

**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ABD**

**Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Mustafa YEL**

**TZP (trombositten zengin plazma) 'NIN KIRIK
KAYNAMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Arş. Gör. Dr. Yunus GÜZEL
(UZMANLIK TEZİ)**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Burkay Kutluhan KAÇIRA**

**KONYA
2011**

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Kemik Dokusu.....	2
2.1.1 Kemik Dokusunun Tanımı ve Genel Özellikleri.....	2
2.1.2 Kemik Histolojisi.....	2
2.1.3 Hücresel Biyoloji.....	3
2.1.4 Matriks	7
2.1.5 Kemik Dolaşımı	8
2.1.6 Kemigi Çevreleyen Dokular	10
2.1.7 Kemik Oluşum Tipleri	11
2.1.8 Kemik Yaralanması ve Tamiri	12
2.1.9 Kırık Kaynamasına Etkili Faktörler	15
2.2 Trombositler ve Trombositlerin doku iyileşmesine katılımı	20
2.2.1 Trombositlerin içerikleri ve fonksiyonları.....	21
2.3 Trombositlerin iyileşme ve doku rejenerasyonunda terapötik kullanımı...	26
3. MATERYAL ve METOD	29
3.1 TZP Hazırlanması	29
3.2 Denekler ve Anestezi	32
3.3 Cerrahi İşlem	33
3.4 Histopatolojik Değerlendirme	35
3.5 Radyolojik Değerlendirme	36
3.6 Mekanik Test	37
3.7 Ölçümler ve Hesaplamalar	39
3.8 İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41

5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ	62
7. ÖZET	63
8. ABSTRACT	65
9. KAYNAKLAR	67
10. TEŞEKKÜR	80

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Kemiğin vücutta görev aldığı çeşitli roller vardır. Kemikler, vücudun şekil almasından ve hayati organların korunmasından sorumludur. Bu önemli görevlerinin yanında kaslara ve tendonlara yapışma yeri sağlayarak harekette görev alır ve çeşitli mineraller için depo kaynağıdır. Kemik, çevre uyaranlara yanıt vererek sürekli remodelize olan ve kırık sonrası kendi kendini tamir etme özelliği olan bir dokudur(1).

Kırık, kemiğin yapısal olarak yetmezliğe uğramasıdır veya basitçe kemiğin fiziksel bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanabilir fakat sorun bu kadar basit değildir. Kırık oluşumu ile birlikte patoloji sadece kemik dokusuyla sınırlı kalmaz. Çevre yumuşak dokular, farklı organ sistemleri de bu olaydan olumsuz etkilenir. Kırıklar, geçici ya da kalıcı olarak fonksiyonel değişikliklere yol açabilirler. Bir uzvunu kullanma yeteneğinde azalma olduğunda, hasta fonksiyonel kayba uğrar, ailesinde ve toplumda oynadığı rolde değişiklik meydana gelir. Hatta kişinin yaşamını kaybetmesine neden olabilir. Kemik kırılması ve tedavi sürecindeki aşamalar kişiyi kötü yönde etkilediği gibi yapılan sağlık harcamaları da ekonomiyi olumsuz etkiler. Tüm bu olumsuzlukları giderebilmek ve kemiğin normal fonksiyonel anatomisine hızlıca kavuşmasını sağlamak için kırık iyileşmesinin nasıl olduğu ve hangi faktörlerin etki ettiğini iyi bilmek gerekir.

Kırık iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalar; kırığın tespit şekilleri, kırığı sistemik ve lokal etkileyen faktörler, kırık üzerine elektrik ve ses stimülasyonu, hiperbarik oksijen uygulaması ve uygulanabilir biyolojik ürünler üzerine yoğunlaşmıştır. Günümüzde trombosit zengin plazma (TZP) kemik rejenarasyonunu ve doku iyileşmesini hızlandıran ve sitümüle eden yeni bir preparat olarak düşünülmektedir. Bu özellikleri ve güvenilirliği nedeni ile ağız ve diş cerrahisi, ortopedi, genel cerrahi ve plastik cerrahi gibi bölümlerde; yara iyileşmesi, ülser tedavisi gibi birtakım medikal alanlarda çalışmalar yapılmaktadır(2).

Kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisi belirlendiği takdirde, geç kaynama ve kaynamamanın tedavisinde de kullanılabilir. Bu çalışmada amaç, TZP 'nın kemik kaynaması üzerine olan etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik dokusu

2.1.1 Kemik dokusunun tanımı ve genel özellikleri

Kemik, iskelet sisteminin en önemli yapı taşıdır. Yaşamsal organlara destek ve koruma sağlar, bazı temel iyonların vücuttaki konsantrasyonunun sağlanmasında görev alır ve son olarak üzerine yapışan kasların düzenli kontraksiyonu ile vücudun hareket etmesini sağlar (4,5).

2.1.2 Kemik Histolojisi

Kemik Tipleri

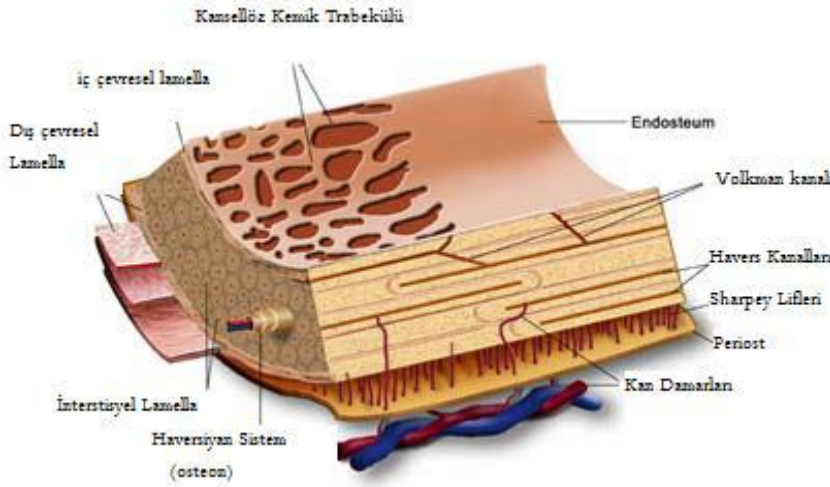
Kemik kortikal ya da spongioz olabilir. İmmatür ve patolojik kemik örgülü yapıdadır, normal kemik ise lameller yapıdadır. Örgülü kemik normal kemiğe göre fazla sayıda osteosit içerecek biçimde daha rastgele düzenlenmiştir. Yapım ve yıkım döngüsü artmıştır, daha zayıf ve esnektir. Lameller kemik strese dayanıklı iken örgülü kemik dayanıksızdır (6).

A. Kortikal Kemik

Osteonlar ya da arterioller, venüller, kapillerler, sinirler ve olasılıkla lenfatik kanalları içeren haversiyan (veya Volkmann) kanallarıyla bağlı haversiyan sistemlerinden oluşur. İskeletin %80' ini oluşturur. Osteonlar arasında intersitisyel lamellalar mevcuttur. Sement hatları osteonun dış sınırını belirler. Besin kaynağı intraosseoz dolaşımdır.

B. Spongioz Kemik (Süngerimsi, trabeküler)

Spongioz kemik, uzun kemiklerin uçlarında ve vertebralarda bulunur. Yoğunluğu daha azdır ve stres çizgilerine bağlı olarak daha fazla yeniden şekillenme meydana gelir (Wolff kanunu). Daha yüksek bir dönüşüm hızı vardır. Young modülüsü daha küçüktür, bu nedenle kortikal kemikten daha elastiktir (6). Trabeküler kemiğin plaklar halinde, birbiri ile bağlantılı, üç boyutlu dantele benzer yapı oluşturması, yüksek yüzey/alan oranı oluşturarak yüksek metabolik aktivite işlevi görür, aynı zamanda kemiğe yansıyan çeşitli yüklere (özellikle kompresif) karşı kemiğin dayanma gücünü de artırır (7).



Şekil 1: Matür kemik dokusunun mimari yapısı

2.1.3 Hücresel Biyoloji

A. Osteoblastlar

Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden gelişirler. Ortalama 1-10 hafta yaşarlar. 20-30 μm büyüklüğünde olup kemiğin yüzeyinde tabaka halinde bulunurlar. Osteoblastlar, osteosit ve ekstrasellüler matriks ile olan iletişimi transmembran proteinler ve integrinler vasıtasıyla sağlarlar.

Görevleri; kemik matriksindeki kollejen ve kollejen dışı protein senteziyle beraber, ekstrasellüler matriks fibrillerinin düzenini ve osteoid materyalin mineralizasyonunu sağlamaktır. ALP (alkalenfosfataz) enzimi sayesinde içerdikleri adenosintrifosfatın ortama saldığı Ca^+ iyonu ile bu mineralizasyonu sağlarlar. Sentezlediđi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler sayesinde osteoklastların rezorpsiyonuna aracılık ederler.

Osteoblastlar aktif olduktan sonra bir kısmı kemik yüzeyinde metabolizmasını yavaşlatıp istirahat hücresi olarak kalır. İstirahat halindeki az sayıda organel içerdikleri için yassılaşımlardır. Sialoprotein, osteonektin, osteopontin ve ALP sentezlerler. Osteoklastların kemik yüzeyinde yerleşmesine PTH etkisiyle aracılık ederler. Bir kısmı matriks sentezleyen osteosite dönüşür. Diğer bir kısmı da apoptozis ile ortamdaki kaybolur (8, 9, 10).

B. Osteositler

Osteositler kemiğin iç haberleşmesinden ve yeniden yapılanmadan sorumlu hücrelerdir. Kemiğe uygulanan fiziksel kuvvetlerin yorumlanması ve uygun cevabın verilmesini sağlarlar. (5, 11, 12, 13, 14).

Osteoblastlarca sentezlenen osteoid, kalsifikasyona uğrayıp hidroksiapatit kristallerini oluştururken bazı osteoblastlar kemik içinde kalarak organellerinden çoğunu kaybeder ve osteosite dönüşürler (15-18). Osteositler yassı elips şekilli, stoplazmik uzantıları olan, küçük tek çekirdekli hücrelerdir ve osteoblastlara göre daha az sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi aparatı içerirler. Daha yoğun çekirdek kromatini taşırlar (19). Osteosite dönüşen osteoblast sayısı kemik oluşum hızına bağlı olduğu için oluşum hızı arttıkça bölgedeki osteosit sayısı da artar (15-18). Bir insanda osteoblastlardan 10 kat fazla sayıda osteosit hücresi bulunur, tüm kemik hücrelerinde %90' ı osteosit hücresidir (8). Osteositler mineralize matriks içerisinde yer alırken osteoblast ve osteoklastlar kemik yüzeyinde yerleşmişlerdir (8, 9, 10). Osteositlerin ömrü birkaç yıl kadardır (17). Kronik kortikosteroid kullanımı, östrojen miktarında azalma, yaşlanma, kuvvete maruz kalma, osteosit ölümünü artırır (20, 23). PTH verilmesi ile ölümlerinin azaltıldığı bildirilmiştir (24).

Osteositlerin zamanla matriks üretme özellikleri kaybolur ve boyutları küçülür. Çevrelerindeki matriksi rezorbe ederek osteositik lakünleri oluştururlar. Oluşan her bir lakünde bir osteosit bulunur (25, 26). Kemiğin sert yapısı içinde yerleşmiş osteositler, lakünler sayesinde vücut sıvılarıyla ve diğer osteositlerle bağlantı halindedir. Osteositlerin gelişmiş sitoplazmik uzantılarıyla gerekli iyon ve metabolitlerin transferini sağlarlar.

C. Osteoklastlar

Hematopoetik mononükleer / fagositik seri hücrelerinden gelişen öncü hücreler, kemik yüzeyinde füzyona uğrayarak osteoklast olarak bilinen 10-12 çekirdekli dev hücelere dönüşürler. Makrofajlardan farklı olarak kıvrımlı sınırları, mitokondri ve vakuolden zengin sitoplazması, kalsitonin reseptörleri vardır ve asit fosfataz üretirler (27).

Osteoklast gelişimi için osteoblastik aktiviteye ihtiyaç vardır. Osteoblastlar tarafından salınan makrofaj koloni uyarıcı faktör, osteoklast farklılaşma faktörü, kalsitrol, PTH, interlökin 1, 3, 6 ve 11, TNF α (tümör nekroze edici faktör alfa), prostoglandin E2 osteoklastları aktive ederken, osteoblast kaynaklı osteoprotogenin (osteoklast inhibe edici faktör) , interferon γ , interlökin 4, 13, 18 inhibe eder.

Osteoklast sitoplazmanın uzantılarından oluşan fırçamsı kenar ve organelsiz boş bir alandan oluşur. Kemiğin yıkımı sırasındaki etkileşim fırçamsı kenarda olur ve bu alanı kontraktıl proteinlerden zengin organelsiz bir sitoplazmik alan (clear zone) çevreler.

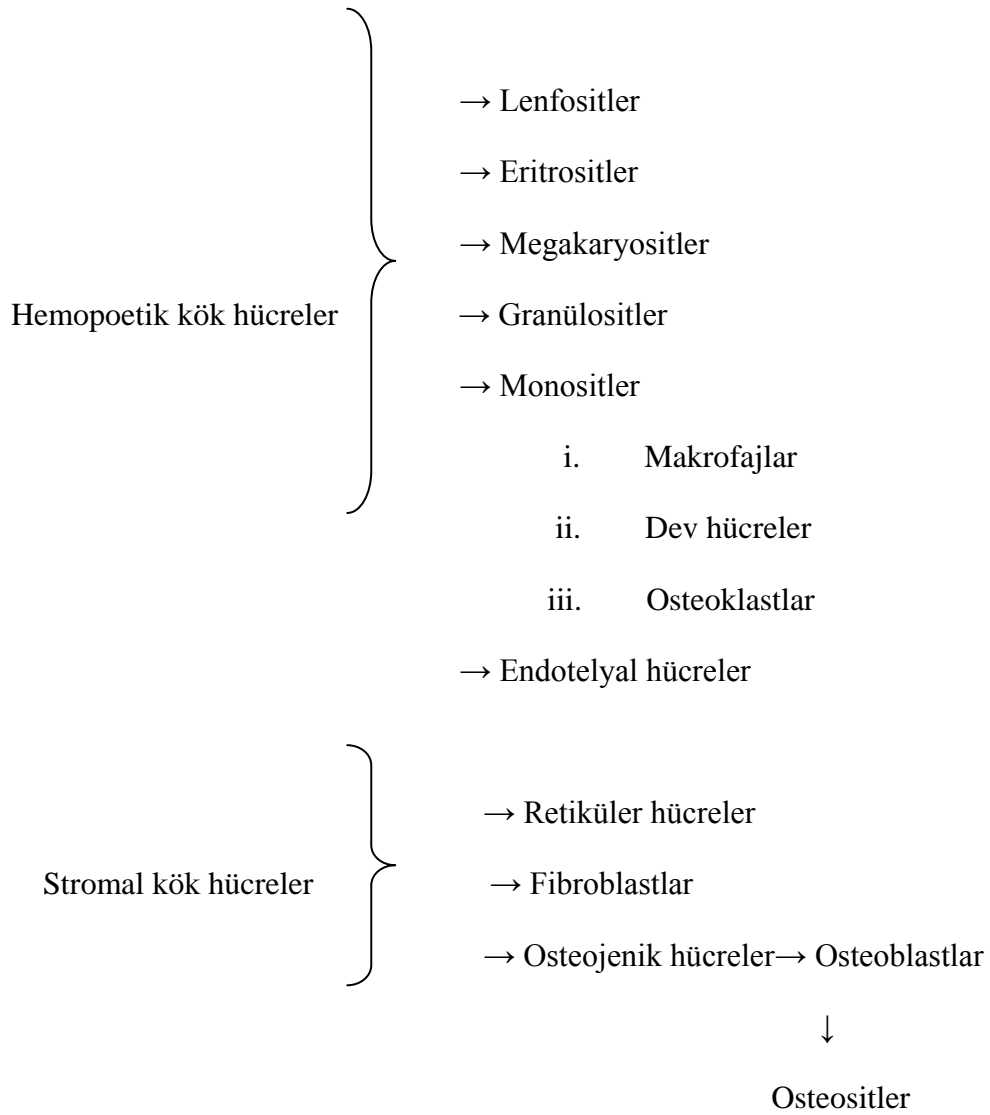
Kemik yıkım işleminin gerçekleştiği fırçamsı kenarda pH 3,5-4 arasında tutulur. Bu düşük pH osteoklastın H^+ pompası ve Cl/HCO_3 exchanger vasıtasıyla sağlanır. H^+ üretimine katkı sağlayan karbonik anhidraz bu bölgede yoğun olarak bulunur. Tartarata rezistan asit fosfataz fırçamsı kenarda yoğundur. Osteoklastın kemik yüzeyine yapışmasını sağlayan osteopontin ve kemik sialoproteini defosforile ederek tutunma gerçekleşir. Asidik ortamda kalsiyum ve fosfat çözünür. Geriye kalan organik matriks ise; asit fosfataz, aril sülfataz, beta-glukoronidaz, beta-gliserofosfataz, metalloproteaz, kollagenaz ve sirtomolizin gibi enzimlerle yıkılır. Osteoklastın trabeküler kemik yüzeyinde oluşturduğu rezorpsiyon kavitesine Howship lakünü denir. Bu kavite kortikal kemikte Haversiyen kanalını oluşturur.

Osteoklastın aktivitesini bifosfanat, kalsitonin, östrojen hormonu, $TGF\beta$ (Transforme edici büyüme faktör β) azaltırken, PTH, D vitamini ve tiroksin artırır (5, 27, 28).

D. Osteoprogenitör Hücreler

Mezenkim kaynaklı ana hücrelerin alt grubudur ve elektron mikroskobu ile çalışmalar sonucu 2 tipi belirlenmiştir. Birincisi endoplazmik retikulum ve az gelişmiş golgi cisimciği bulunan preosteoblastlardır. Bu hücrelerden osteoblastlar gelişir. İkinci ise osteoklastlara öncülük eden, belirgin mitokondri ve serbest ribozomları ile tanınan hücrelerdir. Özelleşmiş kemik hücreleri kemiğin oluşumundan, rezorpsiyonundan ve kemik yapısının devamlılığını sağlamaktan sorumludur (15). Bu hücreler uyarılmadıkları zaman kemik yüzeyi yakınlarında, periostun iç yüzeyinde, endosteumda ve Havers kanallarında bulunurlar. Kırık sonucu uyarıldıklarında, belirgin nükleuslu iğsi iri hücelere dönüşürler (29, 30, 31).

Osteoprogenitör hücrelerin her zaman mitoz bölünme özelliği ve kondroblast, osteoblast ve osteoklastlara farklılaşma yetenekleri vardır. Kemikteki iki ana hücre olan osteoklastlar ve osteoblastlar, hemopoetik ve stromal hücre sistemi olarak adlandırılan iki farklı hücre soyundan köken alırlar (32, 33, 34) (Şekil2).



Şekil 2 (35)

E. Kemik yüzeyini döşeyen hücreler

Osteoblastlar, kemik yüzeyinde aktif olmadıkları zamanlarda ince uzun sitoplazmaları ile istirahat halinde bulunurlar, bu nedenle kaplama hücreleri de denmektedir. Görevleri arasında; kemik ve çevresi arasında bariyer oluşturması, yeni kemik oluşumu ya da yıkım bölgesinin tayin edilmesi vardır(36).

2.1.4 Matriks

Kemik matriksi organik (%20) ve inorganik (%65) matriksten oluşur (8, 9, 37, 38). Kalan ağırlığın %10'unu su ve %5'ini ise diğer organik moleküller ve amorf inorganik tuzlar oluşturur (8, 9). Organik ve inorganik matriks birbirleriyle ilişki halindedir (9).

A. Organik Matriks

Organik matriksin %90'lık büyük bir bölümü kollajenden oluşup kemiğin gerilim direncini oluşturur. Kalan % 10'luk kısmı ise kollajen dışı proteinlerden oluşmaktadır (8, 9, 37). Kollajen içeriğinin büyük çoğunluğu Tip I kollajen oluşturur. Daha az oranda da Tip III, V, VI, XI, XII kollajen bulunur (8, 37). Tip I kollajen içeriğindeki aminoasitlerin özellikle de hidrosilizin ve hidrosiprolinin sayesinde tensil kuvvetlere karşı daha dayanıklı bir hal kazanır. Bu aminoasitlerdeki bir azalma veya yapısında bozulma olması kemik kırılma riskini artırır (8). Tropokollajen moleküllerinin birleşme yerlerinde 400 Å çapında gözenekler oluşur. Bu gözeneklere hidroksiapatit kristalleri depolanır (39).

Organik matrikste bulunan kollajen dışı proteinler (8, 9, 37, 40):

a. *Gamakarboksigliutamik asit (GKGA) içeren proteinler:* Osteokalsin ve GKGA olmak üzere iki tip proteinden oluşur. Osteokalsin osteoblast ve trombositlerce sentezlenen, sentezinde D ve K vitamini kullanılan, osteogenezisin biyokimyasal belirteci olan bir proteindir. GKGA ise K vitamini varlığında sentezlenen kalsiyum bağlayan bir proteindir.

b. *Proteoglikanlar:* Glikozaminoglikanlardan yani sülfatlanmış tekrarlayan karbonhidrat ünitelerinden oluşmuştur(25). Kollajen dışı proteinlerin % 10' unu oluşturur. Osteoid matrikste hyaluronik asit, kondroitin sülfat, biglikan ve dekorin olmak üzere dört tipi mevcuttur

c. *Glikoproteinler:* Osteonektin, kollajen dışı proteinlerin %25'ini oluşturur. Trombosit ve osteoblastlardan salgılanır. Matriks ve hücreler arası adezyonda önemli rol oynar. Osteopontin, fibronektin, kemik sialoprotein, trombospondin ve vitronektin hücre yüzey reseptörü olarak görev alırlar. Osteopontin kemik spesifik bir proteindir. Osteoklastların kemik yüzeyine tutunmalarını sağlar (25).

d. *Plazma proteinleri:* Albumin ve α 2-SH glikoprotein bulunur. Kalsiyum depolanmasında rol alırlar.

e. *Büyüme faktörleri*: Polipeptid yapıdadırlar.

