve kemiğin %3 ila %5'ini oluşturan ve biyomineralizasyon ile hücrel tutunma için aktif alanlar oluşturan osteokalsin, osteopontin ve osteonektin gibi proteinler aracılığıyla kollajene indirekt olarak bağlıdır.⁸⁹ Doğal ve sentetik HA, kimyasal içerik ve in vivo davranışları açısından farklılık göstermektedir. $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ kimyasal formülüne sahip ve stokiyometrik olan sentetik HA'ların aksine, vücutta kemik yapısında bulunan HA'lar

saf bir halde veya stokiyometrik değildir. Kemğin yapısında bulunan CO_3^{2-} , Na^+ , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cl^- ve F^- gibi elementler nedeniyle, sentetik HA'lardaki 1.67'lik Ca/P oranı ile kıyaslandığında vücutta bulunan HA'lardaki molar Ca/P oranı bundan düşüktür.^{90,91} Bu oranın hücre adezyonu, proliferasyonu, kemik oluşumu ve remodelizasyonunda önemli bir role sahip olabileceği öne sürülmüştür.⁹² Kemikteki mineral yapı temel olarak karbonat çökelmiş kalsiyumdan fakir HA tarafından oluşturulur ve bu yapının sahip olduğu 1.5'luk Ca/P oranı, kimyasal olarak TCP'ye benzemekle birlikte yapısal olarak stokiyometrik HA ile paralellik göstermektedir.^{90,91} Bu bahsedilenler sentetik seramik greftlerin doku içinde gösterdiği davranışların anlaşılması açısından önemlidir çünkü; Ca/P oranı 1.5 olan TCP, 1.67 orana sahip HA'dan asidik ortamda 12.3 kat, bazik ortamda ise 22.3 kat daha hızlı çözünmektedir.⁹³ Porozite, kristalite, saflık gibi bir takım faktörler greft rezorpsiyonuna etkili olmakta ise de, greft yapısındaki Ca/P oranı doku içinde rezorpsiyonu etkileyen en önemli faktördür. Bu nedenle TCP'nin doku içinde rezorpsiyonu haftalar/aylar içinde meydana gelirken HA için bu süre yıllar ile ifade edilmektedir.⁹⁴

Yakın zamanda, nanometrik boyutlardaki HA (10-100 nm) sahip olduğu fonksiyonel özellikler nedeniyle bu alanda yoğun ilgi toplamıştır. Nano-HA'nın osteointegrasyonu, osteoblast adezyonu, farklılaşması ve proliferasyonunu uyarabilmesi ve kısa sürede yeni kemik oluşumuna olanak sağlayan, yüzeyi üzerinde kalsiyum içeren mineralleri çöktürebilme potansiyeli açılarından konvansiyonel mikro-HA'ya göre üstün olduğu kanıtlanmıştır.⁹⁵ Sahip olduğu biyouyumluluk, biyoaktivite, osteokondüktivite ve üstün mekanik kuvvet gibi özelliklerine ek olarak immünolojik ve enflamatuvar yanıt

oluşturmamasından dolayı yaygın olarak çalışmalarda kullanılan nano-HA, deneysel uygulamalarda şu anda ideale en yakın özellikteki sentetik greft materyallerinden biri olarak değerlendirilebilir.

II. Biyoaktif seramikler

Bu gruptaki maddeler de kemik ile aralarında fiziksel bir bağ kurar. Bu özellik, ilk olarak camlarda tanımlanmıştır. Yapılarında %60'dan az SiO_2 ve yüksek miktarda NaO_2 ile CaO içeren, kemiktekine benzer bir $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ oranına sahip maddelerdir.⁹⁶ Bu özellikleri sayesinde sıvı bulunan bir ortamda camların yüzeyi reaktif hale gelmekte ve yüzeylerinde hızla hidroksil karbonat apatit kristalleri oluşmaktadır. Doku içinde rezorbe olmamalarından dolayı greft olarak asıl etkinlikleri kemik ile aralarında oluşan bağlardır. Camların yapısına apatit veya çeşitli kristallerin eklenmesi ile bu bağların kuvvetlendirilebileceği gösterilmiştir. Bu şekilde ortaya çıkan cam-seramik hibridi materyallerin bükülme ve kompresif kuvvetlerinin kemikle karşılaştırıldığında daha fazla olduğu izlenmiştir.⁹⁷ Seramik eklenmemiş biyocamların mekanik kuvvetleri ise çok düşüktür ve orta boyutlu kemik defektlerinin doldurulmasında kullanılmaktadırlar. Bunun aksine, cam-seramik hibridleri büyük defektlerin doldurulmasında kullanılabilir. Ancak, yüksek kuvvetlere maruz kalan bölgelerde tercih edilmemelidirler.

III. Biyoinert seramikler

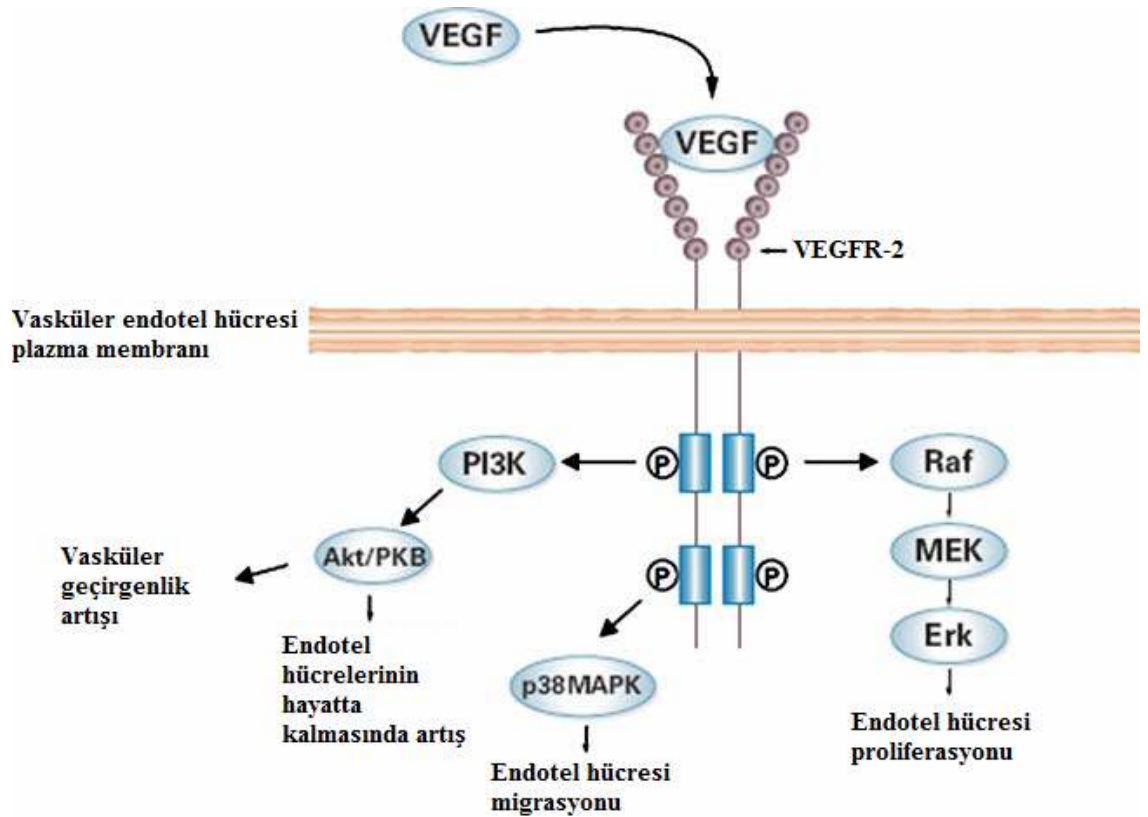
Bu maddeler canlı doku ile reaksiyona girmezler, çok yüksek biyouyumluluğa sahiptirler ve bütün greft materyalleri arasında en fazla mekanik kuvvete sahip gruptur. Çoğunlukla alüminyum (Al_2O_3), zirkonyum (ZrO_2) ve titanyum (TiO_2) gibi metal oksitlerinden oluşurlar.⁹⁷ Üstün kompresif kuvvetleri nedeniyle genellikle uzun kemiklerdeki defektlerin tedavisine ek olarak bazı tümör rezeksiyon protezleri ve parsiyel endoprotezlerde de kullanılmışlardır. Kemik doku ile doğrudan bağ oluşturmadıkları için makaslama kuvvetlerinin fazla olduğu alanların tedavisinde kullanımları sınırlıdır. Bu grubun önemli bir üyesi, deniz mercanının kalsiyum karbonat yapısındaki iskeletinden elde edilen, biyobozunur bir poröz HA-seramiktir. Mercan kaynaklı kalsiyum fosfat implantların por yapısı, insandaki kansellöz kemiğe benzer biçimde organize özellik sergiler. Yapısal kuvvetlerinin sınırlı olması nedeniyle 7-8 cm.nin üzerinde boyutlara sahip defektlerin doldurulmasında kullanılmamalıdır. Bu gibi durumlarda greftin dögüsel yüklenmeye maruz kalmaması için internal fiksasyon uygulanması gereklidir. Mercan kaynaklı HA'nın diğeri bir dezavantajı da, doku içinde çok geç dönemlerde yıkılmasıdır. Osteoklast aracılı yıkım olayı genellikle greftin sadece seramik yüzeyinde izlenmekte ve iç kısımdaki mikromimarisinde değişiklik olmamaktadır. Bu da mercan kökenli seramiklerin, kemik remodelizasyonunun iyileşme için kritik öneme sahip olduğu bölgelerde kullanımını sınırlamaktadır.

2.4. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

1983 yılında Tümör Vasküler Permeabilite Faktörü (VPF)⁹⁸ olarak isimlendirilen VEGF, 1989 yılında keşfedilmiş ve tam olarak tanımlanmıştır.⁹⁹ Dört adet izoformu bulunan VEGF ailesinin en aktif üyesi VEGF-A'dır. Diğer izoformlardan VEGF-B'nin işlevi henüz bilinmemekte, VEGF-C ve VEGF-D ise asıl olarak lenfanjiyogeneizde rol almaktadır.¹⁰⁰ Bunların arasında VEGF-A, anjiyogenez ve endotel hücrelerinin gelişiminde esas etkili olan faktördür. İnsanda VEGF geni, alternatif bölünme vasıtası ile biyolojik olarak en yüksek aktiviteye sahip olan 165 aminoasitlik VEGF peptid dizisini sentezler.¹⁰¹ VEGF vücutta endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, düz kas hücreleri, osteoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından üretilir.^{52,102,103} Diğer peptid yapılı büyüme faktörlerine benzer şekilde etkisini, hedef hücrelerdeki yüzey reseptörlerine (VEGFR-1 ve VEGFR-2) bağlanarak gösterir (Şekil 2).¹⁰¹

İnsan vücudundaki osteoblastların yüzeylerinde yüksek seviyelerde VEGFR-1 bulunmaktadır ve osteoblastların bu reseptörler üzerinden uyarılmaları kuvvetli bir kemotaktik yanıt oluşturur.¹⁰⁴ Bunun yanında VEGF, kendi tarafından uyarılan endotel hücrelerinden salgılanan endotelin-1 ve IGF-1 gibi osteoanabolik faktörler aracılığıyla dolaylı olarak osteoblast öncüllerinin gelişimi ve farklılaşmasını da uyarır.¹⁰⁵ VEGF'nin ayrıca MSC kemotaksisini de artırdığı gösterilmiştir.¹⁰⁶ Periost, kas, yağ doku ve kemik iliği gibi dokular, sadece osteoblastlara farklılaşabilme kapasitesine sahip MSC'ler için zengin birer kaynak olmakla kalmaz, buna ek olarak damar oluşumunu sağlayan öncül endotel hücrelerini de bünyelerinde bulundurlar.¹⁰⁷ Büyük oranda lokal ve sistemik

VEGF artışı ile uyarılan anjiyogenez sayesinde osteojenik substratlar, perisit kök hücreleri ve osteoblastlara farklılaşma kapasitesine sahip ek MSC'ler büyümekte veya iyileşmekte olan kemik dokuya taşınmaktadır.¹⁰⁸ Bunun sonucu olarak da osteoblast ve endotel hücreleri arasında, salgıladıkları trofik faktörler aracılığıyla pozitif ve çift yönlü bir etkileşim ortaya çıkar.