TGF- β ; Kondrosit ve osteoblastlarda sentezlenerek encondral kemikleşme esnasında hücre dışı matrikste birikir. Kollajen, fibronektin ve proteoglikanların oluşumunu artırır. Proteolitik enzimleri baskılayarak granülasyon dokusu oluşumuna yol açar (41). Enflamasyon ve tamirde rol alır.

PDGF (Platelet kaynaklı büyüme faktörü); Trombosit, monosit, makrofaj ve endotelial hücreler tarafından sentezlenir. Hücre replikasyonunu indükler. Kemik oluşumunu arttırdığı da gösterilmiştir (42).

BMP (Kemik morfojenik protein); Hücre gelişimiyle beraber, doku ve organların sistemleşmelerini sağlar. Sayılan büyüme faktörleri dışında IL-1, 6 (interlökin), CSF (Koloni uyarıcı faktör) ve IGF-I,II (İnsuline benzer büyüme faktörü), FGF (Fibroblast büyüme faktörü), NGF (Sinir büyüme faktörü), EGF (Epidermal büyüme faktörü), CDGF (Kondroblast kaynaklı büyüme faktörü), MDGF (Makrofaj kaynaklı büyüme faktörü), ECGF (Endotelial hücre büyüme faktörü) bulunur (42).

B. İnorganik Matriks (Mineral faz)

Kemiğin kuru ağırlığının 2/3'ünü kemik minerali oluşturur (43). Kemik mineralleri kalsiyum, fosfat, karbonat, sodyum, potasyum, manganez ve floridden oluşur (8, 37). Bu mineraller kollajen fibrillerinin arasında ve içinde iğne, plak, çubuk, şeklinde küçük kristaller oluştururlar. Bu kristal yapısı kalsiyum hidroksiapatit [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] olarak isimlendirilir. Hidroksiapatit içinde bazen fosfat grubu yerine karbonat, hidroksil grubu yerine de klor ve flor bulunabilir. Bu değişimler kristalin çözünebilirlik gibi fiziksel özelliklerini değiştirebilir (43). Hidroksiapatit yüzeyindeki iyonlar suya doyurulduğu için kristalin etrafında su ve iyonlardan oluşmuş bir tabaka bulunur. Hidrasyon kabuğu denilen bu tabaka ile vucut sıvıları ile iyon dengesi sağlanır (44). İnorganik komponent kemiğin kompresif yüklere direncini sağlar (8).

2.1.5 Kemik Dolaşımı

A. Anatomi

Bir organ olarak kemikler, kardiyak çıkışın %5-10' unu alır. Uzun kemikler 3 kaynaktan beslenir;

a. Besleyici arter sistemi; Besleyici arterler ana sistemik arterlerden dallanır. Diafizer kortekse nutrient foramenden girerler ve sonra medüller kanala girerek inen ve çıkan küçük arterlere dallanırlar. Bu damarlar endosteal kortekste arteriollere dallanırlar ve Haversian sistemi içindeki damarlar aracılığıyla matür diafizer korteksin iç yüzünün en az üçte ikisini beslerler.

b. Metafizer- epifizer sistem; Periartiküler vasküler pleksustan doğarlar.

c. Periosteal sistem; Primer olarak matür diafizer korteksin en çok dış üçte birini besleyen kapillerlerden oluşur.

B. Fizyoloji

a. Akımın yönü; Matür kemikteki arteryel akım yüksek basınçlı besleyici arteryel sistemin ve düşük basınçlı periosteal sistemin net etkisinin bir sonucu olarak sentrifugaldır (içten dışa doğru). Endosteal sistemin bozulduğu tamamen deplase bir kırığındaki basınç değişimi tersine döner. Periosteal sistem basıncı baskın hale gelir ve kan akımı sentripedale dönüşür (dıştan içe doğrudur). Gelişmekte olan immatür kemikte arteryel akım sentripedaldir. Çünkü periost yüksek oranda vaskülarizedir ve kemik kan akımının baskın bileşenidir. Matür kemikte venöz akım sentripedaldir. Kortikal kapillerler daha sonra boşaltıcı venöz sisteme drene olan venöz sinuzoidlere drene olurlar.

b. Kemığın sıvı bileşenleri;

ekstravasküler	%65
Haversiyan	%6
Laküner	%6
Kırmızı kan hücreleri	%3
Diğer	%20

c. Kemik kan akımındaki fizyolojik durumların etkileri; Hipoksi, hiperkapni, sempatektomi kan akımını artırır.

C. Kırık iyileşmesi sırasında kan akımındaki değişimler; Kemik kan akımı kırık iyileşmesinin ana belirleyicisidir. Kırık bölgesinde oluşan damar yaralanmasına bağlı olarak gelişen ilk tepki kemik kan akımında bir azalmanın olmasıdır. Saatler ya da günler içinde kemik kan akımı artar. İki haftada zirve yapar ve 3-5 ayda normale döner. Oymasız intramedüller çivilerin en büyük avantajı endosteal kan akımının korunmasıdır. Kanalın oyulması korteksin iç %50-80'ini devaskularize eder. Bu, endosteal kan akımının revaskularizasyondaki gecikmenin en önemli sebebidir.

D. Düzenleme; Kemik kan akımı metabolik, humoral ve otonomik sistemlerin kontrolü altındadır. Kemiğin arteriyel sisteminin oldukça önemli bir vazokonstriksiyon ve daha az bir vazodilatasyon potansiyeli vardır. Kemik içindeki damarlar pek çok vazoaktif reseptörler içerir. Bu reseptörler gelecekte kemik kanlanmasındaki bozukluklara bağlı gelişen kemik hastalıklarının farmakolojik tedavisinde faydalı olabilir (45).

2.1.6. Kemiği Çevreleyen Dokular

A. Periost

Eklem yüzleri hariç kemiklerin dış yüzeyini örten osteojenik bağ doku yapısına periost denir. Dış ve iç olmak üzere iki tabakadan oluşur.

Periostun kemiğe bakan iç yüzü mikrovasküler açıdan ve hücre sayısı bakımından daha zengindir. Kambiyum da denilen iç tabakada osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, fibroblastlar, sempatik sinirler bulunur (30,46).

Periosteal hücreler kemik çapının arttırılmasında matriks sentezleyerek, kırık iyileşmesinde ise hyalin kırıkta sentezleyerek ekstraossöz kallus oluştururlar (8). Periostun kalınlığı ve hücre sayısı çocuklukta fazla iken, yaş ilerledikçe azalır (8, 38).

B. Kemik iliği

Öncü hücrelerin kaynağıdır, kemiğin iç çapını kontrol eder.

a- Kırmızı ilik hematopoetiktir (%40 su, %40 yağ, %20 protein). Yaşlanmayla birlikte kırmızı ilik önce appendiküler iskelette (ekstremitelerde) sonrada aksiyel iskelette sarı iliğe dönüşür.

b- Sarı ilik inaktiftir (%15 su, %80 yağ, %5 protein) (47).

2.1.7. Kemik oluşumu tipleri

A. Enkondral kemik oluşumu

Embriyolojik yaşamdan büyüme tamamlanıncaya kadar iskeletin kıkırdaktan oluşmuş kısımlarının kemik yapıya dönüşmesi olayına endokondral kemikleşme denir. Doğum sonrası stabil olmayan kemik kaynaması da aynı yolla olur (9, 38, 48). Enkondral kemik oluşum örnekleri; embriyonik uzun kemik oluşumu, uzun kemiklerin boyuna büyümesi, demineralize kemik kullanılarak oluşan kemik (47).

B. Embriyonik uzun kemik oluşumu

Genellikle intrauterin 6. haftada mezenkimal taslaktan oluşur. Enkondral kemik oluşumu embriyonik uzun kemik oluşumundan sorumludur. Yaklaşık 8. haftada mezenşimal modeli vasküler tomurcuklar işgal ederek osteoblastlara dönüşen ve primer kemikleşme merkezlerini oluşturan osteoprogenitör hücreleri getirirler. Kıkırdak modeli büyümesi appozisyonel ve intersitisyel büyüme ile olur. Kıkırdak taslağının merkez kısmının kapiller tomurcuklarla gelen miyeloid öncü hücrelerce rezorbsiyonu sonucunda kemik iliği oluşur. Kemik uçlarında sekonder kemikleşme merkezleri oluşur ve bunlar immatür kemiklerin uzunlamasına büyümesinden sorumlu olan epifizer büyüme merkezlerini meydana getirir. Bu büyüme süreci sırasında epifizer arter, metafizer arterler, besleyici arterler ve perikondral arterlerden oluşan zengin bir arteryel kaynak vardır (49).

C. İntramembranöz kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme kıkırdak bir model olmadan kemik oluşumudur (50). İntramembranöz kemikleşmenin olacağı bölgedeki mezenkim hücrelerinden fibroblastlar gelişerek kollojen sentezlerler. Fibriller yapıdaki kollojenin membran yapısı oluşturmamasından dolayı bu adı almıştır. Bu membran içindeki mezenkim hücrelerinden osteoblastlar farklılaşır. Osteoblastlar organik matriks sentezine başlarlar. Bir kısım osteoblast, sentezlenip kalsiyum yoğunluğu artmış olan matriks içinde kalarak osteosite dönüşür. Kemikleşmenin başladığı bu ilk yapı primer kemikleşme merkezi olarak adlandırılır. Bu merkezlerin histolojik görünümüne spikül (iğnecik) adı verilir. Spiküller aralarında kapiller ve diğer hücrelerin bulunabileceği ağsı yapı oluştururlar. Bu ağsı alanda kemik iliği gelişir (51).

Büyüme tamamlanıncaya kadar kafatası sürekli genişlemektedir. Çap artışının sağlanması için kemiğin iç yüzeyinde konumlanmış osteoklastların kemik rezorbsiyonu yapması, dış yüzeyinde yerleşen osteoblastların da bu oranda sentez yapması gerekmektedir (52).

Bağ dokusunun kemikleşmeye katılmayan bölümleri periost ve endosteumu oluştururlar. Distraksiyon osteogenezisinde de kemikleşme aynı mekanizma ile olur. Kırıkta model olmaksızın kollojenin kalsifiye matrikse dönüşümü ile gerçekleşir (48, 53).

D. Apozisyonel Kemik Yapımı

Kemiğin enine genişlemesi ve yeniden şekillenmesi bu şekilde olur. Periost ile çevrili kemiklerde, periost içindeki osteoblastlarca sentezlenen osteoid ile tabakalar halinde yeni kemik oluşumu gerçekleşir. Yeniden şekillenme de gerekli sahalarda osteoblastik aktivasyonla osteoid sentezi yapılır (48).

2.1.8. Kemiğin yaralanması ve tamiri

Dıştan ya da içten gelen kuvvetler sonucunda kemiğin anatomik bütünlüğünde bozulma olmasına kırık denir (54). Çoğu dokudan farklı olarak kemik dokusu skar bırakmadan aslına en yakın şekilde iyileşir (55, 56, 57). Kırık iyileşmesi kırığın oluştuğu andan itibaren başlar ve kemik eski halini alıncaya kadar devam eder (54). Kırık iyileşmesinin 2 tipi vardır: Primer ve sekonder (58, 59, 60).

A. Primer kırık iyileşmesi

Kırık uçlarının tam redüksiyonu sonrası görülen iyileşme türüdür. Kallus oluşumu görülmez. Bu nedenle rejenerasyon, fibröz ve kondral iyileşme safhaları olmadan doğrudan kemik oluşumu görülür. Kırık hattında canlı osteojenik hücrelerden osteoklast ve osteoblast farklılaşması olur. Osteoklastlar Havers kanallarını genişletirler. Osteoblastlarda genişleyen bu kanallara yerleşerek konsantrik lamellar kemik oluştururlar. Periost reaksiyonu görülmez (61, 62).

B. Sekonder kemik iyileşmesi

Kırık iyileşmesi kallus gelişimi ile olur. Embriyolojik kemik oluşumuna benzediği için enkondral kemikleşme de denir (63). Bu iyileşme sürecindeki her faz bir önceki ve bir sonraki fazla iç içedir (4,63).

Cruess ve Dumart' a göre sekonder kırık iyileşmesi 3 evrede oluşur (65) :

- Enflamasyon
- Onarım
- Yeniden şekillenme (Remodeling)

Enflamatuar dönem

Akut inflamasyon hücrelerinin kırık bölgesine yayılmasından dolayı bu isim verilmiştir (66). Birkaç gün süren bu dönemde sırasıyla vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, pıhtı oluşumu, fagositoz, yeniden damarlanma ve granülasyon dokusunun oluşumu görülür (65). Kırık oluştuktan sonra periost ve endosteum yırtılmış, bölgeyi çaprazlayan kan ve lenf damarları hasarlanmıştır. Hasarlı dokulardan açığa çıkan sıvılar neticesinde hematoma meydana gelir. Bu hematoma çevre yumuşak dokularca sarılır. Hematomun içi hipoksik ve asidiktir. Trombositlerce kanama durdurulur ve nekrotik pıhtı oluşturmak üzere fibrin depo edilir (67, 68). Nekroz oluşmaya başladıkça ortama kalsiyum salınmaya başlar. Kırık bölgesindeki osteoblast ve osteositler ölür. Kırık uçları rezorbe olmaya başlar. İlk birkaç saat içinde oluşan fibrin ağı üzerinde osteojenik hücre proliferasyonu başlar.

Onarım dönemi

Onarım evresi enflamatuar evrede oluşan hematomun organize olmasıyla başlar. Organize hematomun kallusa dönüşümü ile devam eder. Kırık hematomu içindeki öncü hücreler lokal uyarıların etkisiyle fibroblast ve diğer hücelere farklılaşırlar. Bu sayede hematoma organize olmaya başlar. Farklılaşma sonrası oluşan osteoblast ve kondroblast gibi hücrelerin aktiviteleri lokal ve sistemik mediatörlerce kontrol edilir. Osteoprogenitör hücreler vasıtasıyla hematoma artık oluşmuş ve daha stabil olan granülasyon dokusu gelişmiştir (36, 62, 64, 69)

Periostun derin tabakalarında hızla gelişmeye başlayan osteoprogenitör hücreler hacimce artıp periostun kemikten ayrılmasına neden olur. Osteojenik hücreler hızla çoğalırken kapiller tomurcuklanmada buna eşlik eder. Kapiller tomurcuklanmaya öncülük eden periosteal damarlardır. Osteojenik çoğalma kapasitesi damarlanma hızından daha fazla olduğu için periosta uzak kısımlardaki hücreler iskemik kalır. İskemik bölgede hücre farklılaşması kondrosit yönünde olduğu için kallusun çevresi kırıkta matris ile sarılır. Periosta yakın kısımlarda ise osteoblastlar osteoid sentezlerler (62, 64, 69, 70).

Kallus oluştuktan sonra mineralize olmaya başlar. Osteoblastlarca matris vezikülleri salınır. Bu veziküllerde lipid, yoğunlaşmış kalsiyum fosfat, alkalin fosfat, alkalin adozintrifosfat ve pirofosfat enzimleri bulunur (36, 51, 69, 71, 72, 75).

Kalsifikasyonu inhibe eden pirofosfatlar, pirofosfat ile parçalanır ve mineralizasyon başlar. Kalsiyumun çökmesi için gerekli fosfat alkalin fosfat aracılığıyla sağlanır (61,74).

Organik matriks içinde bu veziküller parçalanır. Vezikül içindeki kalsiyum konsantrasyonunun artışıyla kristalizasyon oluşur. Büyüyen hidroksiapatit kristalleri vezikülü parçalayarak matrikse dağılır (51).

Kallusun kalsifiye olması sonrası matriks içinde kalan osteoblastlar osteosite dönüşerek trabeküler ağı yaparlar. Bu dönüşüm arttıkça trabeküller genişler. Bu iyileşme şekli intramembranöz kemikleşmedir (36, 51, 69, 72).

Kıkırdak doku içinde alkalen fosfataz salgılanmasıyla matriks kalsifiye olur. Kondrositler diffüzyonla beslendikleri için bu kalsifiye ortamda yaşayamazlar. Kondroklastlar bu ölü kondrositleri sindirir ve lakün adı verilen boşluklar oluşur. Bu laküner boşluklara kılcal damarlar ve kemik hücreleri girer. Kalsifikasyon olmadan yeni damar oluşumu olmaz. Osteoblastlar bu boşluklarda osteoid sentezlemeye başlarlar (75).

Yeniden Şekillenme

Kırık uçları kallus ile sıkıca stabil hale getirildikten sonra, sıra bu tamir dokusunun fazlalık kısımlarının resorbe edilmesine gelir. Bu iyileşmenin en uzun dönemidir. Yıllarca sürebilir. Kemik uçları arasındaki stres aktarım yolundaki trabeküler kemik yerini kompakt kemiğe bırakır. Bu değişim aktivasyon, rezorpsiyon ve formasyon şeklinde sıralanabilir.

Osteoblastlar PTH tarafından uyarılınca kemiğin belirli bölgesinden çekilirler ve bu boşluklara osteoklastlar yapışırlar (76). Rezorpsiyon yaptıktan sonra yerlerini tekrar osteoblastlara bırakırlar (77).

Kemiğin eski şeklini almasında Wolf kanunu olarak bilinen histolojik değişimlerin rolü vardır. Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks tarafı pozitif, konkav tarafı ise negatif yükü yüklenir. Bu olay piezoelektriksel yüklenmedir. Pozitif yük osteoklastları uyararak kemik resorpsiyonunu, negatif yük osteoblastları uyararak kemik sentezini artırır.

Hueter-Volkman yasası mekanik faktörlerin uzunlamasına büyüme, kemik yeniden şekillenmesi ve kırık onarımını etkileyebildiğini öne sürer. Kompresif kuvvetler büyümeyi engeller ve tensil kuvvetler büyümeyi uyarır (78).

2.1.9. Kırık kaynamasına etkili faktörler

Kırık iyileşmesi fazları mediatör mekanizmalar aracılığı ile kontrol edilir. Bu mediatörlerin seviyesi ve aktivitesini değiştiren lokal ve genel faktörler vardır (55, 70, 79).

A. Lokal Faktörler

Travmanın derecesi ve etkisi

Travmanın şiddetine bağlı olarak kemik ve yumuşak doku hasarı oluşur. Hasarın büyüklüğüne bağlı olarak oluşan nekrotik doku miktarı iyileşme için gerekli mezenkimal hücre göçü ve vasküler invazyon için bir engel oluşturur (42). Açık kırıklarda hematomun dışarı boşalması ve enfeksiyon riskinden dolayı kaynama olumsuz etkilenir (38,79).

Kırık uçlarının birbirine göre konumu

Kırık uçları birbirinden ne kadar uzaksa kaynama da o oranda yavaş olur. Çünkü kırık uçları arasındaki kallusun kanlanması periosttan kaynaklanan yeni damarların gelişmesiyle mümkündür (80). Kırık kemik uçları arasına yumuşak doku girmesi de kaynamayı geciktiren bir faktördür (38).

Kırık yerinin kanla beslenmesi

Aşırı cerrahi diseksiyon ile kanlanması bozulan ve kanlanması sınırlı olan kemiklerin (skafoïd, talus, tibia distal 1/3' ü) kaynaması daha geç olur (38, 79).

Kırılan kemiğin türü

Kırılan kemiğin spongioz ya da kortikal olması da kaynamayı etkiler. Spongioz kemik yüzey alanı fazla, hücresel bakımdan zengin ve kanlanması iyi olduğu için daha kolay iyileşir (52).

Kırığın şekli

Segmenter kırıklarda intramedüller kanlanma da etkilendiği için kaynama daha geç olur (81). Spiral ve oblik kırıklarda kaynama yüzey alanı geniştir, kaynama hızlıdır. Bu kırıklarda damarlar aynı seviyede yaralanmadığı için beslenmede transvers kırığa göre daha iyidir (80).

Eklem içi kırıklarda çoğunlukla açık redüksiyon gerektiği için lokal kanlanma bozular. Eklem sıvısının enzimatik içeriği de bu tür kırıklarda kaynamayı olumsuz etkileyen bir diğer nedendir (38, 79).

Enfeksiyon

Kırık hattında enfeksiyon olması iyileşme hücrelerinin beslenmesini engeller. Ortamda oluşan nedbe ve fibröz doku iyileşmeyi geciktirir (44).

Lokal patolojik koşullar

Kemiğin mukavemet yeteneğinin kaybolmasına bağlı olarak küçük bir travma ile kırık oluşabilir. Bu tip patolojik kırıklara; dejeneratif, metabolik, enfeksiyöz durumlar, radyoterapi ve tümör sonrasında da rastlanır. Kemikte enfeksiyon ya da malign tümör olduğunda iyileşme hücreleri gerektiği şekilde görev yapamazlar. Bu gibi patolojik kırıkların tedavisinde öncelik altta yatan nedeni ortadan kaldırmaktır. Osteoporozun kırık kaynamasına olumsuz etkisi yoktur. Fakat temas yüzeyi azlığı nedeniyle ve kemik kalitesine bağlı fiksasyon kaybından ötürü kaynama geç olur (38, 79).

Radyoterapi kemik iyileşmesini olumsuz etkiler. Işınlama sahasında hücre ölümü, damarlarda tromboz, kemik iliğinde fibrozis oluşturması nedeniyle iyileşme gecikir ya da durur (82).

B. Genel Faktörler***Yaş***

İskelet gelişimi tamamlandıktan sonra yaş ile kırık kaynaması arasında bir bağlantı kalmaz. İnfantlardaki kaynama hızı adölesanlara, adölesanlardaki kaynama hızı ise erişkinlere göre fazladır. Bunun nedeni yeni damar oluşum hızının ve farklılaşmamış mezenkimal hücre sayısının fazla olmasıdır (56).

Genel durum

Diyabet, raşitizm, anemi, tüberküloz gibi hastalıklar ve beslenme bozuklukları kırık iyileşmesini geciktirir. Dolaşım sistemi hastalıklarındaki hiperemi kemikleşmenin azalmasına ve osteoporozu neden olur (56). Diyabetiklerde encondral kemikleşme sırasında mezenkimal hücre gelişmesinin inhibe olduğu ve kırıkta oluşumunun geciktiği bildirilmiştir (42).

Beslenme de kırık iyileşmesini etkiler. Doku yapımı için protein ve sentez işlemi için de enerji gereklidir. Tek bir uzun kemik kırığının iyileşmesi metabolizmaya %20-25 enerji yükü getirir (86).

Hormonlar

PTH vücutta kalsiyum dengesini sağlayan temel hormondur. Kemik rezorpsiyonunu, böbrekten kalsiyum geri emilimini ve böbrekte kalsitrol yapımını artırarak serum kalsiyum düzeyini korur. Aralıklı verildiğinde kemik yapımını uyarır, ancak yüksek konsantrasyonda

kollajen yapımını baskılar. Devamlı verildiğinde osteoklastlar aracılığı ile kemik yıkımını artırır (87). PTH nun osteoklast sayısını artırıcı, kemiğin yeniden şekillenmesini uyarıcı ve osteositleri uyurarak osteolizi hızlandırıcı etkileri vardır. PTH kemikteki rezorpsiyon etkisini osteoblastlar üzerinden gösterir. İnaktif osteoblastlar PTH sayesinde aktif hale gelerek kemik yüzeyinde osteoklastların yapışabilecekleri bir boşluk hazırlarlar (56,88).

Kalsitonin özellikle tiroidin parafoliküler-C hücrelerinde sentez edilir. Kalsitoninin en önemli etkisi plazma Ca^{+} konsantrasyonunu düşürmektir. Ekstrasellüler Ca^{+} düzeylerindeki artış kalsitonin sekresyonunu uyarır. Paratiroid hormonunun etkilerine zıt yönde çalışır. Bu da osteoklastik aktiviteyi ve kalsiyumun kemikten mobilizasyonunu inhibe eder. Kemik yapımını artırır (56, 79, 88).

İnsülin anabolik bir hormondur. Kollajen yapımını artırır. Somatomedin reseptörleri üzerinden indirekt yolla kemik formasyonuna katkıda bulunur (29, 89).

Büyüme hormonu, büyüme ve gelişmeyi protein sentezi ve büyüme hızını artırarak yapar. Kemik formasyonuna katkı sağlar. Kallusun hacminin artmasını sağlar (70, 79).

Kortikosteroidler, kırık iyileşmesini geciktirirler. Bu etki osteoblast gelişiminin yavaşlamasına ve matriks protein sentezinin azalmasına bağlıdır. Kallusun oluşumunu yavaşlatır, somatomedin sentezini inhibe ederler (56, 79). Ayrıca PTH reseptör sayısını ve G protein miktarını artırarak PTH'a duyarlılığı artırır. Sonuçta kemik yıkımında artış olur (90).

Gonadal steroidler, her iki cinsin kemik gelişiminde ve bütünlüğünün sağlanmasında etkilidir. Östrojen epifiz kapanması için mutlak gerekli iken, androjenler kas gücünü artırarak ya da dolaylı olarak kemik yapımını uyararak etkili olurlar. Menapoz sürecinde azalmış östrojen seviyesi sonucunda kemikte rezorpsiyon artışı olur. Bu etkide östrojen reseptörü taşıyan osteoklastların bir rolü olabileceği düşünülmektedir (88, 90).

Kalsitriolün görevi barsaktan kalsiyum ve fosfor emilimini artırarak kemik mineralizasyonuna katkı sağlamaktır. Yüksek konsantrasyonda ve kalsiyum-fosfor eksikliğinde ise, kemik yıkımını artırır. Osteoblast aktivitesi kalsitriol tarafından direkt stimüle edilir. Osteoblastların bölünmelerini ve diferansiye olmalarını sağlar (27, 90).

Tiroid hormonları, hem kemik yıkımı, hem de yapımını uyarır. Hipertiroidide kemik döngüsü artar ve kemik kaybı gelişir. Kemiğin yeniden şekillenmesinde de etkilidir (56, 90).

Vitaminler

A vitamini, mezenkimal hücre farklılaşmasını uyararak kırık iyileşmesine yardım eder. Osteoblastların düzenlenmesinde ve osteoklastların aktivitesinin sağlanmasında etkilidir. Eksikliğinde kemik oluşumu engellenir, epifizyel kırıkta hücreleri büyümesi ve gelişmesi azalır, encondral büyüme durur. A vitamini fazlalığında ise hücre farklılaşması yavaşlar, kırıkta kolonlarında erozyon meydana gelir. Osteoklastlara farklılaşma uyarılır ve kırık iyileşmesi gecikir (29, 56).

C vitamini, kollajen sentezine katkısından dolayı kemik iyileşmesini olumlu etkiler (83).

D vitamini normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırır. Böbreklerden kalsiyum ve fosfat geri emilimini artırır. Dolaylı olarak barsaklardan fosfat emilimini artırır ve matriks mineralizasyonunu kolaylaştırır. Kalsiyumun kemikten kana geçişini artırır, bu etkisi PTH varlığında belirgindir. D vitamini eksikliğinde Ca^{+} düzeyi düşer ve kemik kalsifikasyonu zayıflar. Kemik hücreleri ve diğer bazı dokularda sitrat konsantrasyonunu artırır. Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme evresinde rol oynar. Aşırı dozda olumsuz etki eder (56).

İlaçlar

Antikoagülanlar kırık iyileşmesini, mekanik olarak pıhtı oluşumunu engelleyerek ya da bölgedeki hücre sayısını değiştirip aktivitelerini etkileyerek geciktirirler.

Nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar ossifikasyonu; prostoglandin inhibisyonu sonucunda lokal kan akımını azaltarak veya primitif osteoblastların fonksiyonunu engelleyerek geciktirirler. Yüksek dozlarda indometazin kırık iyileşmesini durdurduğu bilinmektedir.

Antibiyotikler, hücrel ve matriks dejenerasyonunu azaltır. Kollajen yapımını etkiler ve bunun sonucu olarak da bükme kuvvetlerine karşı dirençte azalma meydana getirir.

Dikumoral, kondroitin sülfat ve hyalüronidaz; kırık iyileşmesine yardım eder. L-Dopa ve klonidinin büyüme hormonunu arttırarak kırık iyileşmesini olumlu etkilediği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (56, 79, 88).

Diğer etkenler

Redüksiyon yapılmış olan kırıkta oluşacak ikincil hareketlenmeler yeni oluşmuş damarların parçalanmasına ve kırık kallusunun kanlanması bozulmasına sebep olur. Aynı zamanda kemikleşme sırasında oluşan fibrin köprülerin de bu hareketle zarar görmesi

iyileşmeyi geciktirir (51).

Kırık bölgesindeki sinir harabiyetinin kaynamayı olumsuz etkilediği gösterilmiştir (42).

Lokal olarak uygulanan elektriksel uyarım kaynamayı hızlandırabilir. Elektriksel alan hücre proliferasyon ve sentez fonksiyonunu hızlandırarak kaynamayı olumlu etkiler (83).

Düşük doz lazer uygulanmasının biokimyasal, radyolojik, morfolojik ve ultrastrüktürel olarak kırık kaynamasını olumlu etkilediği hayvan deneylerinde gösterilmiştir (84).

Düşük şiddette ses dalgalarının kaynamayı hızlandırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu kaynama hızlanması hem taze kırıklarda hem de kaynaması gecikmiş kırıklarda gözlenmiştir (42).

İyi tespit edilmiş kırıklara erken ve kontrollü yük verme kırık iyileşmesini uyarıcı etki gösterir. Bunun nedeni olarak prostoglandin E₂ miktarının artması ve kan dolaşımına olan etkisidir (42).

Vücut dışında çoğaltılmış mezenkimal kök hücrelerin vücuda ekildiklerinde ektopik osteokondrojenik potansiyele sahip oldukları gösterilmiştir (85).

Basınç altında oksijen solunması (2-3 atmosfer/günlük 2 saat) kırık iyileşmesini hızlandırmaktadır. Daha uzun süre solunması iyileşmeyi geciktirmektedir. Bu etkisi kanda oksijenasyonun üst düzeye çıkması sonrası kapiller damar gelişiminin ve kollajen yapımının artmasıyla sağlanır (79, 91).

2.2 TROMBOSİTLER VE TROMBOSİTLERİN DOKU İYİLEŞMESİNE KATILIMI

Kan trombositleri, kemik iliğinde farklılaşan ve olgunlaşan megakaryositlerden (MKs) ve polipoid hücrelerden çok fazla sayıda oluşturulur (92). Çekirdeksiz trombositler, 7-10 gün dolaşımında kalır ve primer hemostaza aracılık eder. Trombositlerin bu fonksiyonu nasıl yerine getirdikleri hakkında çok fazla bilgi mevcuttur. Fibrinojen (Fg) ve Von Willebrand faktör (VWF), plateletleri birarada tutan çapraz bağ köprülerini oluşturan majör ligandlardır. Yaralı vasküler hücrelerden salınan ADP gibi çözünebilen maddeler, kırmızı kan hücreleri veya yapışkan trombositler ve yeni oluşmuş Tromboksan A₂ (TXA₂), yedi transmembran çevre ailesi reseptörleriyle (ADP için P₂Y₁ ve P₂Y₁₂; TXA₂ için TP_α) etkileşime girer ve trombosit tıkaçı oluşumuna öncülük eden sinerjide rol alır. Trombositler, yüzeylerinde anyonik fosfatidilserini açığa çıkararak ve doku faktöründen (TF) zenginleştirilmiş

mikropartikülleri salgılayarak prokoagülan hale gelir (lökositlerle çapraz karışmayı kapsayan bir süreç) (93). Bunu yaparken, trombin formasyonunu hızlandıran katalitik yüzeyler oluştururlar. Yeni oluşturulan trombin, daha sonra trombosit agregasyonunu uyarır ve lökositlerin ve kırmızı hücrelerin yakalandığı tıkaç etrafında fibrinojeni fibrin ağına dönüştürür. Trombositler, oluşan kan pıhtısının retraksiyonuna ve konsolidasyonuna izin verir.

Trombositlerin doku tamiri ve vasküler yeniden şekillenmede daha önceden bilinmeyen bir rolü olduğu ve inflamatuvar ve immün yanıtın aktif oyuncularından olduğu belirtilmektedir (94, 95). Biyolojik olarak aktif proteinlerin ve diğer maddelerin serbest bırakılmasıyla birlikte, hücrelerin göç, büyüme ve morfogenezini düzenleyerek bu süreçlere etki edebilir hale gelirler. Bu maddeler, aktive olmuş trombosit yüzeyinde ya bulunurlar ya da serbest bırakılırlar. Hücre dışı komponentleri (kollajenler, glikozaminoglikanlar, adheziv proteinler) veya pıhtının fibrin ağı, matrikste aktif olan metalloproteazlar (MMPs) tarafından sekonder olarak serbest bırakılan depo havuzunun oluşturulmasına ek olarak, trombositlerden elde edilen büyüme faktörlerini ve hücre göçünü kolaylaştıran kemotaktik gradientleri kuran sitokinleri birbirine bağlar. Büyüyen pıhtının içindeki trombositlerin salgılama yeteneği daha sonradan doğal hızlanmayı iyileştirecek, büyüme faktörleri ve sitokinlerden oluşan doğal bir terapötik kaynak oluşturmaktadır (3, 96).

Travmatik yaralanma sonrası hücresel ve moleküler olayların neticesinde vücudun farklı dokularında erken ve geç inflamasyon fazı uyarılır. Proliferasyon ve hücrelerin migrasyonu, anjiogenez, granülasyon fazı ve neticede matrix formasyonu ile yeniden şekillenme gerçekleşir (97, 98). Yaralanma sonrası bu olaylar kaskadı, degranüle olan plateletlerden ve serumdan lokal çevreye salınan sitokinler, proteinler ve büyüme faktörlerince başlatılır (2). Çapraz bağlarla bağlı fibrin ve vitronektin, fibronektin ve trombospondin gibi protein çeşitleri ile karakterize kan pıhtısının ilk formasyonu: daha ileri kanmayı önler. İstila eden patojenlere karşı bariyer oluşturur ve hücrelerin matrikse invazyonuna izin verir. Üstelik bu ilk pıhtı iyileşmenin daha geç safhaları için gerekli olan büyüme faktörleri için rezervuar görevi üstlenir (99). Doku tamiri sürecinin tüm safhaları growth faktörlerin çoğu ve hücrelerin hücre dışı ortamdaki transmembran reseptörlerin karşılıklı etkileşimi ile modüle edilen sitokinlerin yönetiminde ve kontrolündedir (2).

2.2.1 TROMBOSİTLERİN İÇERİKLERİ VE FONKSİYONLARI

Trombositler tarafından sağlanan, tamir ve doku iyileşmesinde yer alan proteinleri ve diğer maddelerin çoğu, elektron mikroskopisinde ve immunofloresan boyamayla kolaylıkla görülebilen alfa granüllerin içinde yer almaktadır. Proteinler, içeriğinin çevreye serbest bırakılmasına izin veren plazma zarında eriyen sekretuar veziküller aracılığıyla ekzositoz yoluyla salgılanır (100). Aktive trombositler, apoptoz süreciyle mikropartikülleri salgılamasına ek olarak, trombin oluşumu için katalitik yüzey sağlarken, yeni sentezlenen metabolitler diffüzyon yoluyla membrandan serbest bırakılır (101).

A) Yoğun (Dense) Granüller

Depo edilen ve yoğun granüllerden salınan maddeler, trombosit agregasyonunun önemli kofaktörleri olmalarının yanı sıra, diğer biyolojik süreçlerle de ilişkilidir. P2Y ve P2X reseptör ailelerinin üyelerine nükleotid bağlama yoluyla pürinerjik sinyalleme, hücre göçünü ve proliferasyonunu etkileyebilir ve vasküler tonu belirleyebilir (102). Ca^{++} , trombosit agregasyonu ve fibrin oluşumu için gerekli bir kofaktördür. Ayrıca yara iyileşmesinde potansiyel bir merkezi düzenleyicidir (103). Damar hücrelerinde serotonin reseptörleri vardır ve trombositlerden serbest bıraktıklarında, vazokonstrüksiyona ve kapiller permeabilite artışına öncülük ederler. Yakın geçmişte, trombositlerden serotoninin karaciğer rejenerasyonuna da aracılık ettiği gösterilmiştir (104). Histaminin pro- ve antiinflamatuvar etkileri olmasının yanı sıra, noradrenalin ve dopamin gibi katekolaminlerin depolandığı küçük havuzun rolü hakkında daha ileri araştırma gerekmektedir.

B) Alfa Granüller

Alfa granüllerde depolanıp buradan salınan birçok protein tablo 1'de gösterilmektedir. Mümkün olduğu kadar proteinler fonksiyonel özelliklerine göre alt gruplara ayrıldı. Çoğu adheziv proteinlerdir: Fibrinojen (Fg), fibronektin (Fn), vitronektin (Vn) ve trombospondin-1 (TSP-1) gibi ve yine iyileşmedeki rolüne uygun şekilde trombositler zengin bir sitokin ve kemokin kaynağıdır.

Tablo 1. Trombosit α -granül içerikleri ve fonksiyonel kategorileri

Kategori	Protein	Fonksiyon
Adheziv Proteinler	VWF + propeptid, Fg, Fn, Vn, TSP-1, Laminin-8 (alfa-4 ve alfa-5 laminin subünitleri), SCUBE1	Hücre temas ilişkileri, hemostaz ve pıhtılaşma, hücre dışı matris yapısı
Pıhtılaşma faktörleri ve ilişkili proteinler	Faktör V/Va, Faktör XI-like protein, multimerin, protein S, yüksek molekül ağırlıklı kininojen, antitrombin III, doku faktör yolu inhibitörü (TFPI)1	Trombin üretimi ve düzenlenmesi
Fibrinolitik faktörler ve ilişkili proteinler	Plazminojen, PAI-I, u-PA, alfa2-antiplazmin, histidinden zengin glikoprotein, TAFI, alfa2-makroglobulin	Plazmin üretimi ve damarsal biçimlenme
Proteazlar ve anti-proteazlar	Metalloproteaz doku inhibitörü 1-4 (TIMPs1-4), metalloproteaz-1, -2, -4, -9, ADAMTS13, TACE, FIX trombosit inhibitörü, proteaz neksin-2, C1 inhibitörü, serpin proteinaz inhibitörü-8, alfa-1 antitripsin	Anjiogenez, damarsal biçimlenme, pıhtılaşmanın düzenlenmesi, hücre hareketlerinin düzenlenmesi
Büyüme faktörleri	PDGF, TGF-beta1 ve -beta2, EGF, EGF-1, VEGF(A ve C), bFGF(FGF-2), HGF, BMP-2, -4, -6, CTGF	Kemotaksis, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, anjiogenez
Kimokinler, sitokinler ve diğerleri	RANTES, IL-8, MIP-1alfa, ENA-78, MCP-3, GRO-alfa, anjiopietin-1, IGF-BP3, IL-	Anjiogenezin düzenlenmesi, damarsal biçimlenme, hücreler ilişkileri, kemik oluşumu

	6sR, PF4, beta-TG, trombosit temel proteini, NAP-2, konnektif doku aktivatör peptid III, HMGB1, FasL, LIGHT, TRAIL, SDF-1alfa, endostatinler, osteonektin, kemik sialoproteini	
Antimikrobiyal proteinler	Trombosidinler	Bakterisidal ve fungisidal özellikler
Diğerleri	Kondroitin 4-sülfat, albumin, immunglobulinler, disabled-2, semaforin 3A, PrPc	
Membran glikoproteinleri	alfaIIb beta3, alfaV beta3, GPIb, PECAM-1, plazma membran bileşenlerinin çoğu, primer agonist reseptörleri, CD40L, doku faktörü, P-selektin, TLT-1, furin?	Trombosit agregasyonu ve adhezyonu, proteinlerin endositozu, inflamasyon, trombin oluşumu, trombosit-lökosit ilişkileri

Bu protein listesi mümkün olduğu kadar tamamlanmış olmasına rağmen proteomiks analizlerin sonuçlarını içermemektedir (105).

C) Lizozomal Granüller

Trombositler ayrıca, asit hidrolazları, D ve E katepsinleri, elastaz ve diğer indirgeyici enzimleri sekrete edebilen lizozomal granülleri de ihtiva ederler (3).

D) Yeni Sentezlenmiş Aktif Metabolitler

Trombositler, membran fosfolipidlerinden serbest bırakılan araşidonik asitten sentezlenen eikosanoid ihtiyacını karşılar. TXA₂, prostasiklin tarafından düzenlenen bir süreç olan yarananmanın indüklediği vasküler proliferatif yanıtla da ilişkili olan çok güçlü bir vazokonstriktördür (106). Mitogenezisi stimüle edebilen aktif bir metabolit olan sfingozin-1 fosfat, pıhtı oluşumu sırasında aktif trombositlerden serbest bırakılır.

E) Trombin Oluşumu

Fosfotidilserin, Ca^{++} bağımlı bir mekanizmayla, protrombini trombine dönüştüren aktif faktör Xa/Va kompleksinin hızlı formasyonuna öncülük eder ve koagülasyon faktörlerinin bağlanmasına katılır. Trombosit alfa granülleri, multimerin adı verilen çok büyük bir proteinle birleşik halde olan faktör V'i depolar (3) ve protrombinaz kompleksi için, daha sonradan aktive edilen bir faktör V kaynağı sağlar. Faktör Xa ve diğer koagülasyon faktörleri spesifik hücresel yanıtı ortaya çıkarabilirken, trombin de güçlü bir mitojendir.

F) Protein Sentezi

Çekirdeksiz olmalarına rağmen aktif trombositler, fonksiyonel bir splisozom varlığından dolayı pre-RNA taslağını işleme tabi tutarak protein sentezleme yeteneğine sahiptir (107, 108).

G) Proteomiks ve Kitle Spektrometri ile Çalışılmış Trombosit Sekretomu

Proteomiks kullanımı, trombositlerden salgılanan proteinlerin listesinin uzamasına neden olmuştur. Coppinger (105), peptid tandem kitle spektrometri ile trombosit salgısında 146 protein tanımlamıştır. Trombositten serbest bırakıldığı zaten bilinen birçok proteine bazı eklemeler yapılmıştır. Flamin A ve alfa-aktinin gibi hücre iskeleti proteinlerinin sekresyonunun önemi hala ortaya konmayı beklemektedir. Proteomiksin önemi yeni proteinlerin tanımlanmasıdır ve Coppinger(105), antikör dizileri kullanarak ekspresyon miktarı hesaplanan sitokin ve büyüme faktörü serisini göstermiştir. O proteinlerin arasında daha önceden trombositlerde olduğu bilinmeyenler; oncostatin M, angiogenin, growth-regulating growth factor ve MCP-2 bulunmaktadır.