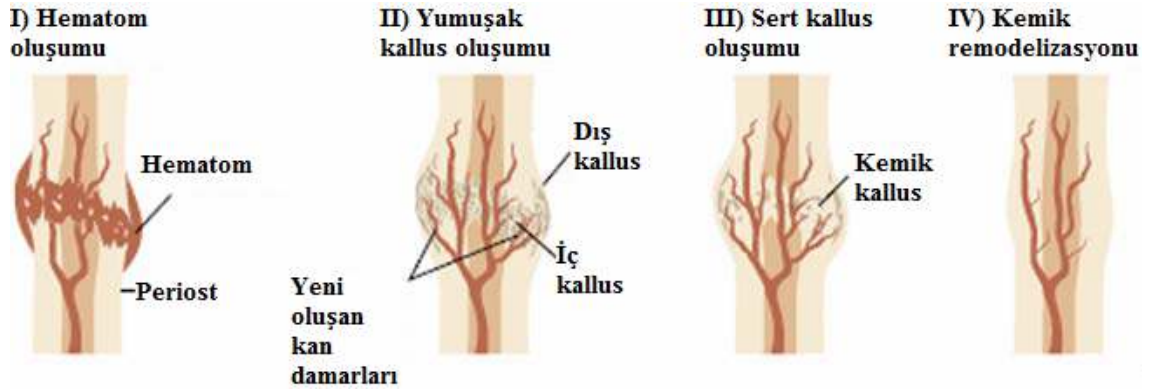
Şekil 2. VEGF'nin reseptör etkileşimi aracılığıyla oluşan etkileri. VEGF'nin çeşitli yollarlar üzerinden gerçekleştirdiği uyarılar ile, anjiyogenez için gerekli olan endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile birlikte yaşam oranında artış meydana gelir. (PI3K: Fosfoinozidit 3-kinaz; Akt/PKB: Protein kinaz B; p38MAPK: p38 mitojen ile aktive olan protein kinaz; MEK: mitojen ve ekstraselüler kinaz; Erk: Ekstraselüler düzenlenen kinaz)

Yeni kemik oluşumunu, MSC farklılaşmasını artırarak uyardığı bilinen BMPler, aynı zamanda anjiyogenezi de uyarmaktadırlar. Deckers ve ark. BMP-2, -4 ve -6'nın kültür ortamında fare kökenli osteoblastlarca VEGF salınımını uyardığı ve fütal fare kemiklerinde anjiyogenezi artırdığını bildirmişlerdir.⁵² Bu çalışmada BMP antagonistlerinin, osteoblastlardan VEGF salınımını inhibe ettiği gösterilerek BMPlerin artmış VEGF üretimine yol açtığı doğrulanmıştır. Buna ek olarak ortama VEGF antikorları eklendiğinde BMP aracılı anjiyogenezin inhibe olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni ise BMP ve VEGF arasında bulunan pozitif ve çift yönlü etkileşimdir. BMP uyarısı ile osteoblastlardan salınan VEGF damar gelişimini sağlamak ve bu yolla osteojenik hücreler ortama taşınabilmekte, BMP de tekrar bu hücreler üzerine etki ederek ortamdaki VEGF konsantrasyonunun artmasını sağlamak ve kırık iyileşmesi mümkün olmaktadır. Bu örnekte de görüldüğü üzere VEGF sadece doğrudan etki ile değil, diğer faktörlerle de sinerjistik etkileşim içinde bulunarak anjiyogenez ve yeni kemik oluşumunda önemli rol oynamaktadır.

2.5. VEGF ve ANJİYOGENEZİN KIRIK İYİLEŞMESİNDEKİ ROLÜ

Kırık iyileşmesi moleküler düzeyde pek çok büyüme faktörü, enzim ve sitokinin ortak ve uyumlu görev yapması sayesinde gerçekleşen kompleks bir biyolojik süreçtir. Bu süreçte yeni oluşan kemiğin beslenmesi, gelişmesi ve lamellar kemiğe dönüşmesinde anjiyogenez ve bundan sorumlu ana büyüme faktörü olan VEGF kritik rol oynamaktadır. Kırık iyileşmesi, zamana göre 1)hematom oluşumu, 2)enflamasyon, 3)kıkırdak oluşumu ve farklılaşması ve 4)kemik remodelizasyonu olarak dört temel

aşamada incelenebilir (Şekil 3).¹⁰⁹ Bu aşamaların hepsinde önemli görevler üstlenen VEGF'nin anjiyogenez ile yeni kemik oluşumu ve gelişimi üzerine olan etkileri, bahsedilen kırık iyileşmesinin dört ana fazında ayrı olarak incelenecektir.



Şekil 3. Kırık iyileşmesinin aşamaları. I) Kırık nedeniyle meydana gelen dolaşım bozukluğu sonucunda, defektif kemik dokunun içinde ve etrafında hematom oluşur. II) VEGF'den zengin kırık hematomu aracılığıyla etraftaki damarlardan kırık alanı içerisine uzanan yeni damarlar meydana gelir (anjiyogenez). Anjiyogenez ise endokondral ossifikasyon aracılığı ile bir kırıkta iskelet (iç kallus) oluşumu yanında dış kallus oluşumunu da sağlar (intramembranöz ossifikasyon). III) Hipertrofik kondrositlerin apoptoza uğraması ile kallus mineralizasyonu gerçekleşir (bu aşamada VEGF'nin düzenleyici rolü vardır) ve örgütlü kemik oluşarak yerini lamellar kemiğe bırakır. IV) Primer lamellar kemik yapısındaki kallus dokusu remodelize olarak sekonder lamellar kemiğe dönüşür ve kemik dolaşımı bu süreçte normale döner.

Hematom oluşum fazı

Kırık sonucunda periosteal ve medüller kanalda bulunan damarlarla birlikte kortikal kemik yapısındaki Havers kanalları içerisinde uzunlamasına yerleşim gösteren damarlar da bütünlükleri bozularak hasar görmektedir. Buna ek olarak çevredeki

yumuşak dokularda bulunan damarlar da hasar görür. Ortaya çıkan vasküler harabiyete vücudun verdiği tepki ise hem lokal, hem de sistemik düzeylerde olmaktadır. Street ve ark. insanlarda sistemik dolaşımdaki VEGF seviyeleri ile kırık hematoma içindeki lokal VEGF seviyeleri arasındaki farkı incelemişlerdir.¹¹⁰ Kırık hastalarında sistemik dolaşımdaki VEGF seviyelerinde, sağlıklı insanlardakine göre anlamlı olarak bir artış bulunduğu tesbit edilmiş ve kırık hematoma içinde, sistemik dolaşımdakine oranla 15 kat artmış VEGF seviyeleri tesbit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca bir fibrin matriks yapısındaki interfragmanter hematoma da VEGF için rezervuar görevi üstlendiği gösterilmiştir. VEGF'nin endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu, osteoblast migrasyonu ve aktivasyonu gibi iyi bilinen etkileri ve kırık hematoma VEGF'nin yüksek seviyelerde bulunması göz önünde bulundurularak, hematoma oluşumunun kırık iyileşmesi sürecinin önemli bir parçası olduğu sonucuna varılabilir.

Kırık hematoma ileri derecede hipoksik bir ortamdır ve tavşanlarda iyileşme aşamasındaki kırıklarda 6.25 mm Hg gibi düşük bir seviyede ortalama O₂ basıncı olduğu bildirilmiştir.¹¹¹ Bunu destekleyecek biçimde hipoksinin, organizmada anjiyogenezi uyarıcı faktörlerin seviyesinde anlamlı bir artışa yol açtığı gösterilmiştir.¹¹² Bu faktörlerin sentezlenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörü, anaerobik metabolizma, anjiyogenez ve eritropoezde görev alan genlerin aktivasyonundan sorumlu Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α)'dır. Sıçanlarda oluşturulan bir femur kırığı modelinde HIF ifadenmesinin sağlam tarafa göre 5.9 kata kadar yükseldiği gösterilmiştir.¹¹³ Buna paralel bir şekilde kırık hematoma içerisindeki VEGF ifadenmesinde de sağlam tarafa göre 2.2 katlık bir yükselme olduğu izlenmiştir. VEGF

seviyelerinde en yüksek konsantrasyonlara kadar düzenli bir artışı takiben damar gelişimi ve buna bağlı oksijen basıncının artması ile VEGF ifadenmesinin bazal düzeyine döndüğü saptanmıştır. Literatürde VEGF'nin, tavşanlarda oluşturulan çeşitli kaynamama ve kritik boyutlu kemik defekti modellerinde iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir.¹¹⁴⁻¹¹⁶ VEGF'nin bu alandaki etkinliğine rağmen klinik kullanımını kısıtlayan en büyük dezavantaj, rekombinant büyüme faktörü elde edilmesindeki pahalılıktır. Bu nedenle Shen ve ark. HIF'nin küçük moleküller yardımıyla yıkımını önleyerek endojen VEGF üretimini artırmayı denemişlerdir.¹¹⁷ Normal doku oksijen seviyelerinde HIF yıkımı, HIF prolilhidroksilaz enzimi tarafından hidroksilasyonla gerçekleşmektedir. Deferoksamin, L-mimozin ve Dimetiloksalglisin moleküllerinin bu enzimi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu şekilde artmış HIF uyarısı ile hem daha yüksek düzeylerde gerçekleşen in vitro VEGF üretiminin kapiller tomurcuklanmada artışa, hem de farelerde oluşturulan bir femur kırığı modelinde vaskülarite ve kallus boyutunda artışa yol açtığı gösterilmiştir.¹¹⁷

Enflamasyon fazı

İnsan vücudunda kırığa yanıt olarak ortaya çıkan enflamatuar doku cevabı iki ana fazda gerçekleşir: Travma sonrası ilk birkaç günde ortaya çıkan erken faz ve günler ila haftalar süren geç faz. Erken enflamatuar faz boyunca TNF- α , IL-1 α ve IL-1 β gibi sitokinlerin ifadenmesinin arttığı ve özellikle medüller boşluktaki makrofaj ve enflamatuar hücreler ile birlikte kırık komşuluğunda yer alan periosteal dokuda yüksek yoğunlukta bulunduğu fare modellerinde gösterilmiştir.¹³ Enflamatuar hücrelerden

salınan sitokinler, lokal fibrojenik hücrelerin kırık hattına migrasyonunu uyararak ekstraselüler matriks sentezini artırıcı rol oynarlar. Enflamatuar faz süresince bu sitokinler, damar yüzeylerinde hücrel adezyon moleküllerinin ifadenmesini artırarak, nötrofil ve monositlerin doku remodelizasyonunda görevli matriks metalloproteinazlarını sentezleyecekleri ekstraselüler matrikse geçiş yapmalarını mümkün kılar. Ayrıca bu sitokinlerin, olgun osteoklastlar üzerine doğrudan etkiyle kemik döngüsünü artırıcı etkileri de bulunmaktadır. Farelerde oluşturulan bir kırık modelinde IL-1 ve TNF- α doku konsantrasyonlarının erken enflamasyon fazında çok yüksek seviyelere çıktığı gösterilmiştir.¹⁴ Bu örnekte de görüldüğü üzere enflamatuar sitokinlerin osteoklastik aktiviteyi düzenleyici özellikleri ile kırık iyileşmesinin erken safhalarında en aktif role sahip moleküller olduğu sonucuna varılabilir.