H) Matriks Molekülleri ve Fibrin Pıhtısı

Kollajenler, proteoglikanlar ve Fn gibi adheziv glikoproteinler hücre dışı matriksin (ECM) majör bileşenleridir ve hep birlikte adhezyon ve göç için hücrelere biyolojik bilgi ve protein tabanlı bir iskele sağlarlar. ECM yapısı sağlamanın yanısıra bu bileşenler, sitokinleri, büyüme faktörlerini ve proteazları da sağlar. Konnektif doku büyüme faktörü (CTGF) gibi sitokinlerin

yanı sıra TSP-1, TSP-2, SPARC, tenascin-C ve osteopontinin de yara iyileşmesinin modülatörleri olduğu unutulmamalıdır (109). TSP-1 aktif trombositlerden yüksek miktarda salgılanır ve hücre adhezyon moleküllerinin (VCAM-1, ICAM-1, E-selektin) ekspresyonunu upregüle eder ve endotelyuma monosit bağlanmasını destekler (110). TSP-1 antianjiogenik bir moleküldür. Trombopoiez modeli üzerindeki çalışmalar, TSP-1 ve TSP-2 salınımının, hem trombosit üretimini hem de myelosuprese kemik iliği ve iskemik uzuvların revaskülarizasyonunu kontrol ederek majör bir antianjiogenik kontrol düğmesi gibi fonksiyon gördüğünü doğrulamıştır (111). Fibrinojenin kendisi, hem hücre proliferasyonunu hem de göçünü artırarak yara kapanmasına katkıda bulunabilir (112). Fibrin, yara iyileşmesinin önemli bir bileşenidir ve iyileşmenin sonucu yara yerindeki fibrin yapıdan (fiberlerin kalınlığı, dal noktalarının sayısı, pıhtının porozitesi [gözenekliliği] ve permeabilitesi) etkilenmiştir (113). Yara yerine trombositten zengin eksojen bir plazma kaynağının eklenmesi, doğal iyileşme sürecini hızlandıracak ve sadece trombositlerin değil, aynı zamanda endotelial hücrelerin, düz kas hücrelerinin, fibroblastların, lökositlerin, keratinositlerin ve kök hücrelerin bağlanması için ek bir destek sağlayacaktır. Özellikle belirtildiği gibi, büyüme faktörlerinin fibrine bağlanması kemotaktik gradientlerin oluşumunu kolaylaştıracaktır. Fibrine FGF-2 bağlanması endotelial hücre büyümesini destekler (114). Fibrine hücre bağlanması, crosslink(çapraz bağ) fibrin ve hücre integrin reseptörlerinin olduğu Fn ve Vn varlığıyla destekleniyor olabilir. Trombinin indüklediği fibrinopeptidlerin salınımı ve plazminin indüklediği fibrinojen indirgenme ürünleri, lökositleri çeker ve inflamasyon ve doku tamiri arasındaki değişime katılır. Plazminojeni eksik farelerde kutanöz yara tamirinde belirgin gecikme olduğu saptanmıştır (115).

1) Anjiogenez

Trombositlerden salınan proteinlerin total etkisi, sadece serbest bırakıldıkları yere değil, aynı zamanda ortaya çıkan sekresyonun derecesine de bağlı olacaktır. Proteinler hem sinerjistik hem de yarışmacı rol oynayabilirler. Aşağıdaki örnekler ile kompleksin nasıl etkileşime girdiği açıklanabilir. Örneğin; TGF-beta1'in PDGF bağlanmasını inhibe ederek insan fibroblastlarının proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir (116). Bunun yanı sıra TGF-beta1 endotelial hücrelerde hedef gen olarak monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)'i uyarır ve düz kas hücrelerini toplayarak TGF-beta1'in anjiogenik etkisine aracılık eder. Bu şekilde yeni damarların olgunlaşmasını sağlar (117). Endostatinler, kollajen XVIII'in C-

terminal ucundan derive olur ve endotelial hücre göçünü, vasküler şekillenmeyi ve damar etrafına hücre toplanmasını inhibe ederler (118, 119). Trombosit salgı havuzunun nasıl parçası oldukları henüz bilinmese de kollajen XVIII'in proteolitik ürünleri (~20 kDa) oldukları için endositozlanmış olmaları yüksek ihtimaldir.

J) Hematopoetik Kök Hücreler(HSC) ve/veya Progenitör (öncü) Hücreler Üzerine Etki

PF4, hemapoetik kök hücrelerin, endotelial hücrelere adhezivitesini artırır (121). Aktif insan trombositleri, spesifik adhezyon reseptörleri P-selektin/PSGL-1 ve beta1, beta2 ve/veya beta3 familyaların integrinleri aracılığıyla CD34+ progenitör hücreleri toplar. Bu, belirli kültür koşulları altında progenitör hücrelerin köpük hücrelere ve endotelial hücrelere farklılaşmasıyla takip edilir. Hemostatik komponentlerin, CD34+ hücrelerin yara yerinde toplanmasında rolü olduğunu gösteren birçok bulgu mevcuttur (122). Trombositten eksprese edilen P-selektin, kan akımında CD34+ hücrelerinin bağlanmasına izin vermektedir. VEGF'in bir rolünü de özellikle belirtmek gerekir. VEGF, trozin kinaz reseptör ailesi (VEGFR 1,2 ve3 olarak bilinir) aracılığıyla sinyal yollayarak, hematopoetik hücrelerin, monositlerin ve makrofajların göçünde regülatör rolü oynar, bununla birlikte endotelial hücreler ve lenfoendotelial hücrelerin fonksiyonu için gereklidir (123).

2.3 Otolog Trombositlerin İyileşme ve Doku Rejenerasyonunda Terapötik Kullanımı

Fibrin glue'nun (fibrin macunu veya fibrin jeli) hemostatik ve adheziv özellikleri olan bir biyomateryal olarak geliştirilmesi 1990'ların başlarıydı. Trombositlerin fibrinle birlikte kullanımı ise daha sonra olmuştur. O zamandan beri PRP jel, platelet jel, PRP-pıhtı veya plazmadan zengin growth faktörler (PRGF) gibi farklı preparatları tanımlanmıştır. Plateletden zengin ürünlerin hazırlanış mantığı, aktive edilebilir proteinlerden ve PDGF, TGFbeta, VEGF, IGF1, hepatosit büyüme faktörü- HGF, platelet faktör4-PF4 ve trombospondin gibi doku iyileşmesinde yerel etkili olan faktörlerden zengin pıhtıyı yerine koymaktır. Eritrositlerden ve lökositlerden arındırılmış, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu sağlayan büyüme faktörlerinin saklandığı konsantre plateletler hazırlanır (3). PRP 'nın potansiyel

avantajlarından birisi: hastaların kendi kanından basit bir santrifüj sonrası kolayca elde edilebilmesidir. Santrifüj parametreleri ve aktivasyon protokolü gibi hazırlama teknikleri aktivasyonda salınan proteinlerin ve büyüme faktörlerinin doz kontrolünü mümkün kılmaktadır (124). Trombosit ürünlerini santrifüj sonrası aktifleştirmek için trombin kullanımından da söz edilmesine rağmen, bu çalışmada; yine başka çalışmalarda sürekli büyüme faktörü salınımını gerçekleştirdiği gösterilen kalsiyum klorid aktivatör olarak kullanıldı (125).

Yara iyileşme süreci tipik olarak üç faza ayrılmıştır (inflamatuar, proliferatif ve yeniden şekillenme). Trombositler ve salgıladıkları sitokinler ile büyüme faktörleri bu süreçlerin her biri için esas elemanlardır. Otolog trombosit üretiminin kontrollü salınımının iyileşmeyi ve yara tamirini desteklediği seçilmiş klinik durumlar Tablo 2’de listelenmiştir.

Tablo 2: Otolog trombositlerin ve trombositten zengin pıhtının yara iyileşmesinde kullanımı

Klinik Durumlar
<p>Diş Hekimliği ve Maksillofasial Cerrahi</p> <p>Titanyum implantların konsolidasyonu</p> <p>Maksiller sinüs genişletmesi</p> <p>Kemik yeniden şekillenmesi</p>
<p>Ortopedik Cerrahi</p> <p>Diz artroplastisi</p> <p>Lomber spinal füzyon</p> <p>İntervertebral disk dejenerasyonu</p>
<p>Tendon ve Ligament Tamiri</p> <p>Ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu</p> <p>Tendon tamiri</p> <p>Kas tamiri (spor hekimliği)</p>
<p>Fasial Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi</p>

Ritidektomi (kırışıklık giderici cerrahi) Diğer Kozmetik Cerrahi (meme boyutu değişiklikleri)
Deri yara iyileşmesi Yüzeyel iyileşmeyen ülserler
Oftalmoloji Dormant kornea ülserleri Retinal Tamir (maküler delikler)
Fasial sinir rejenerasyonu
Kardiak ve Obezite Cerrahisi

3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışma deneysel bir çalışma olup S.Ü Meram Tıp Fakültesi Hastanesi, S.Ü Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi ve S.Ü Mühendislik-Mimarlık Fakültesi'nde, Selçuk Üniversitesi (S.Ü) Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden 31.05.2010 tarihinde, 2010-046 sayılı Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınarak yapıldı.

Çalışma PRP (Platelet rich plasma-trombositten zengin plazma-TZP)' nin kırık iyileşmesine olan etkisini araştırmak için 70 adet rat üzerinde yapıldı. Atmış adet rat 30' arlık iki gruba ayrılarak sol femurlarına cerrahi işlem uygulandı. I. gruba açık osteotomi ve K teli ile tespit yapıldı. II. gruba ise tespit yapıldıktan sonra kırık hattına ratın kendi kanından elde edilen otolog PRP uygulandı. On adet rat herhangi bir cerrahi müdahale yapılmadan mekanik testte kullanılmak üzere grup III (kontrol grubu) olarak ayrıldı Her iki gruptan 4 ve 9. haftalarda ortalama 9 'ar adet rat randomize edilerek histolojik ve radyolojik inceleme yapıldı. Çalışmanın sonunda her iki gruptan geriye kalan ve başlangıçta ayrılan ratlara mekanik test uygulandı. Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.1 PRP (Platelet Rich Plasma, TZP: Trombositten zengin plazma) Hazırlanması

TZP hazırlamak için gereken kanı aynı hayvandan almak çeşitli zorluklar içerdiğinden kullanılan TZP, otolog değil homolog hazırlanmaktadır. Bu nedenle oluşabilecek immün reaksiyonlara bağlı olarak, deneylerde yanlış-negatif sonuçlar oluşabilir. Gerçek TZP mutlaka otolog hazırlanmalıdır (126). Bu çalışmada PRP hazırlığı için her sıçanın kendi otolog kanı kullanıldı.

Dohan Ehrenfest ve arkadaşları platelet ürünleri hazırlanış tekniklerini sınıflandırarak, 4 grup ortaya koydular (128, 130, 131)

- 1) **Saf-TZP (P-PRP: pure platelet rich plasma):** Anuita'nın PRGF'si, Vivostat PRF, hücre ayırıcı PRF olarak sunulan teknikleri,
- 2) **L-TZP (Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma: L-PRP):** Curasan, Regen, Plateltex, SmartPREP, PCCS, Magellan ya da GPS PRP olarak ticari kullanıma sunulan teknikleri,
- 3) **Saf TZF (saf trombositten zengin fibrin: P-PRF):** Fibrinet tekniğini,
- 4) **L-TZF (lökosit ve trombositten zengin fibrin: L-PRF):** Choukroun'un PRF tekniğini kapsayan bir sınıflama yaptılar.

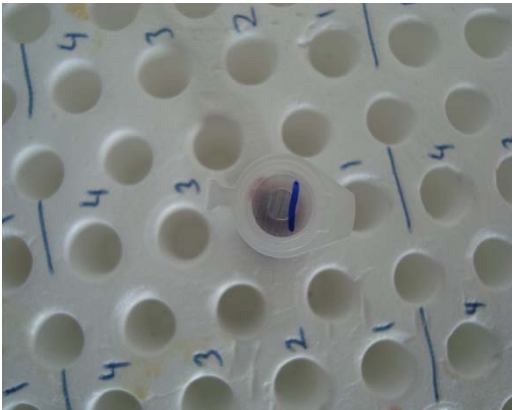
Bu çalışmada da Anuita'nın tariflediği teknik olan yani Saf TZP tekniğiyle tüm deney gerçekleştirildi. Hayvanlara 1 ml /kg dozunda ketamin (%60) ve xylazine (%40)

MATERYAL VE METOD

kombinasyonu ile intramüsküler ve intraperitoneal anestezi uygulandı. Her rattan %3,8 lik sodyum sitrat ile yıkanmış enjektöre 1ml intrakardiyak kan alındı (resim 1) . Alınan kanlar santrifüj tüpüne konularak 1800 devirde 8 dakika santrifüj (NÜVE 1000 R- S.Ü.D.A.M.'a ait) edildi (resim 2 ve 3). Santrifüj sonrası tüpün alt kısmında şekilli elemanlar üst kısmında ise plazma toplandı (resim 4 ve 5). Enjektör ile plazmanın şekilli elemanlar ile birleştiği sarı çizginin üstündeki growth faktörlerce zengin 0,1 cc lik plazma kısmı alındı (128, 130, 131) (resim 6) . Alınan plazmayı aktifleştirmek için gibi 0,1 cc- 0,2 cc kalsiyum klorid ile karıştırıp oda ısısında 10 dakika bekletildi (126, 127, 128, 132) (resim 7). Bekleme sonrasında jöle kıvamında PRP' nin oluştuğu görüldü (resim 7).



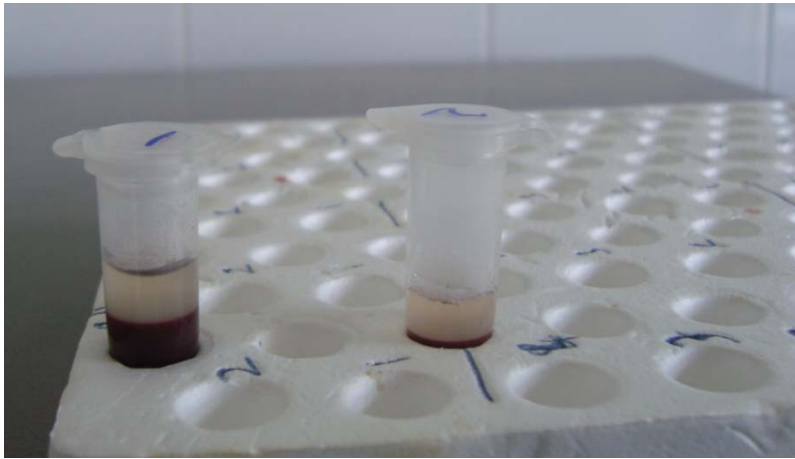
Resim 1



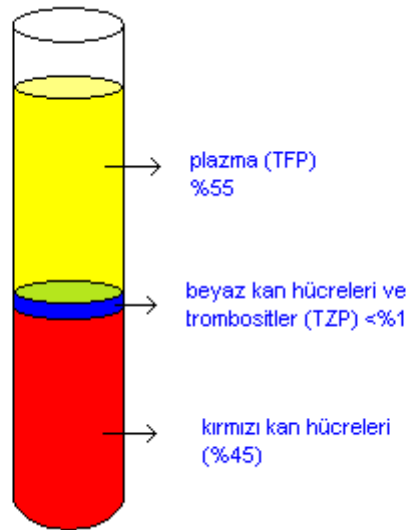
Resim 2



Resim 3



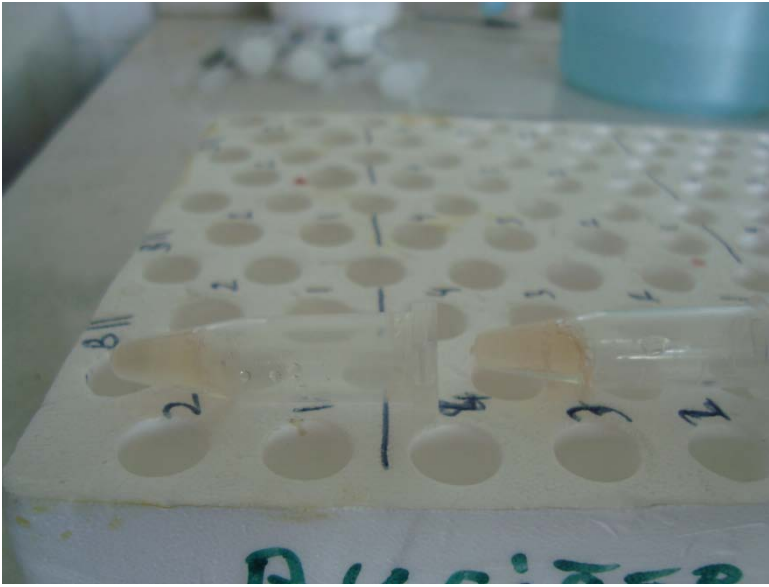
Resim 4



Resim 5: Santrifüj işlemi sonrası kanın tabakalara ayrılmış şematik görünümü



Resim 6



Resim 7

3.2 Denekler ve Anestezi

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde ağırlıkları 200gr (+/- 20 gr) arasında değişen normal aktiviteye sahip, 70 adet dişi Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Denekler ortama alışmaları için çalışmaya başlamadan önce, bir hafta boyunca standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz – 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20 +/- 1 derece oda ısısı, %50 +/- 5 rölatif nem, oda hava değişimi saatte 15 kez) tutularak ortama alışmaları sağlandı ve adlibitum (ihtiyaçları kadar) su (çeşme suyu) ve yem (Purina optima YEM, BOLU) verildi. Tüm hayvanların sol femurları çalışmaya alındı. Kontrol grubu dışında kalan hayvanlara 1ml/kg dozunda ketamin (%60) ve xylazine (%40) kombinasyonu ile intramüsküler ve intraperitoneal anestezi uygulandı. Sonra hayvanlar randomize şekilde iki gruba ayrıldı.

3.3 Cerrahi İşlem

Çalışmaya toplam 70 adet rat ile başlandı. Atmış adet rat, grup I için 30, grup II için 30 rat olacak şekilde randomize edildi ve cerrahi uygulandı. Geriye kalan 10 adet rat mekanik test için kontrol grubu (Grup III) olarak ayrıldı ve hiçbir cerrahi müdahalede bulunulmadan çalışma sonunda mekanik teste tabi tutuldu.

Anestezi uygulanan ratların sol bacakları traşlandı. Povidon iyot çözeltisi ile silindi. Femur lateralinden longitudinal 2cm lik insizyon yapıldı.(resim 3,1) Kaslar künt diseke edilerek femur shaftına ulaşıldı. (resim 3,2) Kesici alet yardımıyla transvers şekilde osteotomize edildi. (resim 3,3-3,4-3,5) Kırık 1mm'lik K teli ile diz eklemi açılmadan intramedüller retrograd tespit edildi. (resim 3,6-3,7) K telinin dizde ve kalçada cildi rahatsız etmemesine dikkat edildi. Kırık hattında stabilitenin kontrolü yapıldı.

I. Grup ratların kırık hattına başka bir işlem yapılmadan 4/0 Wicril ile kas fasyası, 4/0 keskin ipek sütür ile de cilt kapaması yapıldı. (resim 3,8)

II. Grup ratların kırık hattına sıçanın kendi kanından hazırlanan otolog PRP konuldu, 4/0 Wicril ile kas fasyası, 4/0 keskin ipek sütür ile de cilt kapaması yapıldı. (resim 3,9)

Cerrahi işlem sonrasında tüm ratların kafeslerinde atelsiz serbest hareket etmelerine izin verildi. Her deneğe enfeksiyon profilaksisi amacıyla postoperatif tek doz 50mg/kg/gün 1. kuşak sefalosporin (sefazolin sodyum) i.m. olarak uygulandı.

Deney süresince; 7 rat (Grup I 4 adet, grup II 3 adet) kafesinde ölü bulunduğu için değerlendirme dışı bırakıldı.

Her iki gruptan 4 ve 9. haftalarda dietil eter anestezisinin irreversibl dönemdeki letal etkisi görüldükten sonra sakrifikasyon işlemleri gerçekleştirildi. (Tablo 3. 1)

	4.hafta	9.hafta	9.hafta
1.grup: tespit	9 rat histolojik ve radyolojik çalışma	9 rat histolojik ve radyolojik çalışma	8 rat mekanik test
2.grup: tespit+prp	10 rat histolojik ve radyolojik çalışma	9 rat histolojik ve radyolojik çalışma	8 rat mekanik test
3.grup: kontrol	-	-	10 rat mekanik test

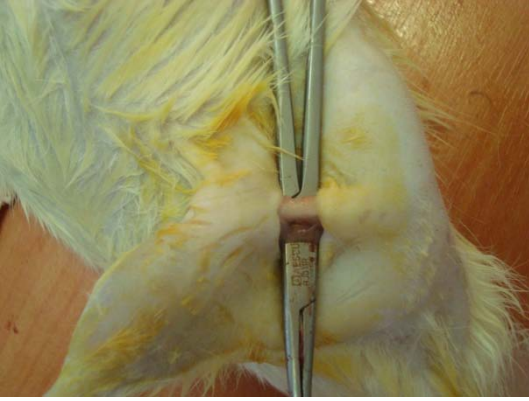
Tablo 3. 1: Opere edilen ratların sakrifikasyon haftaları ve sayıları



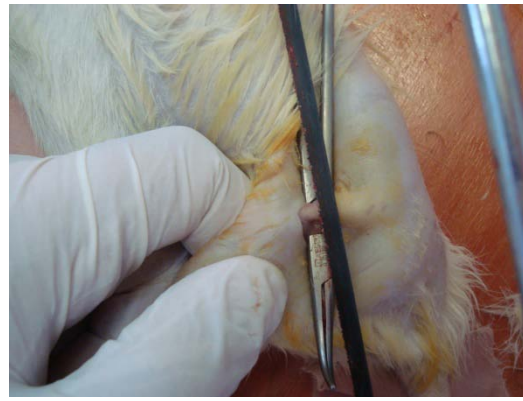
Resim 3,1: İnsizyon



Resim 3,2: Diseksiyon



Resim 3,3: Osteotomi hazırlığı



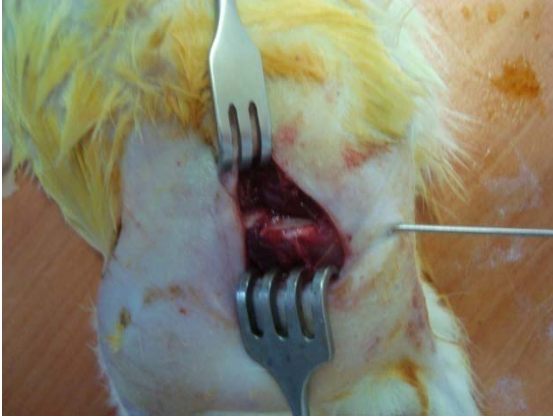
Resim 3,4: Osteotomi



Resim 3,5: Osteotomi sonrası



Resim 3,6: retrograt tespit



Resim 3,7: Tespit sonrası



Resim 3,8: Cilt kapatılması



Resim 3,9: PRP uygulanması

3.4 Histopatolojik Değerlendirme

Çalışmaya alınan 53 adet ratın 19 tanesi 4. hafta ve 18 tanesi 9. hafta kırık iyileşmesi açısından histolojik olarak Modifiye Lane-Sandhu histolojik skorlama kriterlerine göre değerlendirildi. Bu skorlama sisteminde kaynama (proksimal ve distal), spongiöz kemik, korteks ve kemik iliği ayrı ayrı değerlendirilerek, toplamda 0 - 20 Aralığında skorlandı (Tablo 3,2) (133).

Sakrifiye edilen her denekten çevre yumuşak dokular temizlendikten sonra alınan femurlar, S.Ü Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda %10'luk nötral formolin solüsyonu içinde 48 saat saklandı. Daha sonra spesmenler %10' luk formik asit solüsyonu içinde dekalsifiye edildi. Yaklaşık bir hafta içinde dekalsifiye olan femurlar ototeknikonda dehidrasyon, şeffaflama ve parafinizasyon aşamalarından geçirildikten sonra parafin içine gömülerek bloklandı. Kırık hattına dik geçen ve kallus merkezine yakın 5 -6µm

kalınlığında kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eosin (H.E) boyasıyla boyandı. Bu şekilde hazırlanan preparatların histolojik değerlendirmesi polarize ışık mikroskopunda yapıldı.

Modifiye Lane-Sandhu Histolojik Kemik İyileşme Skorlaması :

Kaynama(proksimal ve distal ayrı ayrı değerlendirilir)	Puan
Kaynama yok	0
Fibröz kaynama	1
Osteokondral kaynama	2
Kemiksel kaynama	3
Bölgenin komplet kaynaması	4
Spongioz	
Sellüler aktivite yok	0
Erken apozisyonel yeni kemik	1
Aktif apozisyonel yeni kemik	2
Spongioz kemikte reorganizasyon	3
Komplet spongioz reorganizasyon	4
Korteks	
Yok	0
Erken bulgu	1
Korteks oluşmak üzere	2
Reorganize olmuş	3
Tam teşekkül etmiş	4
Kemik iliği	
Kesitlerde yoksa	0
Oluşmak üzereyken	1
%50' den fazla oluşmuş	2
Komplet kırmızı ilik	3
Matür yağ dokulu ilik	4
Her kategori için olabilecek toplam puanlar	
Proksimal kaynama	4
Distal kaynama	4
Spongioz	4
Korteks	4
Kemik iliği	4
Maksimum Skor	20

Tablo 3,2: Modifiye Lane-Sandhu histolojik skorlama kriterleri

3.5. Radyolojik Değerlendirme

Opere edilen ratların 4. ve 9. haftada direkt grafileri çekilerek kaynama ve kallus oluşumları karşılaştırıldı. Değerlendirmenin objektif olmayacağı düşünüldüğü için istatistiksel değerlendirme yapılmadı.

3.6. Mekanik Test

Test için 9. haftada; I. gruptan 8 adet rat, II. gruptan 8 adet rat ve III. gruptan hiçbir cerrahi müdahale yapılmamış 10 adet rat alınarak sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen femurlar tüm yumuşak dokular disseke edilerek ve bütünlüğü korunarak vakit kaybetmeden oda sıcaklığında (23°C) ÜNE (üç noktadan eğme) testine tabi tutuldular (Resim 3,10). Bu test Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği laboratuvarında bulunan TEDEA Huntleigh Model No: 615 cihazına ek aparat yerleştirilerek yapıldı (Resim 3,11). Bu aparat NSI/ASAE'nin S459 DEC01 nolu standardına göre imal edilmiş ölçekli bir kalıptır. Femurların ÜNE testi için dayanak noktası oluşturur ve baskı esnasında stabil kalmalarını sağlar (Resim 3.12).

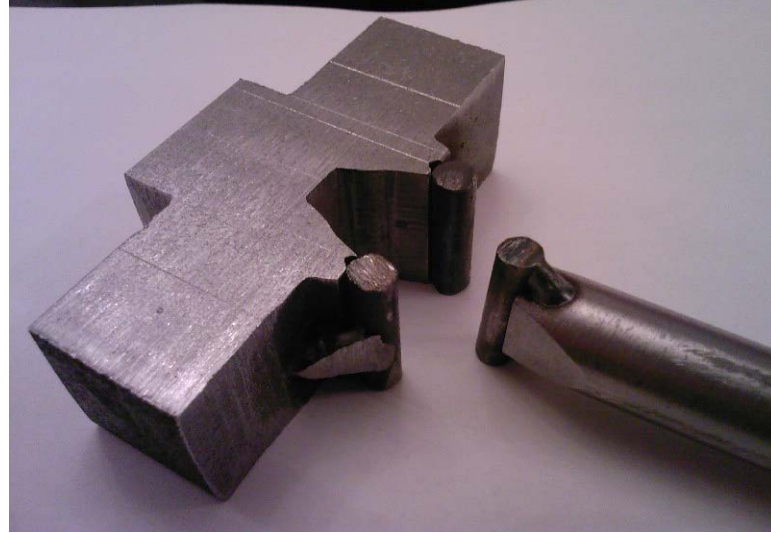
Femurlar eğilme kuvveti ön-arka planda olacak şekilde mesnetlere serbest olarak yerleştirildiler. (Resim 3.14). Mesnet aralığı 20mm, desteklere ait çap 4mm'dir. Yük, iki destek üzerine yerleştirilmiş olan rat femurlarının orta kısmına, tekil ve simetrik olacak tarzda uygulandı. Femurlara uygulanan eğme kuvvetine 0 N (Newton) ile başlandı. Ağırlık artırımını 2mm/dk olacak şekilde femurlar kırılıncaya kadar devam edildi (134).



Resim 3,10: Yumuşak dokularından arındırılmış rat femurları.

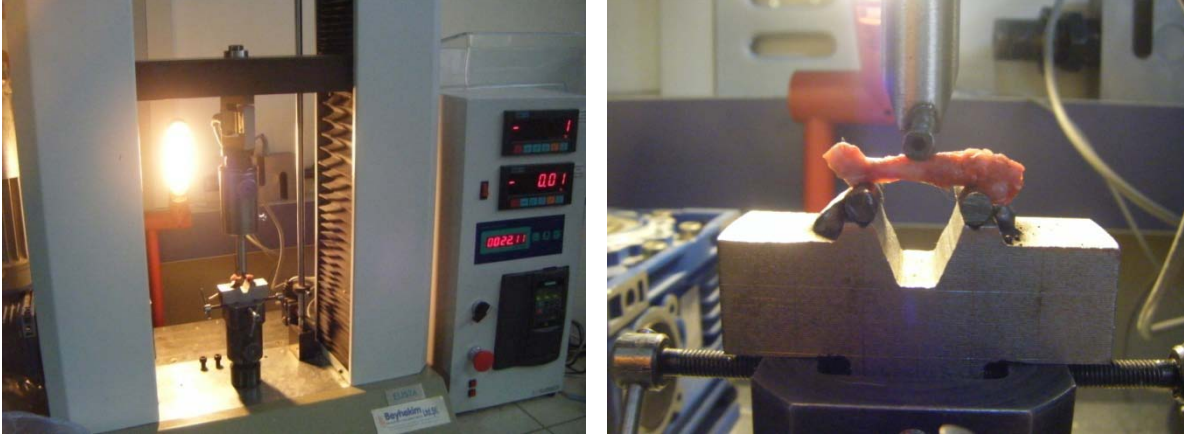


Resim 3,11: TEDEA Huntleigh Model No:615 çekme-basma test cihazı.



Resim 3,12: ANSI/ASAE'nin S459 DEC01 Standardına göre üretilmiş üç noktadan eğme kalıbı

Her yük artırımında yüklerin uygulandığı noktada oluşan defleksiyon değerleri bilgisayarca kaydedildi. Bu değerler daha sonra yük-defleksiyon eğrilerinin çizimi ve mekanik özelliklerin hesaplanmasında veri olarak kullanıldı. İleri hesaplamalarda kullanılmak üzere femurların ortalama kortikal kalınlıkları, ön-arka ve iç dış yan çapları 1/50mm hassasiyetindeki dijital kumpas (Mitutoyo, Japan) ile ölçüldü. Kırılmanın meydana geldiği son yük maksimum kırılma yükü, defleksiyon değeri ise maksimum defleksiyon olarak kaydedildi.



Resim 3,13:Femurun mesnete yerleştirilme şekli.

3.7 Ölçümler ve Hesaplamalar

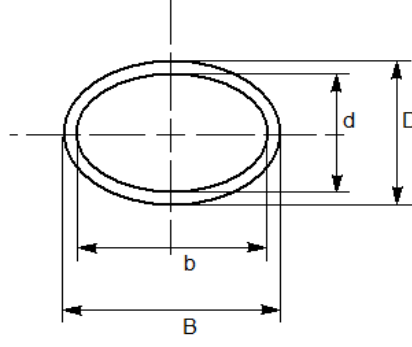
Kemiklere ait boyut analizi, kemikler yumuşak dokularından temizlendikten hemen sonra yapıldı. Kemik kesit alanını belirlemek için boyut ölçümleri kemik gövdesinin orta kısmında iç ve dış çap dijital kumpas ile ölçülerek bulundu. Eğme gerilmesi σ (Pa) denklem (1)'den hesaplanmıştır.

$$\sigma_{Eğ} = \frac{FLc}{4I} \quad (1)$$

Burada, F uygulanan kuvvet (Nt), c kemiğin enine kesitinde merkezden en dış yüzeye olan eğme yükünün uygulandığı doğrultudaki uzaklık (m), L destekler arası mesafe (m), I kemiğin enine kesitinin alan atalet (eylemsizlik) momenti (m^4). İçi boş elipse ait atalet momenti denklem (2)'den hesaplanmıştır.

$$I = 0.049 \left[(B \cdot D^3) - (b \cdot d^3) \right] \quad (2)$$

Burada, B büyük dış çap (m), D küçük dış çap (m), b büyük iç çap (m), d küçük iç çap(m) (Şekil 3,1).(134)



Şekil 3,1 Rat femurlarına ait tipik kesit alanı.

3.8 İstatiksel Analiz Yöntemi

Gruplar arası haftalara göre karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel anlamlı kabul edildi. Mekanik test sonuçları aritmetik ortalaması alınarak hesaplandı.

4. BULGULAR

4. 1. Histopatolojik Bulgular

Çalışmaya alınan 60 adet ratın 37 tanesine histolojik değerlendirme yapıldı. Çalışmada iki ayrı dönemde (4 ve 9. hafta) değerlendirmesi yapılan grup 1 (sadece tespit) ve grup 2 (tespit +PRP) kendi içerisinde 4-9 haftalar olmak üzere ikiye ayrılarak 4 ayrı histolojik veri elde edildi (Tablo 4,1).

Grupların özellikleri:

Grup 1: Prp'siz tespit ---) 1A: 4. hafta (9 adet)

1B: 9. hafta (9 adet)

Grup 2: Prp' li tespit ---) 2A: 4.hafta (10 adet)

2B: 9.hafta (9 adet)

GRUPLAR	PROKSİMAL KAYNAMA	DİSTAL KAYNAMA	SPONGİÖZ	KORTEKS	KEMİK İLİĞİ	TOPLAM
1A 1	1	2	0	0	0	3
2	2	2	2	0	1	7
3	1	2	0	0	0	3
4	1	1	0	0	0	2
5	2	1	0	0	0	3
6	1	1	0	0	0	2
7	2	1	0	0	0	3
8	1	2	0	0	0	3
9	1	1	0	0	0	2
1B 1	3	2	2	0	1	8
2	2	2	1	0	0	5
3	2	2	1	0	1	6
4	2	1	1	0	0	4
5	2	1	1	0	0	4
6	2	1	2	0	0	5
7	2	2	1	0	0	5
8	3	1	1	0	1	6
9	2	2	1	0	0	5
2A 1	2	1	1	0	0	4
2	3	3	2	1	2	11
3	2	2	1	0	1	6
4	2	2	1	0	1	6
5	2	3	2	0	2	9
6	2	3	2	0	1	8
7	3	2	1	1	2	8
8	2	2	2	0	1	8
9	2	1	1	1	2	7
10	3	3	1	0	1	8

BULGULAR

2B 1	3	3	2	1	2	11
2	3	4	3	2	2	14
3	3	3	2	1	2	11
4	3	3	2	2	2	12
5	3	2	1	1	1	8
6	2	2	0	0	0	4
7	4	3	3	2	2	14
8	4	3	3	2	2	14
9	3	3	2	1	1	10

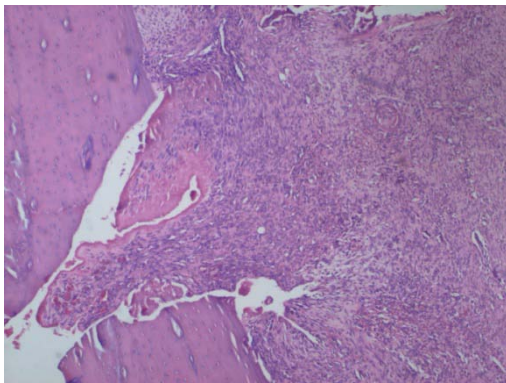
Tablo 4,1: Modifiye Lane-Sandhu iyileşme skalasına göre puanlama

Tablo 4,1'deki elde edilen histolojik puanlar kıyaslandığında PRP uygulanan grup 2A ve grup 2B'nin 4. ve 9. haftalarda PRP uygulanmayan gruba göre üstünlükleri görülmektedir. Her 2 grubun aynı haftalardaki iyileşme farklarını belirlemek için istatistiksel analiz yapıldı.

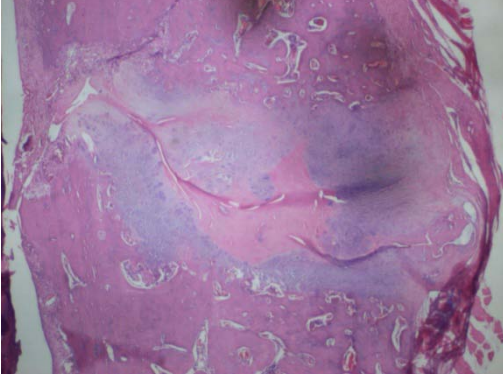
4.hafta grup 1A ve 2A histolojik veri analizi: gerçek p değeri: 0.001

9.hafta grup 1B ve 2B histolojik veri analizi: gerçek p değeri: 0.004

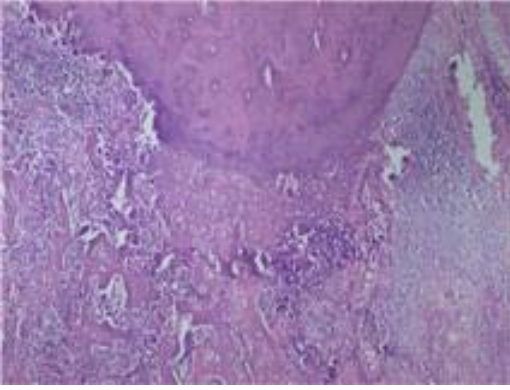
Her iki istatistiksel veri incelendiğinde histolojik puanların her iki grup arasında 4. ve 9. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir fark yapmış olduğu görülmektedir. Bu da PRP' nin kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisini histolojik olarak göstermektedir.



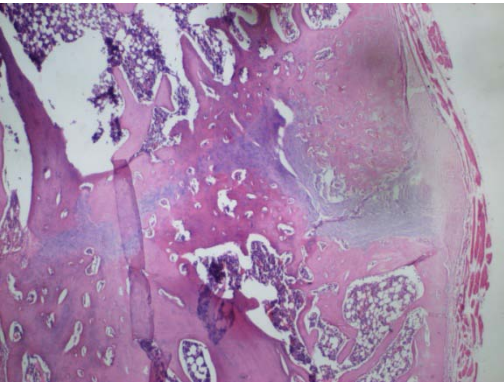
Resim 4,1: Grup 1- 4. Hafta. Fibröz kaynama görülmektedir, spongioz kemik ve kemik iliği oluşmamıştır. (X40, H. E)



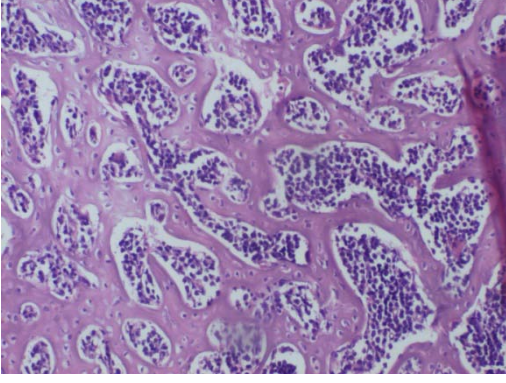
Resim 4,2: Grup 2 – 4. Hafta. Osteokondral kemikleşme görülmektedir. Spongioz kemik henüz reorganize olmamış ve kemik iliği yeni oluşmaya başlamıştır. (X20, H.E)



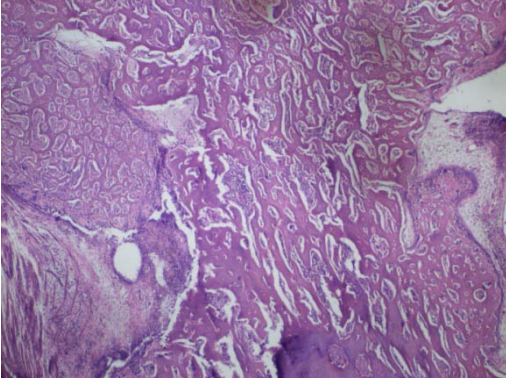
Resim 4,3: Grup 1 – 9. Hafta. Osteokondral kemikleşme görülmektedir. (X20, H.E)



Resim 4,4: Grup 2 – 9. Hafta. Kemiksel iyileşme, spongioz kemiğin reorganize olduğu ve komplet kırmızı iliğin oluştuğu görülmektedir. (X20, H.E)



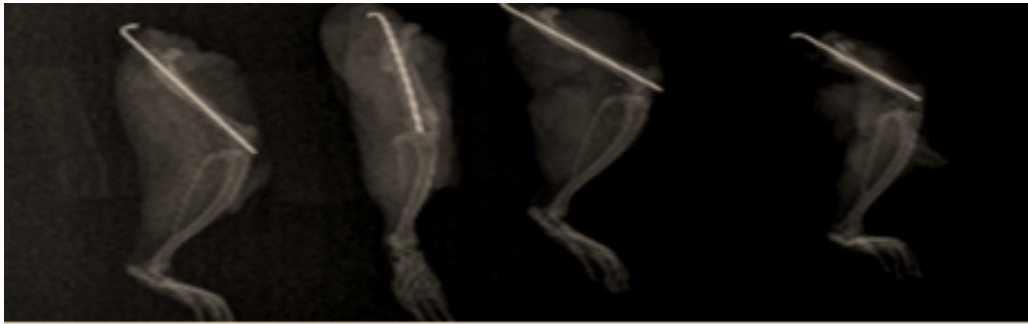
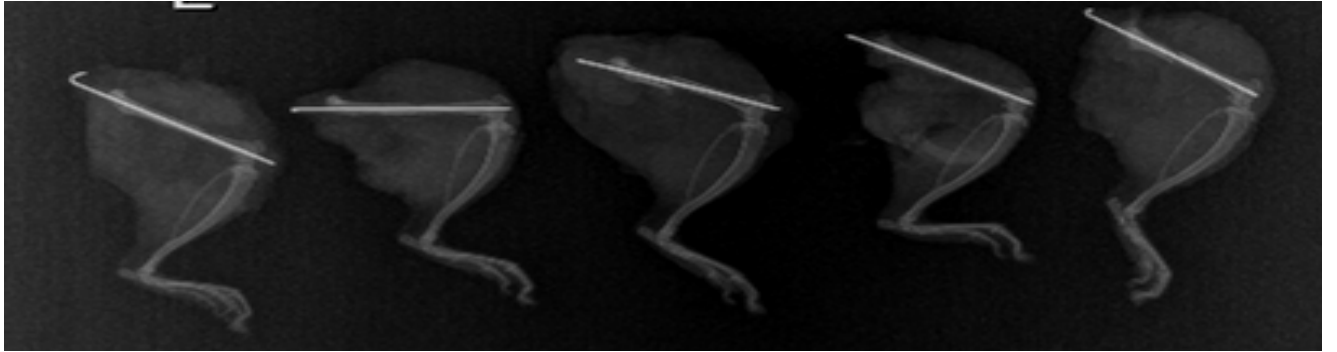
Resim 4,5: Grup 2 – 9. Hafta. Komplet kırmızı iliğin oluşumu. (X100, H.E)



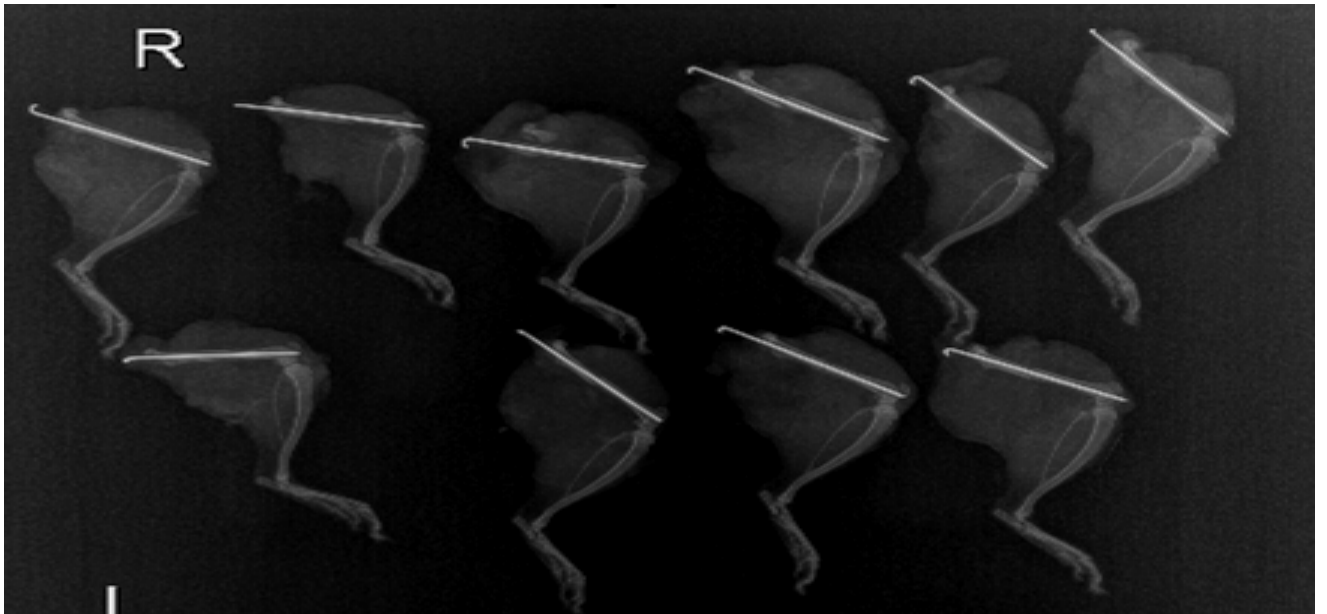
Resim 4,6: Kırık hattında yeni kemik oluşumu görülmektedir. (X40, H.E)

Histolojik inceleme sonucunda 4. ve 9. haftalarda grup 1 ve 2 karşılaştırıldığında kırık iyileşmesinde anlamlı fark bulundu. PRP uygulanmayan grupta 4. haftada fibröz iyileşme görülürken, PRP uygulanan grupta 4. hafta osteokondral kemik oluştuğu görülmektedir. PRP uygulanmayan gruba göre spongios kemiğin reorganize olması ve kemik iliğinin oluşmasının PRP uygulanan grupta daha hızlı gerçekleştiği görülmektedir.