Geç enflamatuar faz boyunca kırık iyileşmesi üzerine en fazla etkisi bulunan moleküllerin başında VEGF gelmektedir. Enflamasyona yanıt olarak ortaya çıkan VEGF artışı, vücutta hem lokal, hem de sistemik olarak izlenebilir.^{103,118} Bu konu üzerine yapılan birçok çalışmada, kırık hastalarında VEGF'nin sistemik dolaşımdaki seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı biçimde daha yüksek olduğu izlenmiştir.^{108,110} Bu çalışmalardan ikisinde ise VEGF seviyeleri kaynamama olan hastalarda, kırığı kaynayan hastalara göre iyileşme sürecinin tüm fazlarında daha yüksek olarak izlenmiştir ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.^{108,118} Literatürde kaynamama olan hastalardan elde edilen doku örnekleri ile yapılan çalışmalar mevcut olmadığı için, enflamatuar yanıt olarak ortaya çıkan lokal ve sistemik VEGF artışları arasındaki ilişki araştırılamamıştır. Bu konudaki çalışmalar koyunlarda

oluşturulan deneysel gecikmiş kaynama modelleri üzerinde yapılmıştır.¹⁰⁷ Kaynamama olan hastaların sistemik dolaşımında izlenen artmış VEGF seviyeleriyle paralellik gösterecek şekilde; koyunlarda oluşturulan kaynamama modellerinde, kaynama izlenen deneklere göre kallus içerisinde daha yüksek VEGF seviyelerine rastlanmıştır. Histolojik olarak ise, koyun kaynamama modelinde daha uzun bir hematoma oluşum fazı ve kırık hattında daha az sayıda damar oluşumu izlenmiştir.¹⁰⁷ Bu da VEGF seviyelerindeki artışın uzun sürmesinin, kaynamama dokusu içerisindeki uzamış hipoksiye bağlı olabileceğini desteklemektedir.

Kırık oluşumu ve farklılaşması

Uzun kemiklerin büyüme plaklarında izlenen biyolojik sürecin endokondral kemik oluşumuna benzemesi nedeniyle, endokondral kemik oluşumu üzerine yapılan çalışmaların çoğunda epifiz plağı model olarak alınmıştır. Kırık iyileşmesi, kırık hattı çevresinde kallus oluşumu izlenmesi açısından uzun kemiklerin gelişiminden farklıdır. Buradaki kallus, kırık etrafındaki coğrafi yerleşimine göre iki farklı doku özelliği sergiler. Medüller kanal ve kırığın interkortikal bölgelerinde “yumuşak kallus” oluşumu izlenir ve bu yapı, sonuçta endokondral ossifikasyon ile kemiğe dönüşür. Subperiosteal bölgelerde ise kırığı çevreleyen yumuşak doku, “sert kallus” olarak isimlendirilir ve intramembranöz ossifikasyon ile kemiğe dönüşür.¹¹⁹ Kallus dokusu temel olarak, kemik oluşumuna zemin hazırlayan monosit kaynaklı kondroklastlardan meydana gelmektedir. Kalsifiye kallus remodelizasyon sürecinde kondroklastlar, BMP ve VEGF gibi anjiyogeneze rol alan faktörlerin ekstraselüler matriksten salınımını uyarır. Bu faktörler

de periosteal ve kortikal kan damarlarının yumuşak kallus içerisinde gelişimini sağlar.¹⁰⁸ Bu bölgedeki damar gelişimi ile MSCler ve yumuşak kallus içerisindeki kapiller endotel hücreleri ile ortak bir bazal membrana sahip perisitlerin bölgeye ulaşımı sağlanır. Perisitlerin vasküler iyileşme sırasında proliferer oldukları bilinmektedir. Buna ek olarak perisitlerin alkalen fosfataz, kollajen, glikozaminoglikan ve osteokalsin sentezleyerek in vitro kalsifiye koloniler oluşturabildikleri, Brighton ve ark. tarafından gösterilmiştir.¹²⁰ Bu bilgilerin ışığında kırık hattında damar oluşumunun, sadece bölgedeki hücreler tarafından iyileşmede kullanılacak oksijen ve gerekli besin maddelerinin sağlanmasına değil, aynı zamanda osteoblastlara dönüşecek MSCler ve osteoklastlara dönüşecek makrofaj/monosit tipi hücrelerin bölgeye ulaşmasına da olanak sağlayarak kırık iyileşmesinde kritik bir role sahip olduğu sonucuna varılabilir.

Endokondral kemik oluşumu sırasında kıkırdak dokusu içerisine damar gelişimi, hipertrofik kondrositlerin bulunduğu bölgeden olmaktadır. Her ne kadar normal kıkırdak dokunun avasküler olduğu kabul edilse de, literatürde hipertrofik kondrositlerin VEGF ve reseptörlerini salgıladığını bildiren çalışmalar mevcuttur.¹²¹ Bu da VEGF'nin, hipertrofik bölgede kıkırdak içerisine doğru damar oluşumunda olduğu kadar kondrosit apoptozunun düzenlenmesinde de otokrin ve parakrin rollere sahip olduğunu düşündürmektedir.^{103,122,123} Hayvan deneylerinde hipertrofik kondrositlerin hücre içeriğinin endotel hücresi migrasyonu ve damar invazyonu için kuvvetli uyarıcı etkisinin bulunduğu ve kondrosit kaynaklı VEGF'nin anjiyogenezi artırdığı gösterilmiştir.¹²² Endokondral kemik oluşumu sırasında kondrositler, hipertrofiye olmadan önce aktif biçimde bölünür ve normal bir fenotip sergilerler. Bu hücreler tarafından VEGF

salgılanması da, tam olarak hipertrofik fenotip sergilemeye başladıkları terminal farklılaşma safhasında ortaya çıkar. Ayrıca bu aşamada kondrositler, karakteristik bir gen ifadenmesi de sergilemektedirler. Proliferasyon aşamasındaki kondrositlere kıyasla, alkalen fosfataz ve tip-X kollajen üretimindeki artışa tip-II ve tip-IX kollajen üretimindeki azalma eşlik eder.¹⁰³ Kondrositlerin yüzeylerinde VEGFR-2 bulunduğu gerçeği göz önüne alındığında; yukarıdaki bulgular, VEGF'nin kondrosit gen ifadenmesinden osteojenik gen ifadenmesine geçişte otokrin mekanizmayla anahtar bir görev üstlendiğini ve damar invazyonu için gereken apoptozu düzenleyici, kritik bir role sahip olduğunu destekler niteliktedir. VEGF antikorları aracılığıyla büyüme plağında anjiyogenezin inhibe edilmesinin kondrosit ölümünde azalma, hipertrofik kondrosit sayısında artış ve büyüme plağı boyutlarında artışa yol açtığı gösterilmiştir.¹⁰³ Matsumoto ve ark. tarafından oluşturulan bir fare modelinde VEGF ve sFlt-1 (VEGF antagonisti) üreten kas kökenli kök hücrelerin dokuda meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir.¹²⁴ Sonuç olarak VEGF inhibisyonunun kondrosit apoptozunda azalmaya ek olarak makroskopik ve hücresel düzeydeki iyileşmede artışa yol açtığı bildirilmiştir.

İnsanlarda VEGF'nin büyüme ve gelişim süreçlerinde kondrositlerin hayatta kalma oranını artırdığı tezinin aksine, kondrositlerin hayatta kalmasını sağlayan olgu aslında doğum sonrası dönemde epifizlerdeki VEGF inhibisyonudur. HIF-1 α inaktivasyonunun masif kondrosit ölümüne yol açtığı gösterilmiştir.¹²⁵ Bu da VEGF'nin hipertrofik kondrosit apoptozunu, damar invazyonu sonucu meydana gelen doku oksijenasyonundaki artış ve aktif HIF-1 α seviyelerindeki azalma aracılığıyla dolaylı olarak uyardığını göstermektedir. Bunlara ek olarak VEGF ve VEGFR'nin normal

fizyolojik koşullarda sistemik dolaşımda ve proliferasyon aşamasındaki kondrositlerde önemli miktarlarda bulunmadığı ve sadece epifiz ve endokondral kemik iyileşmesinin olduğu bölgelerde yüksek seviyelerde bulunduğunu belirtmek yerinde olacaktır.¹²² Endokondral kemik oluşumu sırasında kondrositler tarafından VEGF üretimi ve bu molekülün VEGFR ile etkileşimi sonucunda kemik matriksi oluşumu, hipertrofik kondrosit apoptozu ve damar invazyonu aracılığıyla pre-osteoblastlar ve pre-osteoklastların iyileşme bölgesine dağıtımı gerçekleşmektedir.¹²⁶ Bu bilgilerin ışığında, VEGF'nin kırık iyileşmesinin kırıkdağ fazında da önemli bir role sahip olduğu söylenebilir.

Kemik remodelizasyonu

Bu aşamada endokondral ossifikasyon alanının etrafı yoğun bir kallus dokusu ile örtölür. Bu kallus dokusu, hem değişim aşamasındaki zayıf, kırıkdağ yapıdaki iyileşme dokusunu destekler, hem de MSC ve periosteal damarları kırık bölgesine ulaştırır. Kallus içerisinde BMPler sentezlenerek VEGF ile birlikte ekstraselöler matrikste muhafaza edilirler.¹²⁷ VEGF ve BMPler, preosteoblastların farklılaşma ve metabolizmalarını artırırken BMP-4 de yeni kemik oluşumun üzerinde VEGF ile sinerjistik etki gösterir.¹²⁸ Örgölü kemiğın lamellar kemiğe dönüşebilmesi için kemik oluşumu, rezorpsiyon ve remodelizasyon ile birlikte meydana gelmelidir. VEGF'nin bu aşamadaki rolü ise, kemik rezorpsiyonu ve remodelizasyonu için gerekli olan osteoklastları uyarak hayatta kalma oranları ve aktivitelerini artırmaktır. Street ve ark. tarafından farelerde oluşturulan bir tibia kırığı modelinde, çözünebilir VEGFR ile

oluşturulan VEGF inhibisyonu zemininde, remodelizasyonun tüm safhalarında kalsifiye kallus miktarının azaldığı gösterilmiştir.¹¹⁵ Buna ek olarak VEGF inhibisyonu uygulanan deneklerde remodelize olan doku miktarının ve kallus damarlanmasının azaldığı bildirilmiştir. VEGF uygulanan diğer bir grupta ise kalsifiye kallustaki mineral yoğunluğu ve damarlanmada artış izlenmiştir. Fareler üzerinde oluşturulan bir diğer femur kırığı modelinde ise VEGF inhibisyonu ile, lamellar kemik oluşumunda ve sert kallus içindeki anatomik remodelizasyon ünitelerinin (cutting cones) sayısında azalma ortaya çıkmıştır.¹¹⁷ Bu da VEGF'nin hem endokondral, hem de intramembranöz ossifikasyonda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Hayvanlarda oluşturulan deneysel kaynamama modellerinde rekombinant insan VEGF(rhVEGF)'sinin lokal uygulanmasının kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Eckardt ve ark. tarafından tavşanlarda oluşturulan kaynamama modelinde rhVEGF'nin mekanik dayanıklılık, sertlik ve kallus oluşumunda artışa yol açtığı gösterilmiştir.¹¹⁴ Buna ek olarak kontrol grubundaki tavşanların yarısına karşılık, rhVEGF grubundaki bütün deneklerde kaynama izlenmiştir.

2.6. DOKU MÜHENDİSLİĞİ ve MATRİKS HAZIRLANMASI

Doku mühendisliği, doku büyümesine ait prensipleri anlayıp bunları klinik uygulamada kullanarak, doku defektlerinin rekonstrüksiyonunda fonksiyonel sonuçlar elde etmeyi amaçlayan ve biyomateryaller alanındaki teknolojik ilerlemelere paralel olarak son yıllarda çok hızlı gelişen bir daldır. Doku mühendisliğinde temel olarak

uygulanan strateji, dokunun iyileşme potansiyelini hem mekanik, hem de biyolojik açılardan artırma özelliği bulunan çeşitli komponentlerin bir arada kullanılmasıdır. Buradaki komponentler genel olarak iki başlık altında sınıflanabilir. Bunlardan ilki, içinde hücre uygulanmasına (MSC, kemik iliği) izin verecek özellikte yüksek derecede ve birbiriyle bağlantılı poröz yapıdaki matrikslerdir(scaffold). Diğer grubu ise biyoaktif ajanlar (büyüme faktörleri, hormonlar) oluşturur. Doku mühendisliğinde bu iki gruptan oluşturulan çeşitli kombinasyonlar aracılığıyla iyileşmenin artırılması amaçlanır.