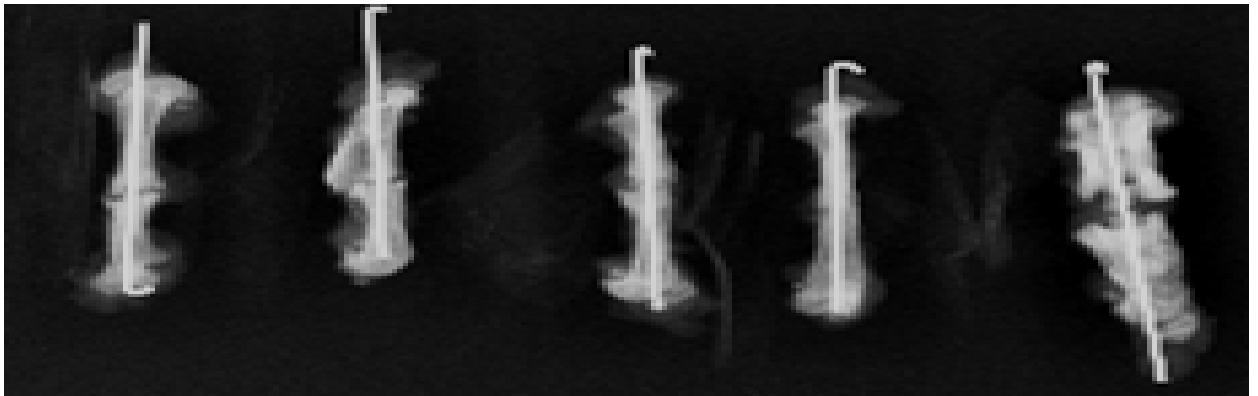
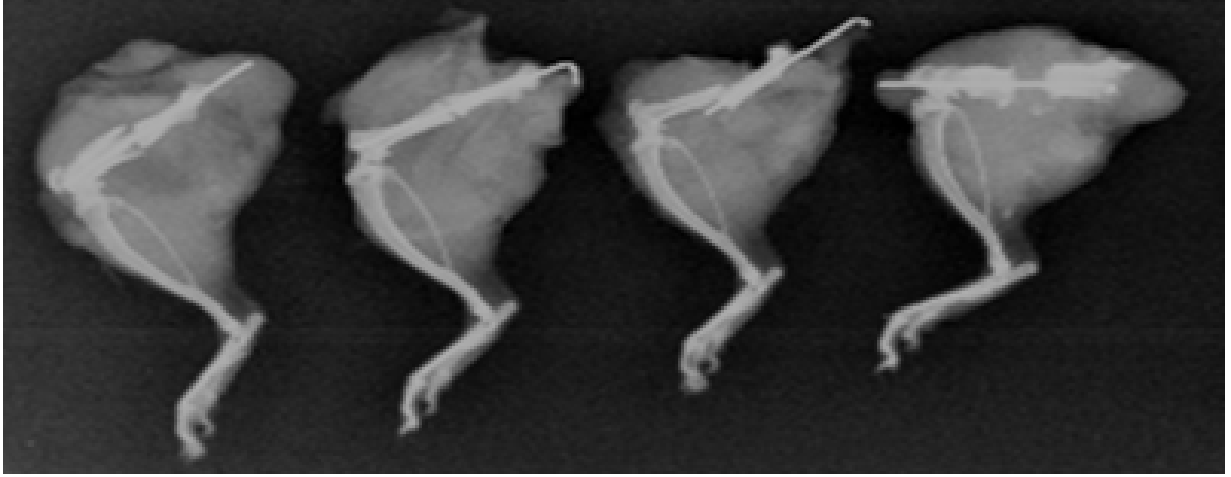
4. 2. Radyolojik Bulgular



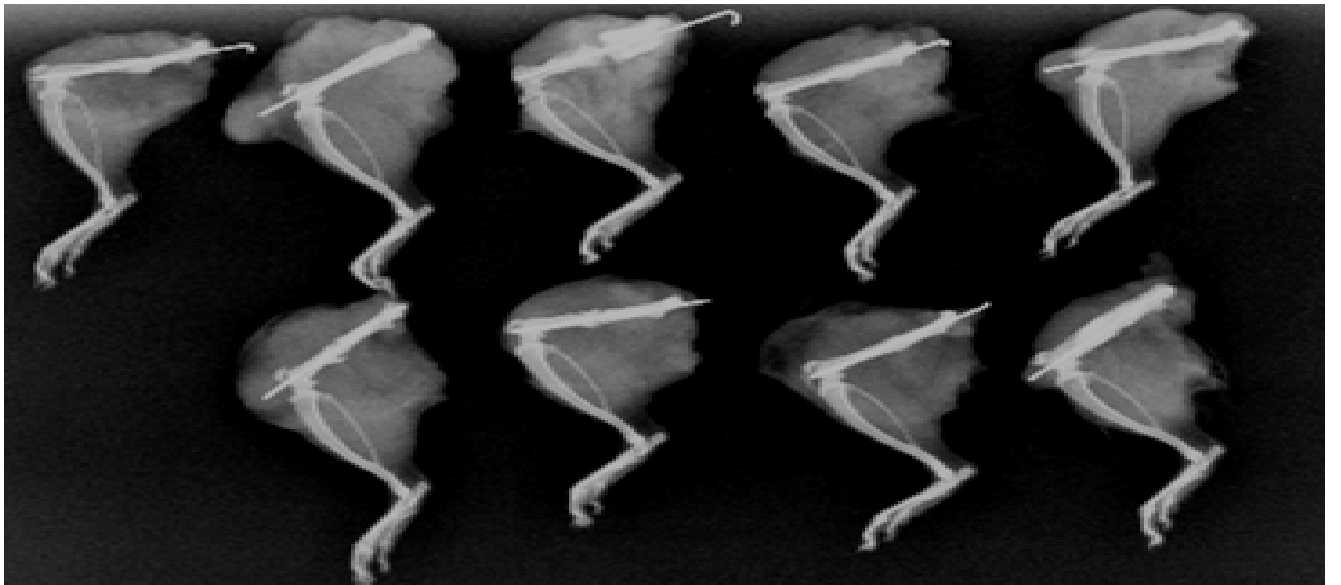
Resim 4,7: 4.hafta I. Grup



Resim 4,8: 4.hafta II. grup



Resim 4,9: 9. hafta I. grup



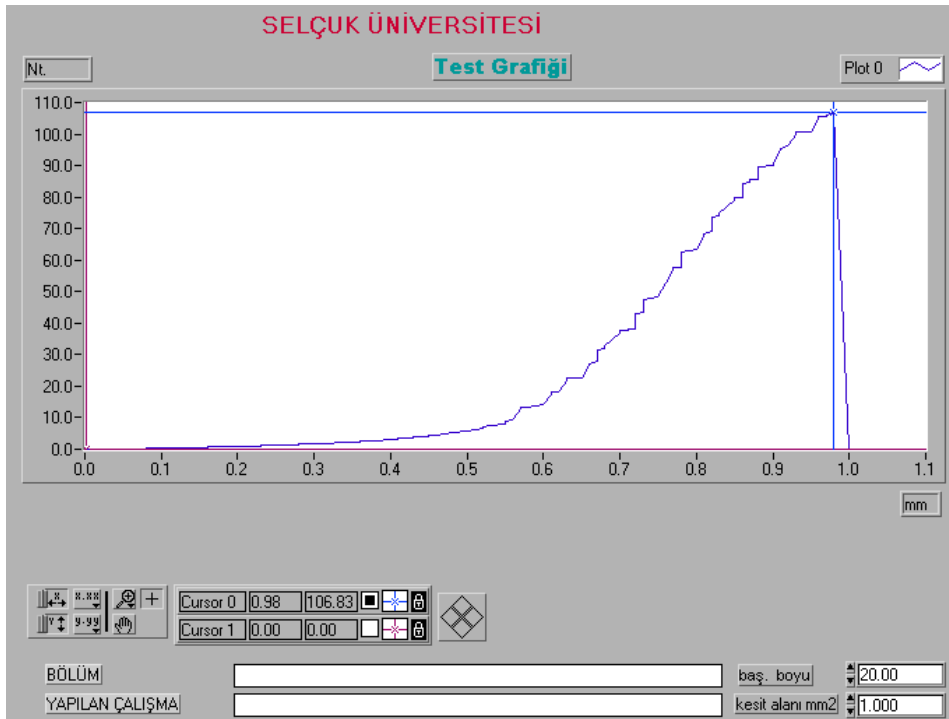
Resim 4,10: 9. hafta II. grup

Röntgenler incelendiğinde 4. haftada her iki grup arasında kaymana açısından fark görülmemekte, fakat 9. haftada II. grupta kaynamanın I. gruba göre daha iyi olduğu görülmektedir.

4.hafta; her iki grup arasında radyolojik fark belirgin olarak tespit edilmedi. Dokuzuncu hafta; I. grup, 4 nonunion, 3 kaynama, 1 osteomyelit, 1 loose görülmekte, II. grupta 8 kaynama, 1 nonunion görülmektedir.

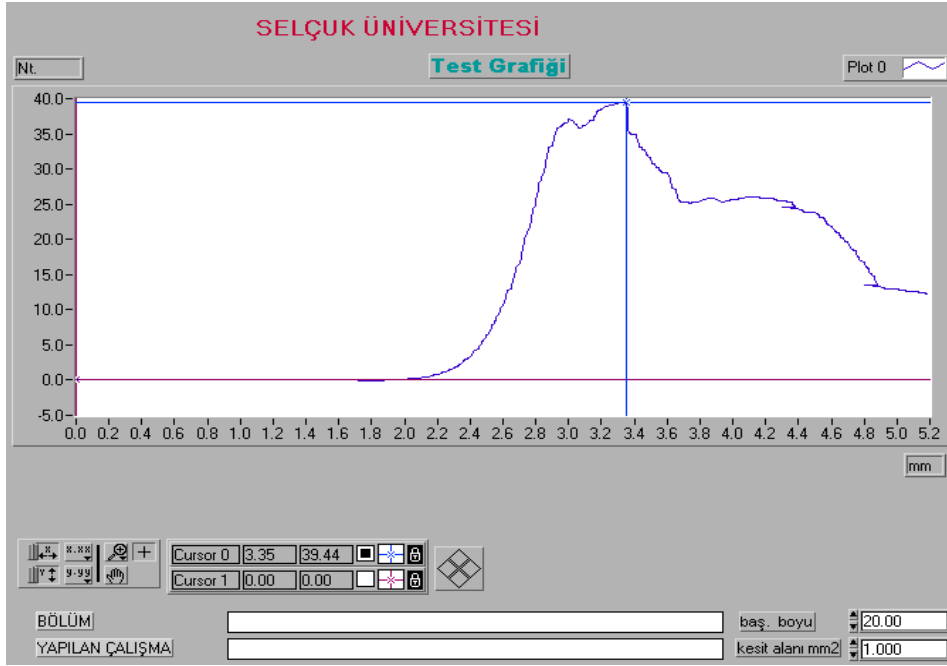
4. 3. Mekanik test sonuçları

Test cihazı ve hesaplamalar ile elde edilen mekanik çalışma sonuçları grafikler yardımı ile sunuldu (Şekil 4. 1). Grafikte normal femurun 106. 83 Newton yüke dayanabildiği, kırıldıktan hemen sonra mukavemetin düştüğü görülmektedir.



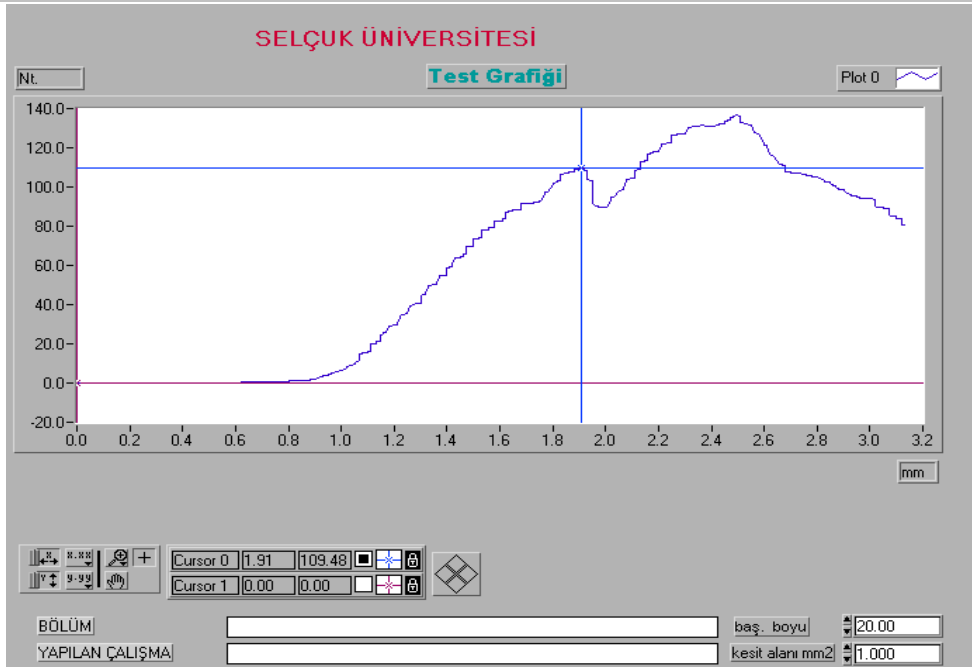
Şekil 4. 1: Grup III e ait bir deney numunesinin kuvvet-defleksiyon grafiği.

Şekil 4. 2 de grup I e ait kuvvet defleksiyon grafiği görülmektedir, PRP' siz iyileşen femur 39.53 Newton yükte kırılmıştır.



Şekil 4. 2: Grup I e ait bir deney numunesinin kuvvet-defleksiyon grafiği.

Şekil 4. 3 de grup II' ye ait kuvvet-defleksiyon grafiği görülmektedir. PRP ile iyileşen femurun 108. 69 Newton yükte kırıldığı görülmektedir. Defleksiyon grafiklerinde normal femurda kırık sonrası mukavemetin düştüğüne, grup 1 ve grup 2' de ise iyileşme dokusunda oluşan kallusun ve fibrozisin kırık sonrası mukavemet gösterdiğine dikkat ediniz.



Şekil 4. 3: Grup II' e ait bir deney numunesinin kuvvet-defleksiyon grafiği.

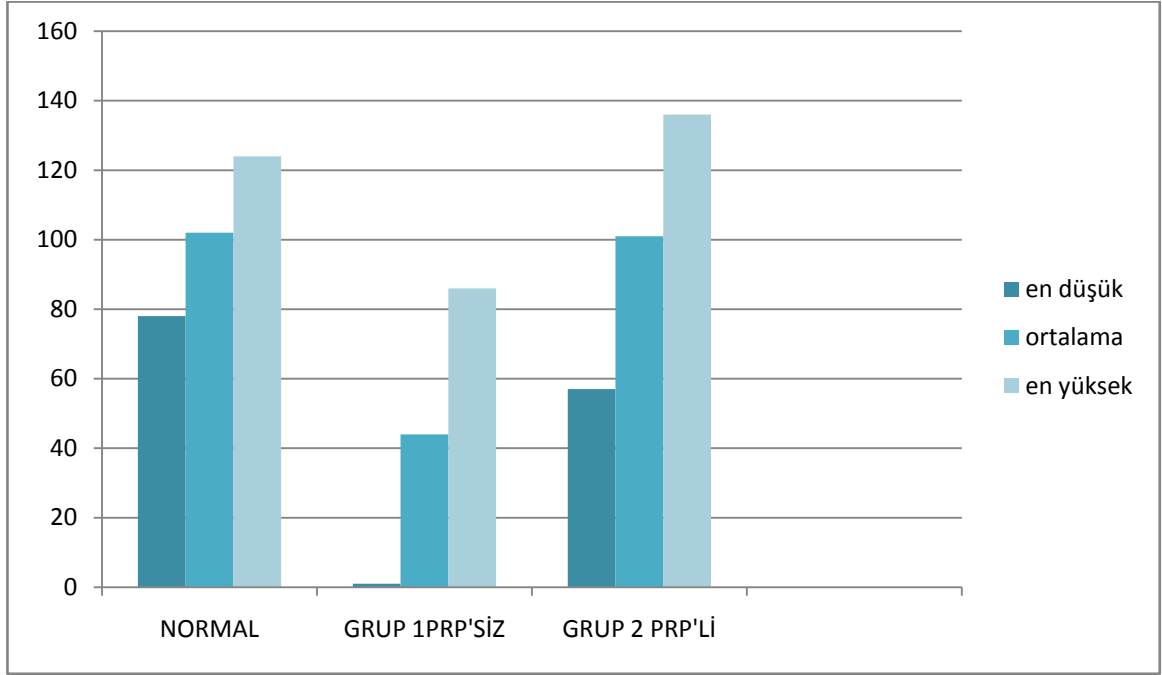
	NORMAL(Kontrol)	PRP'Lİ (Grup 2)	PRP'SİZ(Grup 1)
1	78.58	57.09	84.5
2	106.83	129.49	40.02
3	98.2	136.56	39.53
4	106.14	86.03	68.08
5	115.17	108.69	0
6	87.21	86.43	0
7	86.92	111.11	86.51
8	124.62	96.33	38.43
9	113.7		
10	103.13		

Tablo 4. 2: Grupların kırılıncaya kadar mukavemet ettiği maksimum yükler

Kırılma değeri: Newton(N)---Hız: 5 mm/dk

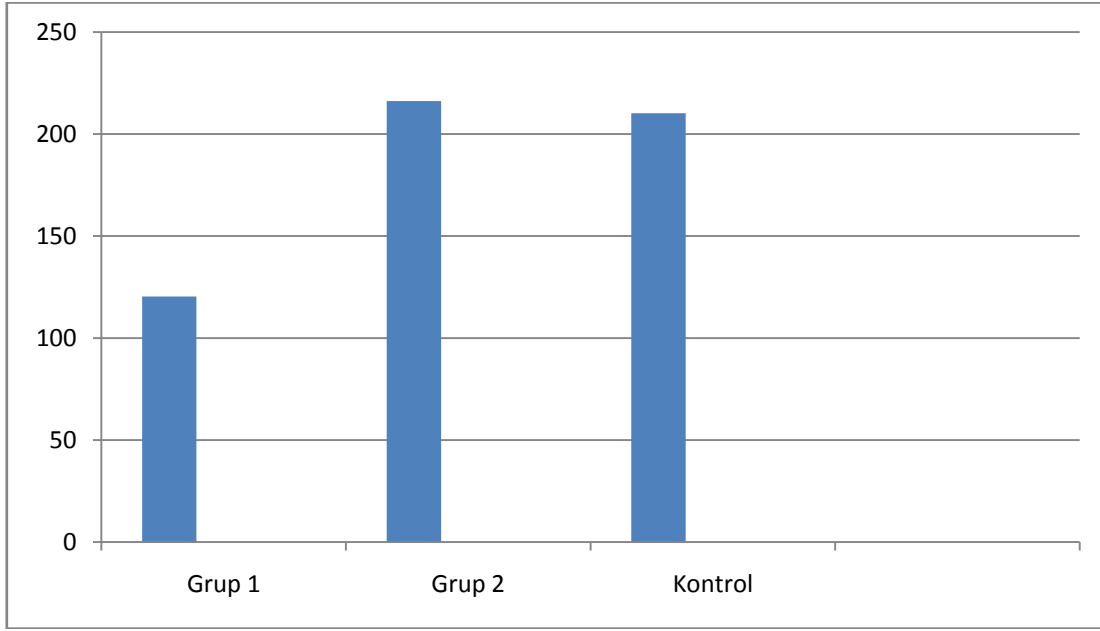
Tablo 4. 2' de her 3 grupta da sıçan femurlarının kırılıncaya kadar mukavemet ettiği maksimum yükler gösterilmiştir. Grup 1 yani PRP uygulanmayan grupta kırılma değerleri her 2 gruptan da düşük bulunmuştur. Tabloda grup 1' de görülen 2 tane sıfır değeri kaynama olmadığı için kırık testine tabi tutulamayan 2 femuru göstermektedir.