Doku mühendisliğinde ideal özellikleri taşıyan matriksin tasarımı ve üretimi hedeflenir. İdeal matriksin özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Biyouyumlu olmalıdır, yıkım ürünleri sitotoksik özellik taşımamalıdır.
- Biyobozunur olmalıdır, dokunun iyileşme hızına eşit bir hızda rezorbe olmalıdır.
- Uygun doku gelişimi, damarlanma ve besin geçişi için hem mikro ve makroporöz özellik göstermeli, hem de yapısındaki porlar birbirleri ile çok sayıda bağlantılar içermelidir.
- Ağırlık taşıyan bölgelerdeki kemik iyileşmesini sağlayacak mekanik özelliklere sahip olmalıdır. Yeni kemik oluşumunun ilk aşamalarında yapısal bütünlüğünü muhafaza edebilmelidir.

Doku mühendisliği ürünü matrikslerin tasarımında çeşitli sentetik ve doğal biyobozunur polimerler kullanılmıştır. İnsanlarda ekstraselüler matriksin ana yapıtaşı olan kollajen, bu alanda en sık kullanılan maddelerin başında gelmektedir. Ancak izolasyonunun teknik olarak zor ve pahalı olması klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bu

problemin aşılması için ise, kollajen yerine jelatin kullanımına başvurulabilir. Kollajenin denatüre formu olan jelatinin ucuz, kolay elde edilebilir ve saflaştırılabilir olması gibi avantajları bulunmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan jelatin, bu çalışmadaki matriks tasarımı ana malzeme olarak tercih edilmiştir.

Doku mühendisliğinde polimerik matrikslerin hazırlanmasında çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bunların en yenilerinden birisi olan kryojelasyon teknolojisi ile birbiriyle çok sayıda bağlantıya sahip poröz yapıda polimerik matriksler üretilmektedir.¹²⁹ Kryojelasyonda matriks sentezi, sıfır derecenin altındaki sıcaklıklarda monomerik veya polimerik öncül malzemelerin kullanılmasıyla, tek adımda gerçekleşir. Polimerik matriksin oluşum aşamasında içerisindeki suyun büyük kısmı donar, donmamış olan kısımlarda ise bu aşamada rol oynayan kimyasal reaksiyonlar gerçekleşir. Çözülme aşamasında ise, içindeki buz kristallerinin erimesiyle jel kıvamındaki matriks, birbiriyle bağlantılı çok sayıda pordan oluşan bir yapıya sahip olur. Bu teknoloji ile oluşturulan polimerik matrikse “kryojel” adı verilmektedir ve bu madde değişik fiziksel özelliklere sahiptir. İleri derecede bükülebilme, fiziksel etkilere yanıt olarak çok hızlı ve geri dönüşlü bir şekilde hacim değiştirebilme ve sulu ortamda şişebilme kapasitesi, kryojele kemik grefti olarak kullanılmasında önemli avantajlar sağlamaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için “Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel/Tıbbi Araştırma Ünitesi Yürütme Kurulu”ndan 9.6.2009 tarihli ve 2009/47 sayılı karar ile etik kurul çalışma onayı alınmıştır.

Deney Modeli

Bu araştırmada iskelet sistemi gelişimini tamamlamış 30 adet Yeni Zelanda tipi tavşan kullanılmıştır. Standardizasyon açısından deneklerin hepsi aynı laboratuvarından temin edilerek çalışma süresince standart şartlarda beslenip muhafaza edilmişlerdir. Cerrahi girişimler, denek başına 50 mg/kg ketamin ve 50 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanmasını takiben anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Deneklerin sol tibialarından, proksimal metadiyafizer bölgede 10 mm uzunluğunda (diyafizer çapın iki katı) segmentler çıkartılmıştır. Literatürdeki tavşan modelleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, bu boyuttaki (kritik ebatlı) bir kemik defektinde spontan kaynama gerçekleşmeyeceği gösterilmiştir.¹¹⁵ Bunu takiben oluşturulan defektif kemik yapısı korunarak, iki veya üç adet Kirschner teli ile tibialar tespit edilmiştir (Resim 1-2). Tespit işlemine ek olarak uygulanan cerrahi girişime göre denekler üç gruba ayrılmıştır (Tablo 2):

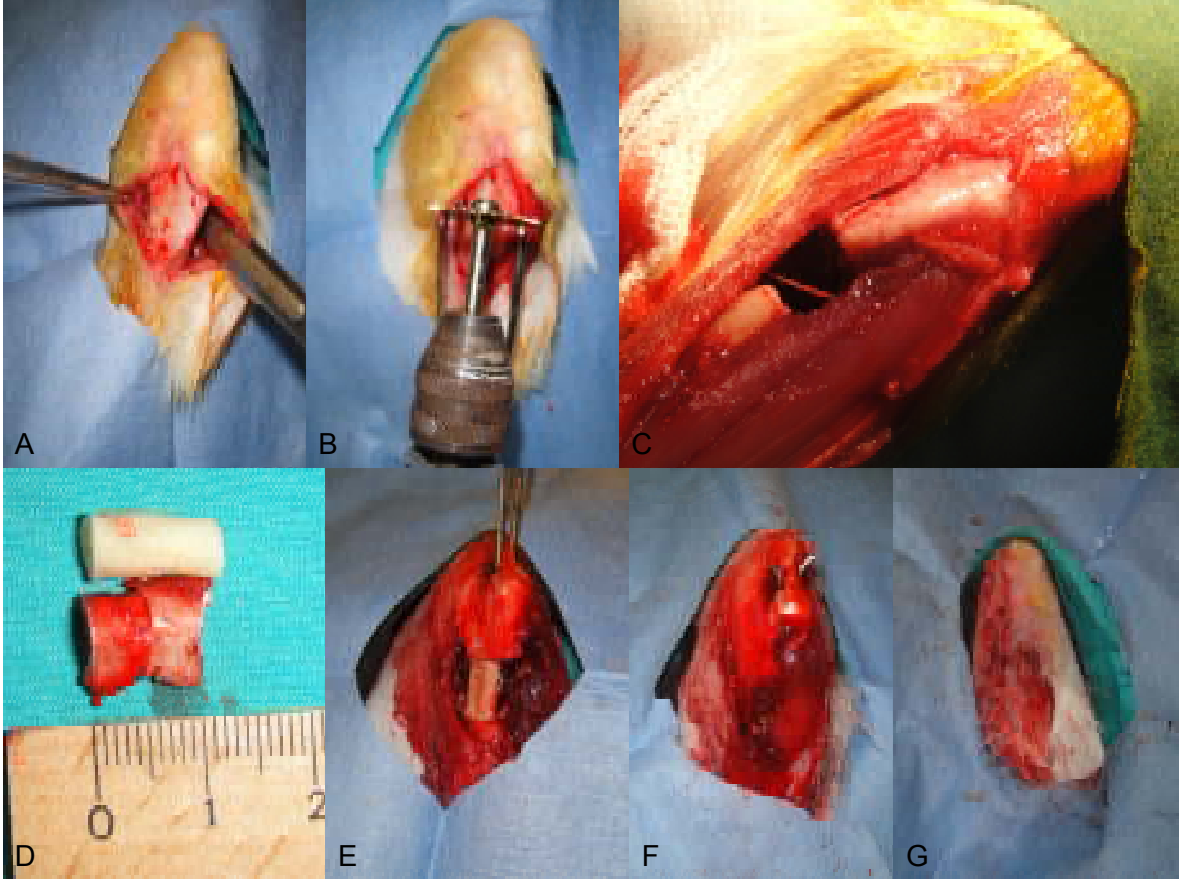
1. grupta tibiadan segment çıkartılarak defektif alanlar boş bırakılmıştır.
2. grupta oluşturulan segmenter kemik defektleri hidroksiapatit/jelatin matriks ile greftlenmiştir.

3. grupta oluşturulan segmenter kemik defektleri ise VEGF yüklenmiş hidroksiapatit/jelatin matriks ile greftlenmiştir.

Tablo 2. Deney gruplarının oluşturulması

	İntramedüller fiksasyon	Sentetik greft	VEGF
1. grup (kontrol)	+	-	-
2. grup	+	+	-
3. grup	+	+	+

Her grup 10 tavşandan oluşmuştur ve uygulanan tedavilerin farklı zaman birimlerindeki etkinliklerini incelemek üzere her gruptan 5 adet tavşan, 6. ve 12. haftalarda feda edilmiştir.



Resim 1. Cerrahi işlem. A: Anteromedial longitudinal insizyonla girilerek cilt altı dokunun geçilmesini takiben periostun sıyrılarak kemiğe ulaşılması. B: Tibianın proksimal metadiyafizer bölgesinden kemik segmenti çıkartılması. C: Oluşturulan defektin görünümü. D: Çıkartılan segment ve uygulanacak sentetik greftin görünümü. E: Kemiğin iki adet Kirschner teli ile intramedüller fiksasyonu ve greft uygulanması. F: Tellerin bükülerek kesilmesini takiben kas ve yumuşak dokular ile kemiğin üzerinin kapatılması. G: Tellerin uçlarının kas ve cilt altı dokunun altına gömülmesini takiben 4-0 emilebilir sütür ile cildin kapatılması.



Resim 2. Tibiadan segment çıkartılmasını takiben çekilen direkt grafiler..

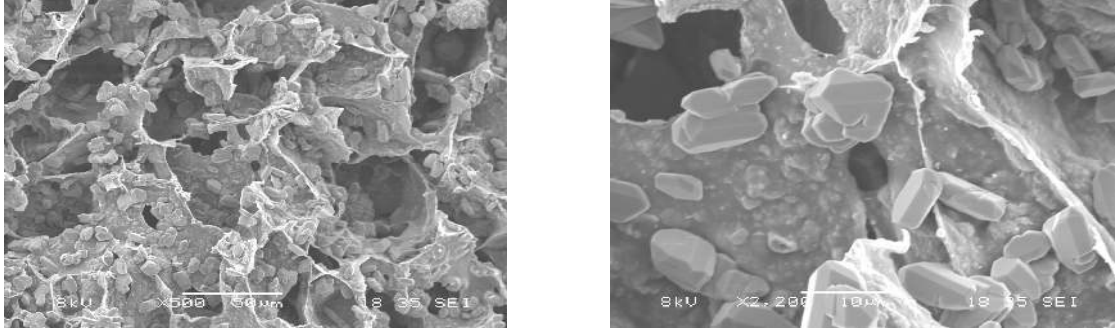
Hidroksiapatit(HA)/Jelatin Matriks Hazırlanması

Bu çalışmada sentetik kemik grefti olarak kullanılan HA/jelatin matriks, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomühendislik Bölümü Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda hazırlanmıştır. Matriks tasarımında öncül malzeme olarak kollajenin denatüre formu olan jelatin kullanılmıştır. Jelatin, kryojelasyon teknolojisi ile çeşitli aşamalardan geçirilerek, birbiriyle bağlantılı çok sayıda pordan oluşan bir yapıya sahip polimetrik matriks elde edilmiştir. Elde edilen sentetik matriksin doku içinde şişebilme ve yıkılabılme özelliklerinin kontrol altına alınması için kryojelin polimer fazında, oksidize dekstran kullanılarak çapraz bağlanması sağlanmıştır. Hidroksiapatit sentezi ise in situ olarak gerçekleştirilmiştir. Bu

basamakta jelatin ve hidroksiapatit süspansiyonu belirli oranlarda karıştırılarak, oluşan ortama oksidize dekstran eklenmiş ve sonuçta ortaya çıkan matriks -12°C’de dondurularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Bu işlemler sonucunda süngerimsi, yüksek elastik özelliğe sahip HA/jelatin kryojel elde edilmiştir. Bu maddenin sentetik kemik grefti olarak kendine özgü önemli bir avantajı, sıvı ortamlarda hızla şişebilmesidir. Dakikalar içinde gerçekleşen ve çıplak gözle de farkedilebilen bu genleşmenin oranı %300’den fazladır. Bu özelliği sayesinde kemik içine yerleştirildikten sonra defektin geometrik yapısına uyum sağlayan greft, buna ek olarak çeşitli faktörler (büyüme faktörleri, proteinler) için de taşıyıcı görevi görebilmektedir. Bu çalışmada kullanılan 165 aminoasitlik insan rhVEGF de cerrahi girişim öncesi mikroenjeksiyon yöntemi ile her bir greftin içerisine 5 mikrogram yüklenerek defekt bölgesine uygulanmıştır.

HA/jelatin matriksin kuru ortamdaki por boyutları 40 ila 150 (ortalama 64.2) mikron arasındadır. Sıvı ortamda ise şişerek bu boyutların ortalama 4 katına çıktığı izlenmiştir. Vücut içine yerleştirildiğinde sahip olduğu 160 ila 600 mikronluk poröz yapısı ile HA/jelatin matriks, kemik iyileşmesi için ideal bir iskelet teşkil etmektedir. Greft içerisindeki HA partiküllerinin ortalama boyutu 8.72 mikrondur ve por duvarlarına çökelmiş halde matriks içinde eşit bir dağılım göstermektedir (Resim 3).



Resim 3. HA/jelatin matriksin iki farklı büyüme altındaki elektron mikroskobu görüntüleri.

Değerlendirme

6. ve 12. haftaların sonunda deneklerden elde edilen tibialardaki kırık iyileşmesi, radyolojik ve histolojik değerlendirmelere ek olarak kemik mineral yoğunluk ölçümü (DEXA) ile incelenmiştir.

Deneklerin ilk ve ikinci girişim uygulanırken çekilen iki yönlü direkt grafilere radyolojik değerlendirmede kullanılmıştır. Değerlendirmede Cook ve ark.¹³⁰ tarafından tarif edilen tablo kullanılmıştır (Ek-1) ve kemik mineral yoğunluğu DEXA ile ölçüldüğü için direkt grafilere radyodansite ölçümü yapılmamıştır.

Histolojik değerlendirme için alınan örnekler ise, kemik doku dekalsifiye olana kadar EDTA solüsyonu içinde bekletilmiştir. Dekalsifikasyonun ardından kırık bölgesinden longitudinal kesitler alınarak parafin bloklara gömülmüştür. Histolojik olarak kırık iyileşmesi, hemotoksilen-eozin ile boyanmış kesitler üzerinden incelenmiştir. Değerlendirme, kesitlerin ait oldukları gruplar hakkında bilgi sahibi olmayan iki ayrı histolog tarafından, Patel ve ark.¹³¹ tarafından tariflenen histolojik

değerlendirme tablosuna göre yapılmıştır (Ek-2). Elde edilen puanların ortalaması alınarak istatistiksel inceleme için kullanılmıştır.

İstatistiksel İnceleme

$\alpha < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilerek tüm hesaplamalar SPSS (version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL) istatistik programı ile yapılmıştır. Radyolojik, histolojik ve kemik yoğunluğu değerlendirmeleri sonucunda elde edilen devamlı değişkenlerin incelenmesinde ANOVA ve Tukey parametrik testleri ile Kruskal-Wallis non-parametrik testi kullanılmıştır. Gerçekleştirilen post-hoc kuvvet analizinde tüm parametrelerde istatistiksel geçerlilik olduğu belirlenmiştir (Tablo 3-5).

Tablo 3. Histolojik değerlendirme sonuçları. (Ortalama ve standart sapma)

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	kuvvet analizi
6. hafta	1±0.7	2.2±0.4	3.2±0.4	%99.9
12. hafta	1.8±0.8	3.2±0.8	4	%98.6

Tablo 4. Radyolojik değerlendirme sonuçları. (Ortalama ve standart sapma)

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	kuvvet analizi
6. hafta	0.4±0.5	1.4±0.5	3±0.7	%100
12. hafta	2.6±0.5	4.6±0.5	5.4±0.5	%100

Tablo 5. Kemik mineral yoğunluğu (DEXA) ölçümü sonuçları. (Ortalama ve standart sapma)

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	kuvvet analizi
6. hafta	0.10±0.01	0.12±0.02	0.16±0.01	%97.8
12. hafta	0.19±0.02	0.26±0.04	0.29±0.02	%99.5

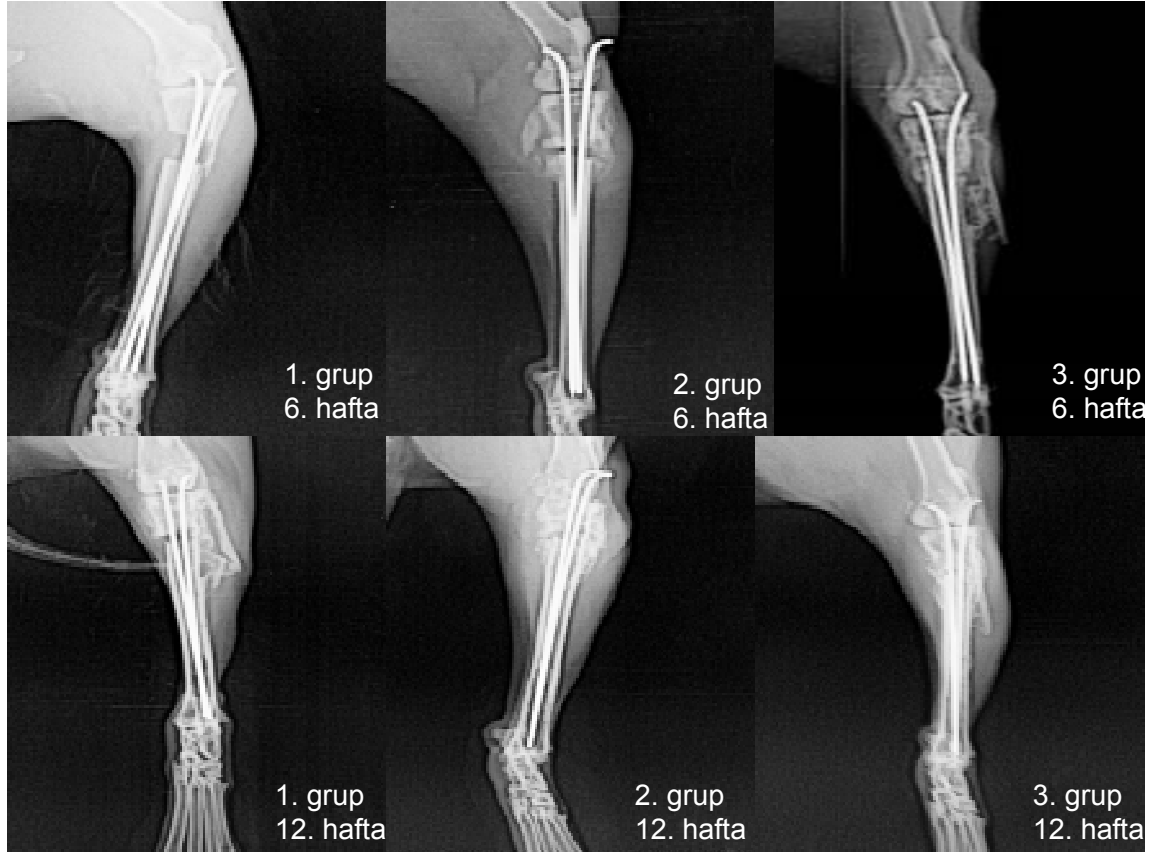
4. BULGULAR

1. grup ile 2. grup arasında radyolojik, histolojik ve DEXA sonuçları açısından sadece 12. haftada istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmiştir. Buna karşın 1. grup ve 3. grup arasında hem 6, hem de 12. haftalarda her üç açıdan da anlamlı fark olduğu gözlenmiştir (Resim 4, Grafik 2). 2. ve 3. gruplar arasında ise 6. haftada her üç açıdan da anlamlı fark olduğu belirlenmiştir (Tablo 6).

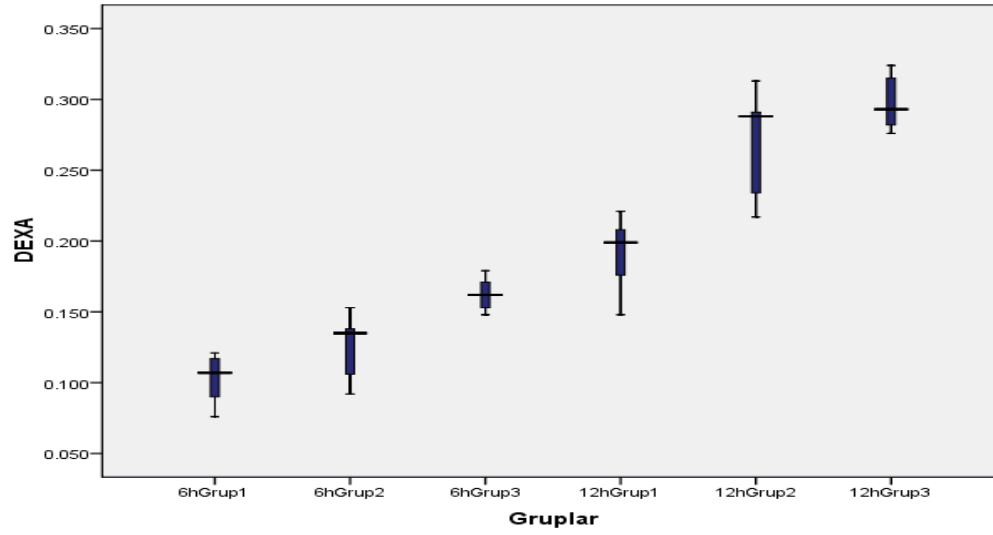
Tablo 6. Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi ile elde edilen p değerleri. (Tukey testi)

<i>Gruplar arası farklar</i>	RADYOLOJİK		HİSTOLOJİK		DEXA	
	6. hafta	12. hafta	6. hafta	12. hafta	6. hafta	12. hafta
1. grup – 2.grup	.055	.001*	.062	.018*	.202	.005*
1. grup – 3. grup	.000*	.000*	.000*	.001*	.001*	.000*
2. grup – 3. grup	.003*	.093	.034*	.195	.025*	.332

*: istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0.05).

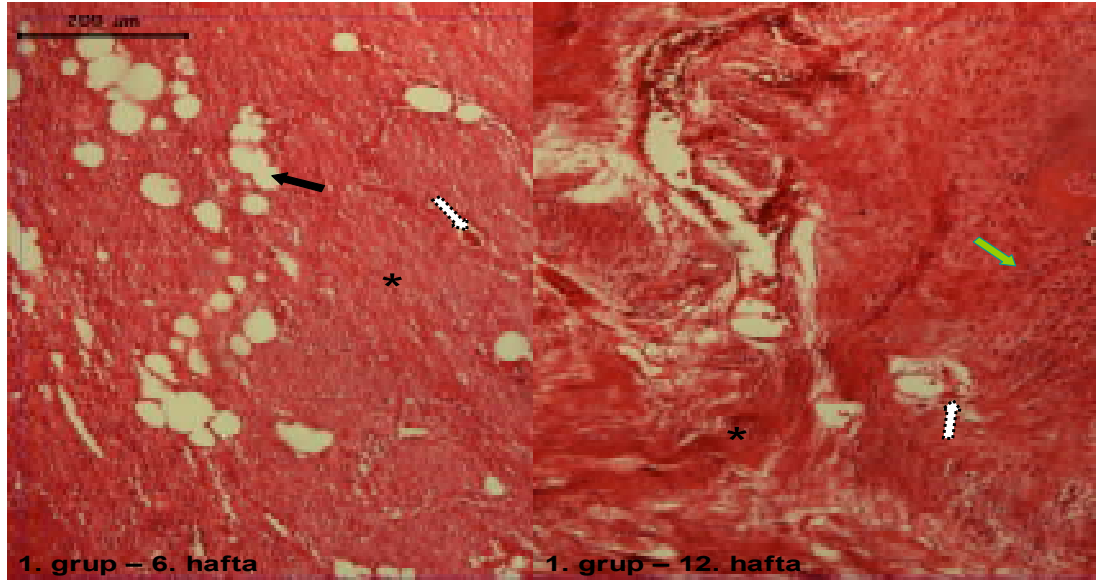


Resim 4. Elde edilen radyolojik iyileşme sonuçları.