Kontrol grubu ve diğer iki metotla iyileştirilmiş femurlara ait kırılıncaya kadar mukavemet ettiği maksimum yükler karşılaştırılmıştır. PRP ile iyileşen kemiklerin (Grup II) en yüksek değere, PRP' siz iyileşen femurların en düşük değere sahip oldukları görülmektedir. (Şekil 4. 4)



Şekil 4. 4: Femurlara kırılıncaya kadar uygulanan ortalama kuvvetler.

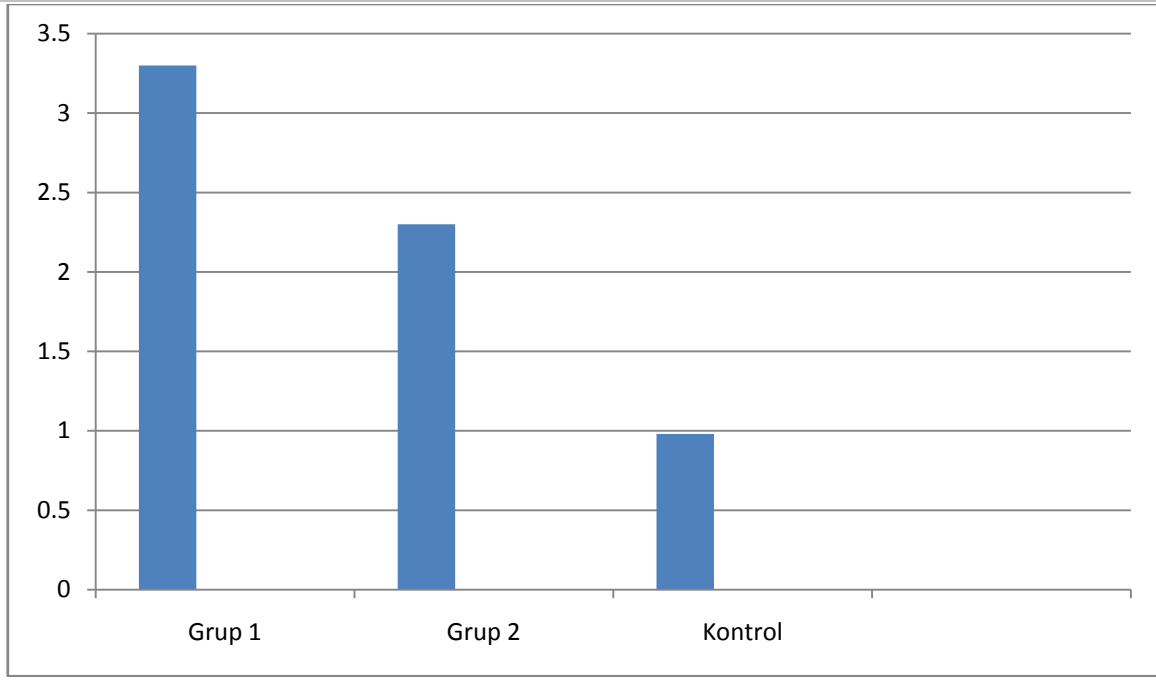
Rat femurlarının ortalama eğilme gerilmeleri (dayanımı) hesaplandı ve grafik yardımı ile ortalama eğilme gerilmeleri karşılaştırıldı. PRP' siz iyileşen kemiklerde (Grup 1) 120. 433 Mapa (mega paskal) olmak üzere en düşük değer bulundu. Bu değer absorbe ettiği enerjinin diğer gruplara göre ne kadar düşük olduğunu göstermektedir (Şekil 4. 5). Diğer grupların eğilme gerilmeleri ise Grup 2: 216.438 ve Kontrol Grubu: 210.235'dir.



Şekil 4. 5: Femurların kırılana kadar oluşturdukları ortalama eğilme gerilmeleri.(mega paskal)

Kontrol grubunun femurları kırılma testine tabi tutulduğun da dayanabildiği maksimum kuvvete geldikten sonra şekil değıştirmesi minimum seviyedeiken kırıldı, ancak çalışma başlangıcında kırık oluşturulan ve PRP ile ya da normal iyileştirilen femurlar kırılincaya kadar normal femurlara göre ileri derece şekil değıştirdiler, yani daha fazla eğildiler. PRP'siz iyileşen kemiklerde (grup I) normal kemiğe göre 3 kattan daha fazla esneme görüldü. Şekil 4. 1-2 ve 3 'deki kuvvet- defleksiyon grafikleri incelendiğinde normal femurun uygulanan kuvvete direkt cevap verip gerinimin son noktasında kırıldığı, diğer 2 grupta ise kırılmadan önce femurdaki eğilme fazla olduğu için uygulanan kuvvete karşı gerinimin son noktasında bir miktar plato çizdikten sonra femurun kırıldığı görülmektedir. Burada görülen plato femurun şekil değıştirmesi yani eğilmesidir. Normal kemik tüm yükü taşıyıp son noktada aniden kırıldı, fakat kırık sonrası iyileşen kemikler kırık hattından bir miktar esnedikten sonra kırıldı. Grupların şekil değıştirme değerleri sırasıyla şöyledir: Grup 1:3.33, Grup 2: 2.37, Grup 3:0.98

PRP ile iyileşen (grup 2) femurların ortalama eğilme miktarı iki grubun arasında bir değerdir (Şekil 4. 6).



Şekil 4. 6: Uygulanan kuvvet sonucunda femurlardaki eğilme miktarı.(mm)

PRP ile iyileşen kemiklerdeki (grup II) maksimum kırılma kuvvetleri ortalaması kontrol grubu ile benzerdir ve kırılıncaya kadar absorbe ettiği enerji miktarı da kontrol grubu ile kıyaslandığında birbirine yakın değerlerdir. PRP' siz iyileşen femurlardaki maksimum kırılma kuvvetleri ve dayanım gücü diğer iki gruba göre ise fark edilir şekilde düşüktür ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu da kırık iyileşmesinde PRP' nin olumlu etkisini göstermektedir. Aşağıdaki resimlerde her 3 gruba ait kırık öncesi ve sonrası örnekler görülmektedir.



Resim 4.11:Kontrol grubu 9. hafta kırık öncesi femurlar



Resim 4.12: Kontrol grubu 9. hafta kırık sonrası femurlar

Resim 4.12 de 9. hafta kontrol grubu normal sıçan femurlarında kırma testine tabi tutulduktan sonra, güç uygulanan bölgelerdeki kırıklar görülmektedir.



Resim 4.13: II grup 9. hafta kırık öncesi femurlar

Resim 4.13'de PRP uygulanan grup 9. hafta femur kırık öncesi resimleri görülmektedir, soldan 1. sıradaki femurda osteomyelite ve osteomyelit varlığına rağmen kaynamaya dikkat ediniz.



Resim 4.14: II grup 9. hafta kırık sonrası femurlar



Resim 4.15: PRP uygulanmayan 1. gruptan 9. haftada bir femurda osteomyelit ve kaynamama



Resim 4.16: I. grup 9. hafta kırık öncesi femurlar



Resim 4.17: I. grup 9. hafta kırık sonrası femurlar

Resim 4.16 ve 4.17’de PRP uygulanmayan gruba ait kırık öncesi ve kırık sonrası 2 adet resim görülmektedir. İki adet femurda kırık kaynaması olmadığı için kırık testine tabi tutulamadı ve resimlere eklenmedi.

5. TARTIŞMA

Kemik, iskelet sisteminin en önemli yapı taşını oluşturur. Yaşamsal organlara destek ve koruma sağlar, bazı temel iyonların vücuttaki konsantrasyonunun sağlanmasında görev alır ve son olarak ta üzerine yapışan kasların düzenli kontraksiyonu ile vücudun hareket etmesini sağlar (4,5).

Dıştan ya da içten gelen kuvvetler sonucunda kemiğin anatomik bütünlüğünde bozulma olmasına kırık denir (54). Kırık oluştuktan sonra çeşitli fizyolojik olaylar silsilesi ile kemik bütünlüğü yeniden sağlanmaya çalışılır. Çoğu dokudan farklı olarak kemik dokusu skar bırakmadan aslına en yakın şekilde iyileşir (55, 57). Kırık iyileşmesi kırığın olduğu andan itibaren başlar ve kemik tekrar eski halini alıncaya kadar devam eder (54).

Kırık iyileşmesi; 3 dönemde gerçekleşir; inflamasyon, onarım ve remodelasyon (65). Bu iyileşme sürecinde hem kemiği çevreleyen yumuşak doku, hem de medulla aktif olarak rol oynar (58, 59, 139). Kırık iyileşme sürecindeki hücreler arası fiziksel ve biyokimyasal etkileşimlerin anlaşılması, bu süreçlere etki edebilecek faktörlerin araştırılmasını sağlamıştır (140).

Kırık iyileşme sürecinde; travmanın şiddeti, şekli ve çevre yumuşak dokuların hasar derecesinin yanında, tedavinin nasıl yapıldığı ve kişinin genel sağlık durumunun da etkili olduğu gösterilmiştir (79, 135). Az sayıda kırık çeşidi tedavi gerektirecek şekilde iyileşme sorunları gösterir, bunun dışında konservatif veya cerrahi tedavi yollarıyla sorunsuz biçimde iyileşirler (136, 137). Günümüze kadar kırık iyileşmesini hızlandırmaya yönelik çeşitli teknikler denenmiştir. Kırık iyileşme sürecinin hızlandırılması için yapılmış çalışmalardan bazıları klinikte kullanım alanı bularak; tekrarlayan tedavi gereksinimlerini, işgücü kaybını, morbidite miktarını ve tedavi masraflarının azalmasını sağlamış, kaynama oranlarını iyileştirerek kişiyi kısa sürede normal hayatına döndürmüştür (137, 138). Bunların bir kısmı; elektrik stimülasyonu, mekanik stimülasyon ve ultrasaund'dur (136, 141). Kemik kaynamasını biyolojik olarak hızlandırabilecek otojen ve allojen kemik greftleri, sentetik greftler, otojen kemik iliği ve büyüme faktörleri (135, 142, 143), BMP (144, 145), TGF- β (146, 147), fibroblast büyüme faktörü (148, 149), insülin benzeri büyüme faktörü, büyüme hormonu (150), PDGF (151), vasküler endotelial büyüme faktörü (152, 153) ve NGF (154) vb. çalışmalar da yapılmıştır. Literatürdeki bu çalışmalarda sayılan büyüme faktörlerinin kırık iyileşmesine etkili olduğu gösterilmiştir, PRP (TZP: trombosit zengin plazma) tüm bu sayılan growth faktörleri içeriğinde bulundurmaktadır ve bu çalışmanın amacı PRP'nın kırık iyileşmesi üzerine etkisini göstermektir.

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörlerden biriside kırığın şekli ve yaralanmanın tipidir. Açık ya da kapalı kırık olması, segmental ya da tek transvers bir kırık olması tedavi yaklaşımını ve sonucunu etkiler. Kırık olduğu anda ortamda bulunan hücre çeşitliliği, faktörlerin düzeyi de iyileşmeyi etkiler (155,156). Kapalı kırıklarda kaynama, hematoma boşalmaması ve çevre yumuşak doku hasarının daha az olması gibi sebeplerden dolayı açık kırıklara göre daha iyidir. Yapılan deneysel çalışmalarda kapalı kırık yöntemi de kullanılmıştır. Açık kırık modelinde ise kaynama daha geç olmakta ve gruplar arasındaki kaynama oranlarının karşılaştırılması daha kolay olmaktadır (155). Bu çalışmada açık osteotomi uygulandı, çünkü oluşturulan jel kıvamındaki PRP'nın kırık hattına uygulanabilmesi için açık osteotomi gerekliydi.

Osteotomi sonrası kırık tespiti; intramedüller tespit, eksternal fiksator ve plak uygulaması yöntemleri gibi farklı şekillerde yapılmıştır (157, 158). Özellikle intramedüller tespit benzer çalışmalarda ve ratlarda tercih edilen bir yöntemdir (147, 157, 159, 160). Bu çalışmada osteotomi hattından diz eklemine retrograd K teli gönderilerek, diz ve kalça eklemleri açılmadan K teli ile tespit uygulandı. Tespit sonrası, diz ve kalça eklem hareketleri kontrol edilip, herhangi bir kısıtlılık olmadığı görüldü ve anestezi etkisi geçtikten sonra diz ve kalça eklem hareketlerine izin verilerek sıçanlar serbest bırakıldı. Temin etmedeki ve uygulamadaki kolaylığın yanında rijit bir tespit yapmadan kallus oluşumuyla sekonder iyileşme sağlandı.

Kırık iyileşmesi üzerine yapılmış çalışmalarda fare, rat, tavşan, köpek gibi farklı hayvanlar kullanılmıştır (157). Bu çalışmada; denek sayısının fazla olması, kolay temin edilebilirliği, şartlara hızlı uyumu, enfeksiyona dirençli olmaları ve izogenetik olmaları nedeniyle ratlar kullanıldı. Benzer çalışmaların çoğunlukla ratlar üzerinde yapılmış olduğu görülmektedir (151, 161).

Kırık iyileşmesinin histolojik analizinde çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Huo ve arkadaşları kırık bölgesindeki hücresel farklılaşmayı 1 den 10'a kadar puan vererek derecelendirmişler (162). Allen ve arkadaşları kallus dokusunun iyileşme aşamalarının 0'dan 4'e kadar puanlamışlardır (161). Bunlara ek olarak Modifiye Lane-Sandhu histolojik değerlendirme skalası da kullanılmıştır (159). Bu skalada korteks, spongios kemik ve kemik iliği ayrı ayrı değerlendirilerek toplam 20 puan üzerinden derecelendirilmektedir. Bu çalışmada histolojik değerlendirme yöntemi olarak Modifiye Lane-Sandhu histolojik değerlendirme skalası kullanıldı (133).

Benzer çalışmalarda radyolojik değerlendirme için farklı yöntemler kullanılmıştır. X-Ray ile kırık uçları arasındaki köprüleşme, kırık hattının fark edilebilirliği, kallus genişliği gibi parametreler değerlendirilmiştir (147, 149). Bu parametrelerin ayırımıdaki değerlendirmeler

sırasında hata oranının yüksek olacağı düşünüldüğü için istatistiksel olarak çalışmaya alınmadı. Fakat grupların haftalara göre kaynama oranlarının görsel farklılıklarını ortaya koymak için röntgenler çalışmaya eklendi (161, 163, 164).

Plateletten zengin ürünlerin hazırlanış mantığı, aktive edilebilir proteinlerden ve PDGF, TGFbeta, VEGF, IGF1, hepatosit büyüme faktör- HGF, platelet faktör4-PF4 ve trombospondin gibi doku iyileşmesinde yerel etkili olan faktörlerden zengin pıhtıyı yerine koymaktır. Eritrositlerden ve lökositlerden arındırılmış, yara iyileşmesi ve doku rejenarasyonu sağlayan büyüme faktörlerin saklandığı konsantre plateletler hazırlanır (3). PRP 'nın potansiyel avantajlarından birisi: hastaların kendi kanından basit bir santrifüj sonrası kolayca elde edilebilmesidir. Santrifüj parametreleri ve aktivasyon protokolü gibi hazırlama teknikleri aktivasyonda salınan proteinlerin ve büyüme faktörlerinin doz kontrolünü mümkün kılmaktadır (124). Çalışmalarda platelet ürünlerini santrifüj sonrası aktifleştirmek için trombin kullanımından da söz edilmesine rağmen bu çalışmada, yine başka çalışmalarda sürekli büyüme faktörü salınımını gerçekleştirdiği gösterilen kalsiyum klorid aktivatör olarak kullanıldı (125).

TZP (trombositten zengin plazmanın)'nın kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur, fakat bu çalışma PRP'nin kırık iyileşmesi üzerine olan etkilerini histolojik, radyolojik ve mekanik olarak değerlendirmektedir. Yine yara iyileşmesi, tendon iyileşmesi, diz osteoartriti, sinovit, tendinopati, diyabetik ayak yarası gibi durumlarda PRP'nin olumlu etkilerini gösteren çalışmalar yapılmıştır.

Sanchez ve arkadaşları, 16 aseptik nonhipertrofik nonunionu olan 15 hastayı PRP kullanarak tedavi ettiklerini açıklamışlardır. Unstabil kırıkları olan hastalara plak ya da i.m. çivilemeye ek olarak allojenik greft ile karıştırılmış PRP uygulaması, stabil kırıklara da sadece perkütan PRP enjeksiyonu yapmışlardır. Ortalama 4,9 ayda tüm kırıklarda kaynama elde etmişlerdir (165). PRP'nin kemikte oluşturulan yapay defektlerde kemik rejenerasyonunu hızlandırdığı ve titanyum diş implantlarının osseointegrasyonunu iyileştirdiğini gösteren başarılı çalışmalar vardır (166). Diz osteoartrisinde; birer hafta ara ile enjeksiyon yapılarak hyaluronik asit ile PRP'nin etkinliğini kıyaslayan, faydalarını ve güvenilirliğini gösteren ancak, yeni çalışmalar ile desteklenmesi gereken çalışmalar bulunmaktadır (167).

PRP' nin etkilerini gösteren çalışmalardan birisi de Geng ve arkadaşlarının kırık adet tavşan üzerinde yaptıkları tendon çalışmasıdır. Tavşanların sağ bacaklarında aşıl tendon kesisi oluşturulmuş ve 2 grup oluşturularak tavşanlar randomiz edilmiş. Takiplerinde tüm tendonlar iyileşmiş ancak PRP uygulanan deney grubunda kontrol grubuna göre anastomoz sahasında

daha az fibröz doku görülmüş. Histolojik olarak deneysel grupta tamir sahasında daha çok kollojen fibril görülmüş, neticede; PRP'nın tavşan tendonlarında iyileşmeyi hızlandırdığı ve iyileşme kalitesini artırdığı görülmüştür (168). Yine 20 adet tavşan 10'ar adet randomize edilerek 2 grup oluşturulmuş. %4 papain diz eklemlerine enjekte edilerek osteoartrit modeli oluşturulduktan sonra deney grubunun diz eklemlerine, 10 hafta sürecinde birer hafta arayla 0,3 ml otolog PRP, kontrol grubunun diz eklemlerine 0,3 ml SF enjekte edilmiş. Deney sonunda kontrol grubu sinovyalı ödemi ve ESR değerleri yüksek olarak bulunurken, deney grubunda sinovya iyileşmiş ve ESR seviyeleri çok daha düşük olarak bulunmuş. PRP'nın inflamatuvar faktörleri düşürdüğü ve papain'e bağlı sinoviti iyileştirdiği kanaatine varmışlardır (169).

İyileşmeyen diyabetik ayak yaraları, uzun süre tedavi edilirler, neticede büyük oranda amputasyonla sonuçlanırlar. Ciddi miktarda maliyete ve hastaların yaşam kalitelerinin düşmesine neden olurlar. Saad ve arkadaşları PRP'nın doku iyileşmesini hızlandırıcı etkisinin gösterilmesi üzerine, diyabetik ayak yarası bulunan 24 hasta üzerinde çalışma yapmışlar. İki gruba ayırdıkları hastalardan 1. gruba PRP uygulamışlar ve PRP'nın iyileşmeyi önemli derecede hızlandırdığını bulmuşlardır (170).

Bu çalışmada 70 adet sıçan randomize edilerek 3 gruba ayrıldı. Birinci grup (n:30) kırık oluşturulup PRP uygulanmayan, 2. grup (n:30) kırık oluşturulup PRP uygulanan ve 3. grup (n:10) kırık oluşturulmayıp, diğer sıçanlarla aynı ortamda bulunup, aynı besinleri tüketen ve deney sonunda mekanik kırılma testine tabi tutulan gruptur. Dört ve 9.haftalarda 1 ve 2. gruba tavşanlar randomize edilerek histolojik ve radyolojik, yine 9. haftada 3 gruba da mekanik test uygulandı. Çalışma sonunda PRP'nın kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisi gösterildi. Bu çalışmanın diğer çalışmalardan farkları: istatistiksel olarak anlamlı bir sayıda yapılması, radyolojik, histolojik ve mekanik olarak kırık iyileşmesinin test edilmesidir.

Histolojik inceleme sonucunda 4. ve 9. haftalarda grup 1 ve 2 karşılaştırıldığında kırık iyileşmesinde anlamlı fark bulundu. PRP uygulanmayan grupta 4. haftada fibröz iyileşme görülürken, PRP uygulanan grupta 4. hafta osteokondral kemik oluştuğu görülmekteydi ve PRP uygulanmayan gruba göre spongioz kemiğin reorganize olduğu ve kemik iliğinin oluşmasının daha hızlı gerçekleştiği görüldü.

Röntgenler incelendiğinde 4. haftada her iki grup arasında kaymana açısından belirgin fark görülmedi fakat 9. haftada II. grupta kaynamanın I. gruba göre daha iyi olduğu görüldü. Dördüncü hafta; her iki grup arasında radyolojik fark belirgin olarak tespit edilmedi. 9.hafta; I. grup: 4 nonunion, 3 kaynama, 1 osteomyelit, 1 loose, II. Grupta 1 nonunion, 8 adet kaynama olduğu görüldü. Çalışmalarda trombositten zengin plazmanın iyileşmeyi hızlandırmak için ek dozlarda yapıldığı görülmektedir (165). Dokuzuncu haftada kaynamayan tek femura ek doz yapılabilirdi ancak çalışma sonlandırıldı için ek doz yapılmadı.