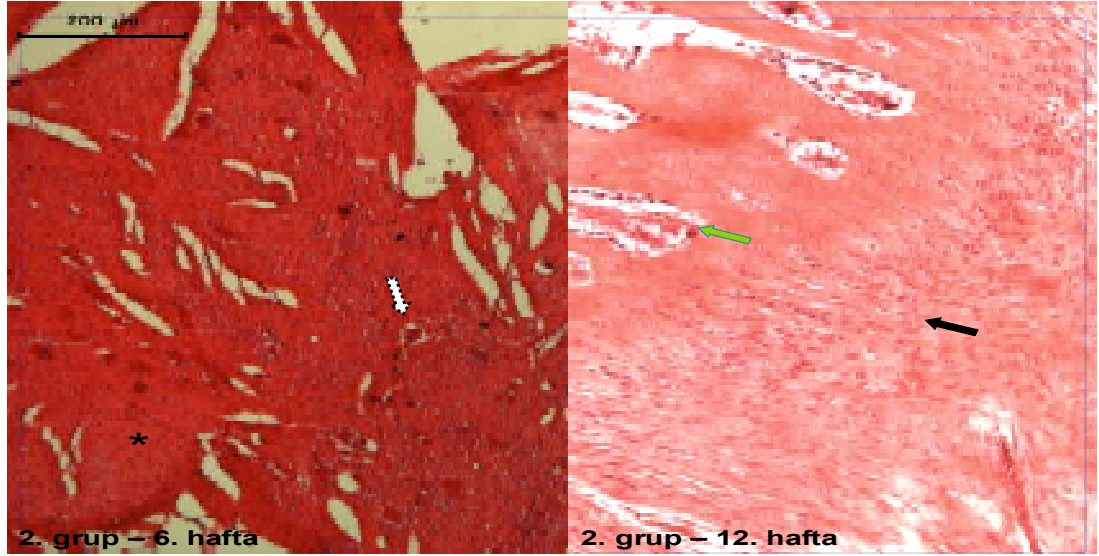


Grafik 2. Farklı zaman birimlerinde elde edilen kemik yoğunluğu değerleri.

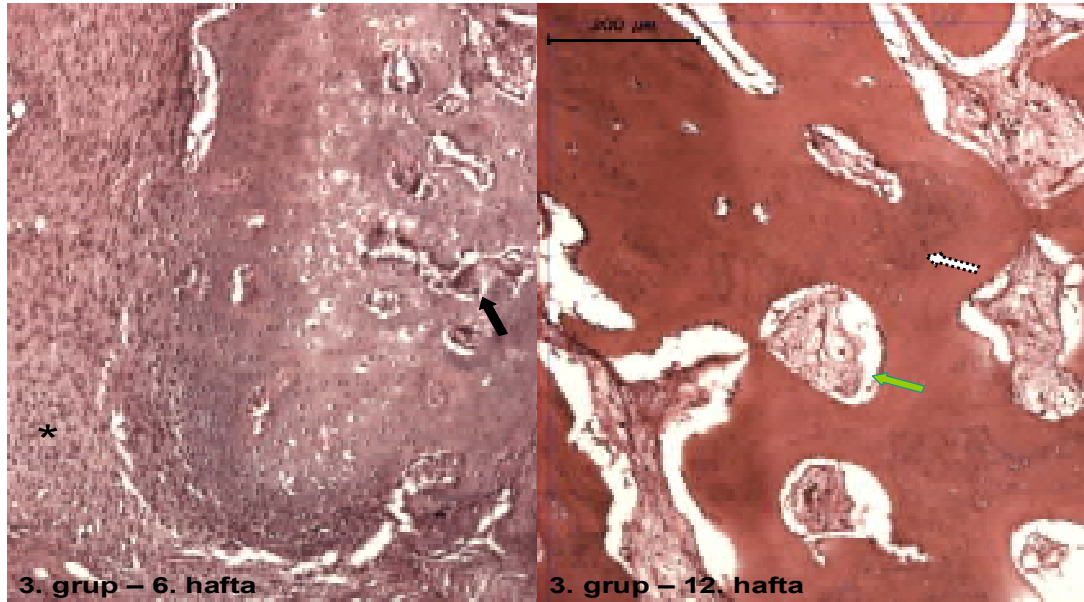
Histolojik değerlendirmede 1. grupta 6. haftada yer yer gevşek bağ doku oluşumu haricinde eşlik eden kaynama bulguları izlenmezken, 12. haftada çoğunlukla sıkı bağ doku, seyrek olarak da fibröz kaynamaya ait bulgular izlenmiştir. 2. grupta 6. haftada çoğunlukla fibröz doku ve yer yer kıkırdak oluşumu mevcutken, 12. haftada genellikle kaynamanın göstergesi olarak primer kemik trabeküllerine farklılaşmış alanlar olduğu gözlenmiştir. 3. grupta ise 6. haftada kıkırdak dokuya zaman zaman eşlik eden primer trabeküler yapı oluşumu görülürken, 12. haftada ise tüm kesitlerde tam kaynama ile uyumlu kompakt ve trabeküler kemik yapısı oluşumu dikkat çekmiştir (Resim 5-7).



Resim 5. Kontrol grubunda 6. haftada yer yer izlenen yağ hücreleri(siyah ok), kapiller(beyaz ok) oluşumu ve defekti tamamen dolduran bağ dokusu(*). 12. haftada alanın çoğunu kaplayan fibröz doku(*), az sayıda damar oluşumu(beyaz ok) ve bağ dokunun kondrositlere farklılaştığı(yeşil ok) bölge.



Resim 6. İkinci grupta 6. haftada fibröz doku(*) hakimiyetine ek olarak, damar gelişimine eşlik eden kondrosit oluşumu(beyaz ok).12. haftada ise kıkırdak dokunun kemik dokuya farklılaştığı geçiş dokusu(yeşil ok) ve primer trabeküller arasında kemik iliği oluşumu(siyah ok).



Resim 7. Üçüncü grupta 6. haftada bağ dokudan kıkırdak dokuya farklılaşma alanları(*) ve seyrek olarak primer trabekül oluşumu(siyah ok). 12. haftada tüm inceleme alanlarında osteoblastik aktivite artışı ve laküna oluşumuna eşlik eden(beyaz ok) kemik trabekülleri ve kemik iliği oluşumu(yeşil ok).

5. TARTIŞMA

Uygun klinik tedaviye ek olarak temelde kemik iyileşmesi dört ana faktöre bağlıdır: 1) mekanik stabilizasyon, 2) osteojenik hücreler, 3) osteokondüktif özellik içeren iskelet yapı ve, 4) büyüme faktörleri.¹³² Bunlara ek olarak kırık iyileşmesinde kritik rol oynayan diğer bir faktör de anjiyogenezdır. Anjiyogenezi yöneten iki ana hormonal mekanizma, VEGF ve Anjiyopoetin yolaklarıdır.^{7,133} Şu ana kadar yapılan araştırmalarda ise VEGF'nin bu konuda daha önemli bir rol üstlendiği anlaşılmıştır.¹³⁴

Çeşitli in vitro çalışmalarda VEGF'nin arter, ven ve lenfatiklerin yapıtaşları olan vasküler endotel hücrelerinin gelişimini uyardığı gösterilmiştir.¹³⁵ Anjiyogenez, avasküler kırık dokunun vasküler kemik dokuya dönüştüğü endokondral ossifikasyonda çok önemli bir rol oynamaktadır. Epifizyal büyüme plağında yer alan hipertrofik kondrositler bu aşamada VEGF salgılamakta, bu da metafizer damarların kırık dokunun içerisine büyümesi ve yeni kemik oluşumu ile sonuçlanmaktadır.¹³⁶ VEGF reseptör antagonistlerinin kullanıldığı bir çalışmada, kırık dokunun içerisinde vasküler doku gelişimi ve kemik oluşumunun baskılandığı izlenmiştir.¹²¹ Anti-VEGF tedavisinin sonlandırılması ile kapiller gelişimi, hipertrofik kırık rezorpsiyonu ve normal kemik gelişiminin tekrar oluştuğu gözlenmiştir. Buna ek olarak kırık modeli oluşturulan benzer deneysel çalışmalarda da VEGF antagonistlerinin atrofik karakterde bir kaynamama oluşturduğu gösterilmiştir.¹³⁷ Bu sonuçlardan da anlaşılabileceği üzere, VEGF her iki tip kemik iyileşmesinde de önemli rol oynamaktadır. Mevcut çalışmada ise VEGF eklenen grupta özellikle 6. haftada izlenen kaynama lehine sonuçlar da

yukarıdaki araştırma sonuçları ile paralellik göstermekte ve VEGF'nin özellikle erken kırık iyileşmesinde daha etkin bir rol üstlendiğini düşündürmektedir.

Literatürde VEGF'nin oluşturulan segmenter kemik defektlerinde kaynama üzerine etkisi, oluşturulan dört farklı deneysel model tipinde incelenmiştir. Bunlar; 1)VEGF antagonistleri ile yapılan çalışmalar, 2)VEGF etkisini gen transferi ve gen terapisi teknikleri ile artırmayı amaçlayan çalışmalar, 3)kırık bölgesine VEGF'nin bir matriks ile uygulandığı çalışmalar, 4)kırık bölgesinde lokal VEGF kullanılan çalışmalardır. Kullanılan matriks yapısına kimyasal anlamda VEGF'nin entegre edilmemesi ve mikroenjeksiyon yöntemi ile cerrahi uygulama öncesi yüklenmesinden dolayı mevcut çalışma bu gruplardan sonuncusuna dahil edilebilir ve bu grupta literatürde iki tane çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, Eckardt ve ark. tarafından 24 tavşanda oluşturulan tibia kaynamama modelidir.¹¹⁴ Bu çalışmada 3 grup oluşturulmuş ve bu gruplara otogreft, hyalüronik asit veya hyalüronik asit ile rhVEGF birlikte uygulanmıştır. Çalışma sonucunda VEGF ve otogreft uygulanan gruplarda biyomekanik özellikler açısından fark olmadığı, fakat oluşan kallus miktarı ve özelliğine ek olarak elde edilen kaynama açısından VEGF uygulanan grubun diğer gruplara oranla üstün olduğu izlenmiştir ve VEGF uygulanan gruptaki bütün osteotomi hatlarının, hyalüronik asit uygulanan gruptakilerin ise yarısının kaydığı gözlenmiştir. Mevcut çalışmada 6. haftada VEGF uygulanan grubun diğerlerine oranla kaynama ve kemik yoğunluğu açısından üstün olması, bu bulgularla paralellik göstermektedir. Ayrıca VEGF uygulanan gruba ait tibialarda makroskopik olarak gözlenen kallus boyutundaki artış da, VEGF'nin özellikle endokondral kemik oluşumunu artırdığını göstererek bu

sonuçları desteklemektedir. Kleinheinz ve ark. tarafından 56 tavşan ile gerçekleştirilen diğer bir kaynamama modelinde ise mandibulalarda bikortikal defektler oluşturulmuştur.¹³⁸ Denekler iki gruba ayrılarak ilk gruptaki defektler boş bırakılmış veya tip-I kollajen ile doldurulmuş, ikinci gruptaki defektler ise kollajen matriks ve rhVEGF ile doldurulmuştur. Çalışma sonucunda yeni kemik oluşumunun miktarı açısından gruplar arasında fark görülmezken, VEGF grubunda kemik yoğunluğu ve vaskülaritede artış izlenmiştir. Histolojik incelemede ilk iki haftada bütün gruplarda yeni damar oluşumunda artış izlenirken, bu süre sonrasında sadece VEGF grubunda vaskülaritede artışın devam etmesi dikkat çekicidir. Mevcut çalışmanın sonuçları da bu bulgu ile paralellik göstermektedir ve 6. haftada VEGF uygulanan grupta izlenen daha yüksek kemik yoğunluğu ve kaynama oranları, VEGF'nin kırık hattında özellikle geç enflamasyon fazında gösterdiği etkiye bağlanabilir. Bu etki sayesinde anjiyogeneze hem miktar olarak artmakta, hem de daha uzun süre devam etmekte; bu da kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkide bulunmaktadır.

Radyolojik ve histolojik açılardan VEGF uygulanan denek grubunda 6. haftada izlenen kaynama bulgularının diğer iki gruptan farklı olması, VEGF'nin anjiyogeneze ek olarak osteoprogenitör hücreler üzerindeki olası etkileriyle de kırık kaynamasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir ve bu bulgu, çeşitli araştırma sonuçlarına paralellik göstermektedir. Mevcut çalışmada VEGF grubunda özellikle 6. haftada izlenen anlamlı kemik mineral yoğunluğu artışı da, literatürde yer alan, VEGF'nin osteoprogenitör hücreler üzerine lokal bir etkiyle kırık iyileşmesini uyarabileceği tezini desteklemektedir. 12. haftada VEGF ve greft gruplarında elde edilen benzer sonuçlar

ise, VEGF'nin etkisini lokal uygulama ile sınırlı bir sürede (özellikle erken kırık iyileşmesi fazında) gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.

Denek sayısının azlığı, mevcut çalışmanın olumsuz yönlerinden birisi olarak eleştirilebilir. Ancak, her iki zaman dilimindeki sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, histolojik, radyolojik kriterler ve kemik yoğunluğu ölçüm değerleri açısından çalışmanın kuvvetinin post-hoc analiz ile yeterli (%80<) olduğu ortaya konulmuştur.

Tavşanlarda oluşturulan kaynamama modellerinde izlenen fibröz ve kırık dokular, kemik adacıkları, kapiller ve arteriyollerin insanlardaki atrofik ve hipertrofik kaynamamaya histolojik olarak benzediği gösterilmiştir¹³⁹ ve insandaki kaynamama tablosunu taklit eden bu modeller klinik uygulamada yol gösterici olarak kullanılmaktadır.⁴ Literatürde bu çalışmanın metodolojisine benzeyen araştırmalar yer almasına rağmen, mevcut çalışmanın orjinal yönleri bulunmaktadır. Bunlardan ilki, tavşan tibialarında oluşturulan segmenter defektlerde intramedüller fiksasyon eşliğinde oluşturulan kaynamama modelidir. Her ne kadar literatürde böyle bir metod tarif edilmemişse de; kontrol grubunda her iki zaman biriminde de histolojik, radyolojik ve yoğunluk ölçümü açılarından kaynama bulgularına rastlanmamış olması, hem deneysel kaynamama modeli anlamında yeni bir örnek ortaya koymakta, hem de bu modelin geçerliliğini kanıtlamaktadır. Mevcut çalışmanın diğer bir orjinal özelliği ise, yakın zamanda tasarlanan HA/Jelatin matriksin (kryojel) kullanılmasıdır. Literatürde bu konuda yapılan sadece bir çalışma vardır ve burada, sıçan kafataslarında oluşturulan kritik ebatlı defektler kryojel ile doldurulmuştur.¹²⁹ Sonuç olarak yeni kemik oluşumu

görülürken, kaynamada zamanla artış ve tam kaynamaya ise rastlanmamıştır. Mevcut çalışmada ise tavşan tibialarında oluşturulan deneysel kaynamama modelinde HA/Jelatin matriks kullanılarak defektler doldurulmuş ve 12. haftada kryojel uygulanan her iki grupta da kaynama olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bu da sahip olduğu üstün fiziksel özellikler ve osteokondüktif yapısı ile HA/jelatin matriksin, kemik defektlerinin tedavisinde sentetik kemik grefti olarak etkili bir biçimde kullanılabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Bu deney modelinde, rhVEGF yüklenmiş HA/jelatin matriksin segmenter kemik defektlerinin tedavisinde etkili olduğu ve kaynamayı sağladığı gösterilmiştir. Normal damar yapısı ve osteoprogenitör hücre kaynaklarının bulunmadığı kaynamama zemininde, uygun bir osteokondüktif biyomateryal eşliğinde kullanılması ile VEGF'nin tedavi etkinliğinin artırılabilceği göz önünde bulundurulmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- 1.** Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop 1998;355S:82-9.
- 2.** Strydom DJ. The angiogenins. Cell Mol Life Sci 1998;54:811-24.
- 3.** Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? Mech Dev 1999;87:57-66.
- 4.** Reed AA, Joyner CJ, Brownlow HC. Human atrophic fracture non-unions are not avascular. J Orthop Res 2002;20:593-99.
- 5.** Rockwood Jr CA, Green DP, Bucholz RW, Heckman JD. Fractures in adults, 4th ed, Philadelphia: Lippincott, 1996.
- 6.** Carter DR, Van der Meulen MC, Beaupre GS. Mechanical factors in bone growth and development. Bone 1996;18S:5-10.
- 7.** Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem 2003;88:873-84.
- 8.** Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM ve ark. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. Bone 1990;11:181-8.
- 9.** McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br 1978;60:150-62.
- 10.** Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop 1998;355S:7-21.

- 11.** Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg* 1991;73:832-47.
- 12.** Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995;10:1272-81.
- 13.** Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J ve ark. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signalling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 2003;18:1584-92.
- 14.** Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D ve ark. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16:1004-14.
- 15.** Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513-20.
- 16.** Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:165-70.
- 17.** Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355S:116-23.
- 18.** Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld L. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* 2003;90:1112-27.
- 19.** Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg* 2002;84:1032-44.

- 20.** Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36S:20-7.
- 21.** Phieffer LS, Goulet JA. Delayed unions of the tibia. *J Bone Joint Surg* 2006;88:206-16.
- 22.** Babhulkar S, Pande K, Babhulkar S. Nonunion of the diaphysis of long bones. *Clin Orthop Relat Res* 2005;431:50–6.
- 23.** Bellabarba C, Ricci WM, Bolhofner BR. Results of indirect reduction and plating of femoral shaft nonunions after intramedullary nailing. *J Orthop Trauma* 2001;15:254-63.
- 24.** Finkemeier CG, Chapman MW. Treatment of femoral diaphyseal nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 2002;398:223-34.
- 25.** Biasibetti A, Aloj D, Di Gregorio G, Massè A, Salomone C. Mechanical and biological treatment of long bone non-unions. *Injury* 2005;36S:45-50.
- 26.** Pape HC, Evans A, Kobbe P. Autologous Bone Graft: Properties and Techniques. *J Orthop Trauma* 2010;24S:36-40.
- 27.** Day S, Ostrum R, Clinton R. Bone injury, regeneration, and repair. In: Buckwalter J, Einhorn T, Simon S, eds. *Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000.
- 28.** Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, Weber T, Scharfenberger A, Haas NP ve ark. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone* 2006;39:1156-63.

- 29.** Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:77–86.
- 30.** Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987;18:187-96.
- 31.** Goldberg VM, Stevenson S, Shaffer JW, Davy D, Klein L, Zika J ve ark. Biological and physical properties of autogenous vascularized fibular grafts in dogs. *J Bone Joint Surg* 1990;72:801-10.
- 32.** Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg* 1975;57:237-52.
- 33.** Fleming Jr JE, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000;31:357-74.
- 34.** Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop Clin North Am* 1999;30:635-45.
- 35.** Sandhu HS, Grewal HS, Parvataneni H. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1999;30:685-98.
- 36.** Boden SD, Kang J, Sandhu H, Heller JG. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial. *Spine* 2002;27:2662-73.
- 37.** Burkus JK, Sandhu HS, Gornet MF, Longley MC. Use of rhBMP-2 in combination with structural cortical allografts: clinical and radiographic outcomes in anterior lumbar spinal surgery. *J Bone Joint Surg* 2005;87:1205-12.

- 38.** Makino T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH. Prevention of atrophic nonunion development by recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2005;23:632-8.
- 39.** Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg* 2001;83S:151-8.
- 40.** Ten Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BA. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg* 2003;85S:34-8.
- 41.** Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop* 1998;22:410-6.
- 42.** Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994;4:172-8.
- 43.** Dean DB, Watson JT, Moed BR, Zhang Z. Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture. *Front Biosci* 2009;14:2878-88.
- 44.** Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998;22:591-603.
- 45.** Fujii M, Takeda K, Imamura T, et al. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 1999;10:3801-13.
- 46.** Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* 1998;22:605-12.

47. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA ve ark. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 1996;13:291-300.
48. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg* 2001;83S:1-6.
49. Groeneveld EHJ, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000;142:9-21.
50. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A ve ark. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995;13:357-67.
51. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L ve ark. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg* 2003;85:1544-52.
52. Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE ve ark. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002;143:1545-53.
53. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J ve ark. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 2002;110:751-9.
54. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F ve ark. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and

necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 2002;106:2263-70.

55. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W et al. Structural basis of BMP signalling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein. *J Bone Joint Surg* 2003;85S:52-8.

56. Gazzero E, Gnagji V, Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 1998;102:2106-14.

57. Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-71.

58. Sandberg MM, Hannu TA, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 1993;289:292-312.

59. Barnes GL, Kostenuik LC, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805—15.

60. Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop* 1996;324:24-8.

61. Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone* 1995;16:455-60.

62. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, et al. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 1994;15:203-8.

63. Wang JS. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop Scand* 1996;269:1-33.

- 64.** Xu X, Weinstein M, Li C, Deng C. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and their roles in limb development. *Cell Tissue Res* 1999;296:33-43.
- 65.** Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodelling in experimental dog tibial fractures. *J Bone Miner Res* 1998;13:942-9.
- 66.** Shimasaki S, Ling N. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 1991;3:243-66.
- 67.** Canalis E. Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest* 1980;66:709-19.
- 68.** Prisell PT, Edwall D, Lindblad JB, et al. Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat. *Calcif Tissue Int* 1993;53:201-5.
- 69.** Asselmeier MA, Caspari RB, Bottenfield S. A review of allograft processing and sterilization techniques and their role in transmission of the human immunodeficiency virus. *Am J Sports Med.* 1993;21:170-5.
- 70.** Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:591-8.
- 71.** Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material: a randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg* 1997;79:495-502.

- 72.** Zerwekh JE, Kourosh S, Scheinberg R, Kitano T, Edwards ML, Shin D ve ark. Fibrillar collagen-biphasic calcium phosphate composite as a bone graft substitute for spinal fusion. *J Orthop Res* 1992;10:562-72.
- 73.** Carson JS, Bostrom MPG. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* 2007;38S:33-7.
- 74.** Partio EK, Tuompo P, Hirvensalo E. Totally absorbable fixation in the treatment of fractures of the distal femoral epiphyses. A prospective clinical study. *Arch Orthop Trauma Surg* 1997;116:213-6.
- 75.** Gross V, Brandes J. The ultrastructure of the interface between a glass ceramic and bone. *J Biomed Mater Res* 1981;15:291-305.
- 76.** Kinnunen I, Aitasalo K, Pollonen M, Varpula M. Reconstruction of orbital floor fractures using bioactive glass. *J Craniomaxillofac Surg* 2000;28:229-34.
- 77.** Peltola M, Suonpää J, Aitasalo K, Määttänen H, Andersson O, Yli-Urpo A ve ark. Experimental follow-up model for clinical frontal sinus obliteration with bioactive glass. *Acta Otolaryngol Suppl* 2000;543:167-9.
- 78.** Jonck LM, Grobbelaar CJ. The biological compatibility of glass ionomer cement in joint replacement. *Clin Mater* 1989;4:85-107.
- 79.** Brook IM, Hatton PV. Glass-ionomers: bioactive implant materials. *Biomaterials* 1998;19:565-71.
- 80.** Böhner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000;31:37-47.

- 81.** Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. Clin Orthop 1983;179:246-52.
- 82.** Dreesmann H. Über Knochenplombierung. Beitr Klin Chir 1892;9:804-10.
- 83.** Peltier LF. The Use of Plaster of Paris to Fill Defects in Bone. Clin Orthop 1961;21:1-31.
- 84.** Daculsi, G. Biphasic Calcium Phosphate Concept Applied to Artificial Bone, Implant Coating and Injectable Bone Substitute, Biomaterials 1998;19:1473-78.
- 85.** Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M ve ark. Skeletal Repair by in situ Formation of the Mineral Phase of Bone. Science 1995;267:1796-9.
- 86.** Kopylov P, Runnqvist K, Jonsson K, Aspenberg P. Norian SRS versus external fixation in redisplaced distal radial fractures. A randomized study in 40 patients. Acta Orthop Scand 1999;70:1-5.
- 87.** Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. J Am Acad Orthop Surg 1995;3:1-8.
- 88.** Sohier J, Daculsi G, Sourice S, de Groot K, Layrolle P. Porous beta tricalcium phosphate scaffolds used as a BMP-2 delivery system for bone tissue engineering. J Biomed Mater Res_A 2010;92:1105-14.
- 89.** Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. Compos Sci Technol 2005;65:2385-2406.

90. Deng X, Hao J, Wang CH. Preparation and mechanical properties of nanocomposites of poly(D, L-lactide) with Ca-deficient hydroxyapatite nanocrystals. *Biomaterials* 2001;22:2867-73.

91. Calandrelli L, Immirzi B, Malinconico M, Volpe MG, Oliva A, Ragione FD. Preparation and characterisation of composites based on biodegradable polymers for “in vivo” application. *Polymer* 2000;41:8027-33.

92. Evis Z, Sato M, Webster TJ. Increased osteoblast adhesion on nanograined hydroxyapatite and partially stabilized zirconia composites *J Biomed Mater Res A* 2006;78:500-7.

93. Hyakuna K, Yamamuro T, Kotoura Y, et al. Surface reactions of calcium phosphate ceramics to various solutions. *J Biomed Mater Res* 1990;24:471-88.

94. Blokhuis TC, Termaat MF, den Boer FC, Patka P, *Bakker FC, Haarman HJ*. Properties of Calcium Phosphate Ceramics in Relation to Their In Vivo Behavior. *J Trauma* 2000;48:179-86.

95. Supova M. Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. *J Mater Sci* 2009;20:1201-13.

96. Hench LL. Bioactive Bone Substitutes. In: Habal MB, Reddi AH (eds). *Bone Grafts and Bone Graft Substitutes*. Philadelphia:WB Saunders, 1992.

97. Yamamuro T. Bone Bonding Behavior and Clinical use of A-W Glass-Ceramic. In: Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG (eds), *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes*. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd, 1994.

- 98.** Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
- 99.** Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
- 100.** Testa U, Pannitteri G, Condorelli GL. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *J Cardiovasc Med* 2008;9:1190-221.
- 101.** Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
- 102.** Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 2000;6:1047-52.
- 103.** Bluteau G, Julien M, Magne D. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone* 2007;40:568-76.
- 104.** Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 2002;30:472-7.
- 105.** Wang DS, Miura M, Demura H. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 1997;138:2953-62.

- 106.** Mishima Y, Lotz M. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2008;26:1407-12.
- 107.** Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C ve ark. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res* 2009;27:1133-40.
- 108.** Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vécsei V, Aharinejad S. VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. *J Orthop Res* 2009;27:1293-7.
- 109.** Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 2005;36S:5-7.
- 110.** Street J, Winter D, Wang JH. Is human fracture hematoma inherently angiogenic?. *Clin Orthop Relat Res* 2000;378:224-37.
- 111.** Brighton CT, Krebs AG. Oxygen tension of nonunion of fractured femurs in the rabbit. *Surg Gynecol Obstet* 1972;135:379-85.
- 112.** Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54.
- 113.** Komatsu DE, Hadjiargyrou M. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone* 2004;34:680-8.
- 114.** Eckardt H, Ding M, Lind M. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:1434-8.

- 115.** Street J, Bao M, deGuzman L. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9656-61.
- 116.** Li R, Stewart DJ, Schroeder HP von. Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J Orthop Res* 2009;27:8-14.
- 117.** Shen X, Wan C, Ramaswamy G, Mavalli M, Wang Y, Duvall CL ve ark. Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. *J Orthop Res* 2009;27:1298-1305.
- 118.** Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129:989-97.
- 119.** Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19S:4-6.
- 120.** Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res* 1992;275:287-99.
- 121.** Gerber HP, Vu TH, Ryan AM. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-28.
- 122.** Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 2000;113:59-69.
- 123.** Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:223-8.

124. Matsumoto T, Cooper GM, Gharaibeh B. Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1. *Arthritis Rheum* 2009;60:1390-1405.

125. Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004;131:2161-71.

126. Murata M, Yudoh K, Masuko K. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthr Cartil* 2008;16:279-86.

127. Kloen P, Doty SB, Gordon E. Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. *J Bone Joint Surg* 2002;84:1909-18.

128. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003;8:980-9.

129. Bölgen N, Plieva F, Galaev IY, Piskin E, Mattiasson B. "Cryogelation" for preparation of novel biodegradable tissue engineering scaffolds. *J Biomater Sci Polymer Ed* 2007;18:1165-79.

130. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Recombinant human bone morphogenic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop* 1994;301:302-12.

131. 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;43:931-40.

- 132.** Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury* 2007;38S:3-6.
- 133.** Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 2007;38S:11-25.
- 134.** Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 2008;39S:45-57.
- 135.** Beamer B, Hettrich C, Lane J. Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. *HSS J.* 2009;9. [Epub ahead of print]
- 136.** Augustin G, Antabak A, Davila S. The periosteum. Part 1: anatomy, histology and molecular biology. *Injury* 2007; 38:1115-30.
- 137.** Dimitriou R, Tsiridis E, Carr I, Simpson H, Giannoudis PV. The role of inhibitory molecules in fracture healing. *Injury* 2006;37S:20-9.
- 138.** Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann HP. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1310-6.
- 139.** Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. The vascularity of atrophic non-unions. *Injury* 2002;33:145-50.

8. ÖZET

Ortopedik cerrahide, çeşitli nedenlerle karşılaşılan kemik defektlerinin tedavisinde greftlemeye başvurulmaktadır. Doku mühendisliği alanındaki gelişmeler, otojen greftlemeye alternatif olabilecek osteokondüktif yapıdaki sentetik greftlerin, kırık iyileşmesini uyarıcı kapasiteye sahip diğer faktörlerle birlikte kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu çalışmada da, anjiyogenez yolağını düzenleyerek kırık iyileşmesinde önemli bir rol oynayan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü(VEGF) yüklenmiş hidroksiapatit içeren jelatin matriks(scaffold)in segmenter kemik defektlerinin tedavisindeki etkinliğinin araştırılması planlanmıştır. Bunun için 30 adet iskelet gelişimini tamamlamış Yeni Zelanda tavşanının sol tibialarında proksimal metadiyafizer bölgede 1 cm. uzunluğunda kemik defektler meydana getirilerek kaynamama modeli oluşturulmuştur. Kirschner telleri ile uygulanan intramedüller fiksasyonu takiben denekler üç gruba ayrılmış ve ilk gruptaki (kontrol) defekt boş bırakılmış, ikinci gruptaki defekt sentetik kemik grefti ile doldurulmuş, üçüncü gruba ise VEGF yüklenmiş sentetik kemik grefti uygulanmıştır. 6. ve 12. haftalarda her gruptan 5 adet denek feda edilerek kırık iyileşmesi radyolojik, histolojik ve kemik mineral yoğunluğu (DEXA) ölçümü ile değerlendirilmiştir. 6. haftada tüm gruplar arasında her üç kriterde anlamlı farklar tesbit edilmiştir; VEGF uygulanan gruptaki kaynama diğer gruplardan daha iyi, sentetik greft uygulanan gruptaki kaynama da kontrol grubundan daha iyi olarak izlenmiştir. 12. haftada ise VEGF uygulanan grup ile greft uygulanan grup arasında hiçbir kriterde anlamlı fark tesbit edilemezken, bu iki grubun tüm kriterler

açısından kontrol grubundan daha iyi sonuçlara sahip olduğu belirlenmiş ve kontrol grubunda kaynama olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak bu deney modelinde, VEGF y klenmiş HA/jelatin matriksin segmenter kemik defektlerinin tedavisinde etkili olduğu ve kaynamayı sağladığı g sterilmiştir.

Anahtar kelimeler: VEGF, kemik grefti, kaynamama

9. SUMMARY

In the field of orthopedic surgery, bone grafting is usually administered in the treatment of bone defects which occur as a consequence of various conditions. The recent developments in tissue engineering have rendered the utilization of synthetic graft materials with osteoconductive properties possible. These synthetic graft materials may also serve as scaffolds with which other factors promoting bone healing may be used in conjunction. One of these factors is Vascular Endothelial Growth Factor that plays an important role in bone healing by regulating the angiogenesis. The aim of this study was to investigate the effectiveness of local VEGF administration with hydroxyapatite containing gelatin scaffold as the synthetic graft material in the treatment of critical-sized bone defects. For this purpose, an experimental non-union model was established by creating 10 mm. bone defects in the proximal tibiae of 30 skeletally mature New Zealand white rabbits. Following tibial intramedullary fixation, the rabbits were grouped into three: The defects were left empty in the first (control) group, the defects were grafted with synthetic scaffolds in the second group and synthetic scaffolds loaded with VEGF were administered at bone defects in the third group. 5 rabbits in each group were sacrificed on 6th and 12th weeks and new bone growth was assessed radiologically and histologically, well as with bone mineral density measurements (DEXA). On the 6th week, significant differences between each group in all three evaluation criteria were noted. VEGF administered group had significantly better scores compared with the other two groups. The second group also had significantly better scores than the control

group. On the 12th week, while no significant difference was noted between the second and third groups, these two groups both had significantly better scores in all three criteria compared with the control group. No signs of solid bony development was observed in the control group. In conclusion, the local administration of VEGF with hydroxyapatite containing gelatin scaffold as the synthetic graft material was effective in the treatment of critical-sized bone defects in this experimental model.

Keywords: VEGF, bone healing, non-union

10. EKLER

EK-1

<i>Tanım</i>	Puan
Defektin izlenmediği tam kaynama	6
Köprüleşmeye ek olarak en az bir kortekte yeni kemik oluşumu	5
Düzenli kalsifikasyona eşlik eden medial ve lateral köprüleşmeler	4
En az bir noktada köprüleşme	3
Yer yer kalsifiye alanlar mevcut ancak köprüleşme yok	2
Defekt içerisinde kalsifiye alanlar yok	1
Cerrahi sonrası erken dönemdeki görüntü ile aynı	0
Radyolojik değerlendirme kriterleri	

EK-2

Histolojik değerlendirme kriterleri

<i>Tanım</i>	Puan
Yumuşak doku olmaksızın kemik-greft arası doğrudan temas	4
Yüzeyinde osteoblast ve/veya osteoklastların yer aldığı lakünalar	3
Greft etrafında çoğunlukla fibröz doku kapsülü yer alması	2
Organize olmamış fibröz doku (kapsül şeklini almamış)	1
Enflamatuar hücre infiltrasyonu ile karakterize, organize olmamış yumuşak doku	0
Kemik-greft yüzeyindeki yumuşak doku cevabı	

<i>Tanım</i>	Puan
Çoğunlukla kemik	4
Kemik yanında yoğun özellikte, olgun fibröz doku	3
Fibroblast invazyonu eşliğinde olgun olmayan fibröz doku	2
Çoğunlukla enflamatuar hücre ve bağ doku komponentleri	1
Sadece enflamatuar hücre (kemik oluşumu yok)	0
Greft içerisindeki yumuşak doku cevabı	

<i>Tanım</i>	Puan
Defekt %75 ile %100 arasında kemik ile dolmuş	4
Defekt %50 ile %74 arasında kemik ile dolmuş	3
Defekt %25 ile %49 arasında kemik ile dolmuş	2
Defekt %1 ile %24 arasında kemik ile dolmuş	1
Defekt içinde kemik oluşumu yok veya sadece kenarlarda var	0
Defekt içerisinde kemik oluşumu	