ÜNE (Üç Noktadan Eğme) kemik kırma testi esnasında femurların enine kesitinde çekme ve basma gerilmeleri oluşur. Ayrıca femuru eğmeye çalışan tekil kuvvetin oluşturduğu eğilme momenti ile bu kuvvetin oluşturduğu defleksiyon miktarı femur özellikleri hakkında önemli veriler ortaya çıkarmaktadır. Grup 1 yani PRP uygulanmayan grupta kırılma değerleri her 2 gruptan da düşük bulundu. Kontrol grubu ve diğer iki metotla iyileştirilmiş femurlara ait kırılıncaya kadar mukavemet ettiği maksimum yükler karşılaştırıldı. PRP ile iyileşen kemiklerin (Grup II) en yüksek değere, PRP' siz iyileşen femurların en düşük değere sahip oldukları görüldü. Rat femurlarının ortalama eğilme gerilmeleri (dayanımı) hesaplandı ve grafik yardımı ile ortalama eğilme gerilmeleri karşılaştırıldı. PRP' siz iyileşen kemiklerde (Grup 1) 120. 433 Mapa (mega paskal) olmak üzere en düşük değer bulundu. Bu değer absorbe ettiği enerjinin diğer gruplara göre ne kadar düşük olduğunu gösterdi. Diğer grupların eğilme gerilmeleri ise Grup 2: 216.438 ve Kontrol Grubu: 210.235' dir.

Kontrol grubunun femurları kırılma testine tabi tutulduğunda dayanabildiği maksimum kuvvete geldikten sonra şekil değiştirmesi minimum seviyedeiyken kırıldı, ancak çalışma başlangıcında kırık oluşturulan ve PRP ile ya da normal iyileştirilen femurlar kırılıncaya kadar normal femurlara göre ileri derece şekil değiştirdiler, yani daha fazla eğildiler. PRP' siz iyileşen kemiklerde (grup I) normal kemiğe göre 3 kattan daha fazla esneme görüldü. Normal kemik tüm yükü taşıyıp son noktada aniden kırıldı, fakat kırık sonrası iyileşen kemikler kırık hattından bir miktar esnedikten sonra kırıldı. Grupların şekil değiştirme değerleri sırasıyla şöyledir: Grup 1:3.33, Grup 2: 2.37, Grup 3: 0.98

PRP ile iyileşen (grup 2) femurların ortalama eğilme miktarı iki grubun arasında bir değerdir. PRP ile iyileşen kemiklerdeki (grup II) maksimum kırılma kuvvetleri ortalaması kontrol grubu ile benzerdir ve kırılıncaya kadar absorbe ettiği enerji miktarı da kontrol grubu ile kıyaslandığında birbirine yakın değerlerdir. PRP' siz iyileşen femurlardaki maksimum kırılma kuvvetleri ve dayanım gücü diğer iki gruba göre ise fark edilir şekilde düşüktür ve bu

değerler istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu da kırık iyileşmesinde PRP^c nın olumlu etkisini göstermektedir.

Çalışma esnasında, PRP uygulanan sıçanlarda daha az yara yeri problemi ve daha hızlı yara iyileşmesi görüldü. Kırık tespiti sonrası tüm sıçanlar, bacakları serbest bırakılmalarına rağmen bacaklarını kullanmadılar, ancak, PRP uygulanan grupta sıçanlar yük vermeye ikinci haftada başlarken, diğer grupta bu durum 4. haftaya kadar gecikti.

6. SONUÇ

Yetmiş adet sıçan ile çalışmaya başlandı, grup 1 ve grup 2'den 7 adet sıçanın kafesinde ölü olarak bulunması üzerine 63 sıçan ile çalışmaya devam edildi. 4 ve 9. haftalarda PRP uygulanan ve uygulanmayan sıçanlardan rastgele seçilerek radyolojik ve histolojik çalışmalar yapıldı ve deney sonunda her 2 grup ve kontrol grubu kemik kırma testine tabi tutuldu. İstatistiksel olarak anlamlı sayıda denek üzerinde, histolojik, radyolojik ve mekanik olarak PRP'nin kırık iyileşmesi üzerine olan etkisi araştırıldı.

Histolojik inceleme sonucunda 4. ve 9. haftalarda grup 1 ve 2 karşılaştırıldığında kırık iyileşmesinde anlamlı fark bulundu. PRP uygulanmayan grupta 4. haftada fibröz iyileşme görülürken, PRP uygulanan grupta 4. hafta osteokondral kemik olduğu görüldü. PRP uygulanmayan gruba göre spongios kemiğin reorganize olması ve kemik iliğinin oluşmasının PRP uygulanan grupta daha hızlı gerçekleştiği görüldü.

Radyolojik olarak 4. haftada belirgin fark tespit edilmedi. Dokuzuncu haftada grup 2(PRP uygulanan)'nin neredeyse tamamına yakınında(1 nonunion, 8 kaynama) kaynama görülürken, grup 1'de yarıdan fazla kaynamama(3 kaynama, 4 nonunion, 1 osteomyelit) tespit edildi.

Grup 1 yani PRP uygulanmayan grupta kırılma değerleri her 2 gruptan da düşük bulundu. PRP ile iyileşen kemiklerdeki (grup II) maksimum kırılma kuvvetleri ortalaması kontrol grubu ile benzerdir ve kırılıncaya kadar absorbe ettiği enerji miktarı da kontrol grubu ile kıyaslandığında birbirine yakın değerlerdir. PRP' siz iyileşen femurlardaki maksimum kırılma kuvvetleri ve dayanım gücü diğer iki gruba göre ise fark edilir şekilde düşüktür ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu da kırık iyileşmesinde PRP'nin olumlu etkisini göstermektedir.

Bu konuda yapılmış diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada, femurların mekanik sağlığını test etmek ve gruplarla olan ilişkisini belirlemek amacı ile kontrol grubu da oluşturuldu. Bu sayede her iki gruptaki iyileşme farklarını histolojik ve radyolojik olarak birbirleri ile karşılaştırmanın yanında her iki grubun mekanik özellikleri de kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Bu çalışma; PRP'nin kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisini göstermektedir. PRP'nin kırık ve doku iyileşmesinin yanında, ortopedinin büyük problemlerinden olan kaynamama ve geç kaynama gibi durumlarda ve büyük cilt defektlerinde yara iyileşmesi ve greftlemede kullanılabileceği, bu konularla ilgili de yeni çalışmalar gerektiği kanaatindeyiz.

7. ÖZET

Bu çalışma PRP(Platelet rich plasma-Trombositten zengin plazma)'nın kırık iyileşmesine etkilerini araştırmak için ratlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışmadır. Plateletten zengin ürünlerin hazırlanış mantığı, aktive edilebilir proteinlerden ve PDGF, TGFbeta, VEGF, IGF1, hepatosit büyüme faktörü-HGF, platelet faktör4-PF4 ve trombospondin gibi doku iyileşmesinde yerel etkili olan faktörlerden zengin pıhtıyı yerine koymaktır. Eritrositlerden ve lökositlerden arındırılmış, yara iyileşmesi ve doku rejenarasyonu sağlayan büyüme faktörlerinin saklandığı konsantre plateletler hazırlanır(3). PRP'nın potansiyel avantajlarından birisi de: hastaların kendi kanından basit bir santrifüj sonrası kolayca elde edilebilmesidir. Bu çalışmada, güvenilir, ucuz ve temini kolay bir yöntem olan PRP'nın kırık kaynaması üzerine olan etkisini araştırmak hedeflendi. Çalışmanın sonunda PRP'nın hem ratlardaki oluşturulan kırığın kaynaması üzerine olumlu etkisi, hem de PRP uygulanan grupta daha az yara yeri komplikasyonu olduğu histolojik ve radyolojik tetkikler sonucunda görüldü.

70 adet dişi ratın 60 adeti 2 gruba ayrıldı, 60 adet ratın tamamının sol femuları açık osteotomize edildi ve K teli ile tespit edildi. Randomize edilen ratların I. grubuna ek bir müdahale yapılmadan cilt kapatılması yapıldı. II. grubun kırık hattına PRP konularak ciltleri kapatıldı. 10 adeti çalışma sonunda mekanik testin kontrol grubu (grup III) olarak ayrıldı.

Dört ve 9. haftalarda her gruptan ortalama 9'ar adet rat yüksek doz eter ile sakrifiye edildi. Alınan femurlar radyolojik ve histolojik olarak değerlendirildi. Histolojik değerlendirmede Modifiye Lane-Sandhu kemik iyileşme skalası kullanıldı. Dokuzuncu haftanın sonunda I. gruptan 8 adet rata, II. gruptan 8 adet rata ve III. gruba mekanik test uygulandı. Mekanik test ÜNE prensibine göre yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede Mann-Whitney U testi, Wilcoxon işaretli sıra testi ve Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi.

İyileşme miktarları histolojik olarak II. grupta daha yüksek olarak bulundu. Radyolojik değerlendirmenin istatistiksel analizini çalışmaya eklenmedi. Grupların kaynama oranları hakkında fikir vermesi amacıyla fotoğraflarına yer verildi. Radyolojik açıdan da incelendiğinde kemik iyileşmesinin II. grupta daha hızlı olduğu görüldü. Mekanik test sonuçları da kaynama miktarı ve kemik direncinin II. grupta daha iyi olduğunu gösterdi.

Bu konuda yapılmış diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada femurların mekanik sağlamlığını test etmek ve gruplarla olan ilişkisini belirlemek amacı ile kontrol grubu da oluşturuldu. Bu sayede her iki gruptaki iyileşme farklarını histolojik ve radyolojik olarak birbirleri ile karşılaştırmanın yanında, her iki grubun mekanik özellikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Bu çalışma; PRP'nın kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisini göstermektedir. PRP'nın kırık ve doku iyileşmesinin yanında, ortopedinin büyük problemlerinden olan kaynamama ve geç kaynama gibi durumlarda ve büyük cilt defektlerinde yara iyileşmesi ve greftlemede kullanılabileceği, bu konularla ilgili de yeni çalışmalar gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Kırık iyileşmesi, PRP, mekanik test

8. ABSTRACT

In this experimental study, effect of platelet rich plasma (PRP) on bone healing was investigated. The initial rationale of platelet-rich products was to replace the blood clot with a preparation enriched in platelets which could, once activated, secrete a large pool of proteins and factors including PDGF, TGF β , VEGF, IGF1, hepatocyte growth factor-HGF, platelet factor 4-PF4 and thrombospondin among others to the local milieu driving the tissue regeneration mechanism. By extracting erythrocytes and leukocytes, the preparation would take full advantage of the concentrated platelets and the stored growth factors, enabling an accelerated wound healing and tissue regeneration.⁽³⁾ One potential advantage of platelet-rich preparations is easily obtaining from patient's blood after a simple centrifugation process. Aim of this study is to investigate the effect of PRP on fracture healing. As a result of radiological and histological studies both positive impact on bone healing of PRP and in group that applied PRP with less wound complications were seen.

Seventy female Wistar Albino rats were divided into 3 groups. Group I included 30 animals which underwent primary femoral osteotomy with K wire fixation. In group II (n:30), PRP was applied to the osteotomy side in addition, and in group 3, no surgical intervention wasn't applied.

Nine animals taken from group 1 and 2 and 10 animals from group 3 at 4th and 9th post operation week for sacrifice. Radiological and histological assessment were done in all femoral specimens. Modified Lane Sandhu bone healing scale was used for histological evolution, mechanical test was performed for 8 animals in group I, eight animals in group II and for all animals in control group at the end of the 9th week. Mechanical test was performed according to three-point bending (TPB) principle. Mann-Whitney U test, Wilcoxon and Bonferroni correctable Mann-Whitney U test were used for statistical evaluation. $P < 0.05$ was accepted for statistical significance.

In group 2 histological improvement was found to be higher. Moreover bone healing was faster in group 2 radiologically. Mechanical test results showed that ratio of healing and bone strength were better in group 2.

Unlike other studies on this subject, in this study, control group was created to test the mechanical strength of femurs and determine the relationship between groups. In this way, histological and radiological improvement in both groups' differences were compared with each other and mechanical properties of both groups were compared with the control group.

This study shows the positive impact of PRP on healing of fractures like other studies in the literature, so PRP can be used on nonunion, delayed union and large skin defects for healing and grafting. We believe that new studies are needed on these issues.

Key words: Bone healing, platelet rich plasma, PRP, mechanical test

9. KAYNAKLAR

1. Boström MPG, Boskey A, Kaufman JK. Form and functional of bone. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SA, eds. Orthopaedic Basic Science. 2nd Ed. Aurora, IL American Academy of Orthopedic Surgeons, 2000:320-369.
2. Eduardo Anitua, Mikel Sanchez, Gorka Orive, Isabel Andia. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. Elsevier 2007
3. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nudern AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost 2004;91:4-15.
4. L.Carlas Jungueira, Jose Corneiro, Robert O'Kelley. Temel Histoloji. İstanbul: Barış Kitapevi. 1998: 132-150
5. Lian, J.B., Stein, G.S., Canalis, E., Gehron-Robey, P., et al: Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins and the mineralization process, in Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 4th ed., Favus, M. 1., Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, chap. 3
6. Yetkin H, Yazıcı M., (ed). Miller'in Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006: 1
7. Kutsal Y.G., (ed). Osteoporoz. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2005: 37-38
8. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology-I. In Pritchard DJ (ed). Instructional Course Lectures Volume 45, AAOS, 1996; 371-86
9. Schenk RK: Biology of fracture repair. In Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG (ed). Skeletal Trauma Vol 1. Third edition. Saunders Co, Philadelphia 2003; 29-73
10. Gil FTH, Gracia MAA, Pingarron MC, Jerez LB: Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11 :E47-51
11. Grant, P.R. (2003) Oral Cells And Tissues. Quintessence Publishing Co. Inc. Illinois: Chapter 7-8. page 442-57
12. Gehron-Robey, P., Boskey, A.L. (1996) The biochemistry of bone, in Osteoporosis. Marcus, E., Feldman, D., Kelsey, J., Eds., Academic Press, San Diego, chap. 4. page 74-8
13. Gorski JP. (1998) Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different

- underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med*; 9: 201-223
14. Lian, J.B., and Stein, G.S.,(1996) Osteoblast biology, in *Osteoporosis*, Marcus R., Feldman, D., and Kelsey, I., Eds., Academic Press, San Diego, chap. 2. p.23-7
 15. Bölükbaşı N. Alveol kemiği implant ilişkisi. (2004) İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Oral İmplantoloji Anabilim Dalı. Seminer çalışması
 16. Corradi C., Cozzolino A.(1952) The action of ultrasound on the evolution of an experimental fracture in rabbits. *Minerva Ortop.*55:44-5
 17. Junguiera, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.(1998) *Temel Histoloji*. 8. Baskı İstanbul: Barış Kitabevi Ltd.Şti. 132-151.
 18. Şirin SY. (2005) Deneysel olarak meydana getirilen kemik defektlerine yerleştirilen farklı tipteki yapay kaynaklı greft materyallerinin kemikleşmesinde hiperbarik oksijen uygulamasının etkilerinin incelenmesi Doktora tezi. İ.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş – Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. İstanbul
 19. Marie, P.J. Cellular and molecular alterations of osteoblasts in human disorders of bone formation, *Histol. Histopathol*,1999; 14, 525.
 20. Frost, H.M., (1960) In vivo osteocyte death, *J. Bone Joint Surg.*, 42A,138.
 21. Noble BS, Stevens H, Mosley JR, Pitsillides AA, et al: (1997) Bone loading changes the number and distribution of apoptotic osteocytes in cortical bone. *J Bone Miner Res*; 12(Suppl 1):S111.
 22. Noble B, Stevens H., Loveridge, N., and Reeve, J.,(1997) Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone, *Bone*, 20,273.
 23. Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Parfitt, A. M., and Manolagas, S.C., (1998) Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids, *J. Clin. Invest* L, 102,274.
 24. Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Roberson, P, Parfitt, A. M., and Manolagas, S., (1999) Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone, *J. Clin. Invest*, 10-4, 439
 25. Hollinger J.O., Buck C.D., Bruder P.S. *Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Theraphy*. In “Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics”. Lynch S.E., Genco R.J., Marx, R.E. 1 st edition Quintessence publishing, 1999, chap1.

26. Marie P.J., Cellular and molecular alterations of osteoblasts in human disorders of bone formation. *Histol. Histopathol*, 1999; 14,525
27. Puzas, F. J. and Lewis, G. D., Biology of osteoclasts and osteoblasts, in *Orthopaedics. Principles of Basic and Clinical Science*, Bronner, F., and Worrell, R.V., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1999, chap. 3.
28. Y.G.,(ed). Osteoporoz.2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2005: 44
29. Brinker M.R., Miller D., Basic science. In: Miller D.(ed): *Review of Orthopaedics*, (2nded). W.B. Saunders, Philadelphia:1996; p 1-30
30. Burchard H. Biology of cortical bone graft incorporation. In:Burchard H(ed): *Osteochondral Allograft* (2nd ed). W. B. Saunders, Philadelphia: 1983; p 51-57
31. Buckwalter JA. Musculoskeletal tissues and the musculoskeletal system. In: Weinstein SL, Buckwalter JA(eds), *Turek's Orthopaedic Principles and Application* (5nded). JB. Lippincott company, Philadelphia: 1994; p 13-35.
32. Bruder S.P., Fink D.J., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; 56:283.
33. Buckwalter JA,Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology. Part 1. Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. *J Bone Joint Surg. Am.*1995; 77A: 1256.
34. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Ortop Res*1991; 9: 641
35. Revell PA. *Pathology of Bone*. Great Britain : Springer - Verlag. Berlin Heidelberg : 1986; 1-30, 203-231.
36. Frost H.M. The biology of fracture healing and over view for clinicians part I. *Clin. Ortop Rel Res* 1979;248: 283-293
37. Hing KA: Bone repair in the twenty-first century: biology,chemistry or engineering?.*Phil.Trans.R.Soc.Lond.A* 2004;362:2821-50
38. Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh JL:Bone and joint healing.In Bucholz RW, Heckman JD (ed). *Fractures in Adults Vol 1*.Fifth edition. Lippincott Co, Philadelphia 2001; 245-71
39. Rubin E, Farber J.L. *Pathology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1988
40. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG: Structure, expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res*. 1992;281:275-94

41. Wozney J.M., Rosen V, Byrne M, et al. Growth factors influencing bone development. J Cell Sci Suppl. 1990; 13: 149
42. Ballı, B. Kemik iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler. Bitirme tezi. İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi. İstanbul; 2004.
43. Kutsal Y.G.,(ed). Osteoporoz.2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2005: 39
44. Cowin, S.C. Bone Mechanics Handbook. 2nd edn. Boca, Raton, London, New York, Washington: CRC Press. 2001; Bölüm 1: 1-68, Bölüm 2:1-24
45. Yetkin H, Yazıcı M., (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006: 5
46. Meade JB, Cowin SC, Klawitter JJ, Van Buskirk WC. At al: (1984) Bone remodeling due to continuously applied loads. Calcif Tissue Int; 36, 25-30.
47. Yetkin H, Yazıcı M., (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006: 10
48. Buckwalter JA,Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology-I.In Pritchard DJ(ed).Instructional Course Lectures Volume 41, AAOS,1996;99-387
49. Yetkin H, Yazıcı M., (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006: 12
50. Yetkin H, Yazıcı M., (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006: 16
51. Marks S.C., Popoff S.N. Bone cell biology: The regulation development, structure, and function in the skeleton. The American Journal of Anatomy 1988; 183: 1-44.
52. Martin, R.B. Burr, D.B., Mrechanical adaptation, in Structure, Function and Adaptation of Compact Bone. Raven Press, New York, 1989, chaps.2,4,7 and 8.
53. Shearer JR, Roach HI, Parsons SW: Histology of a lengthened human tibia. J Bone Joint Surg 1992; 74B:39-44
54. Brand RA. Fracture Healing. In Evarts CM, (ed). Surgery of Musculosclatal System. Newyork: Chuchill Livingstone, 1983: 65-71
55. Alturfan, A. K., Akalın, Y. (2002). Ortopedik Travmatoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. 10-14
56. Kılıçoğlu, S. S. (2002) Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası; 55(2): 143-150

57. Rowe, N.L., Williams, J. L. (1985) Maxillofacial Injuries. Edinburgh London Melbourne and New York: Churchill Livingstone. 50-52
58. Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998 ;355 Supp:7-21
59. Phillips AM: Overview of the fracture healing cascade. Injury 2005; 365:5-7
60. Cornell CN, Lane JM: Newest factors in fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1992 ;277:297-311
61. Türek, S. L. (1980) Ortopedi İlkeleri ve Uygulamaları. Florida- Miami: Mount Sina Tıp Merkezi ve Miami Kardioloji Enstitüsü; 32-151
62. Weber, B. G., Cech, (1973) O. Pseudoarthrosen. Verlag Hans Huber, Bern.
63. Waisman, B.N. W., Sledge, C. B. (1986) Orthopaedic Radiology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
64. Rockwood & Gren. (1975) Fractures. Lippincot Company, Philadelphia, Toronto; copright, 97-105.
65. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament. Fractures 2nd ed. Philadelphia, Lippincott Co, 1984; 1: 147-167.
66. Skinner HB, Diao E, Gosselin R, Lowenberg DW, Paiment G. Musculoskeletal Trauma Surgery. In Skinner HB, (ed). Current Diagnosis and Treatment in Orthopedics. California: A Simon-Schuster Company, 1995: 51-115
67. Güven, Y. Kıkırdak, Kemik ve Diş Biyokimyası. (1988) İ.Ü. Dişhekimliği Fak. Biyokimya Bilim Dalı Ders Notları.
68. Kabisch, W.T., De Bruyn, P.P., Pabuwal, S. N. (1968) Quantitative characteristics of phagocytic organs. Anat Rec. Jun; 161(2): 197-210.
69. Ham, A. W., Cormack, D. H. (1979) Histophysiology of Cartilage Bone and Joints J.B. Philadelphia and Toronto: Lippincott Company
70. Oral O. L-Dopa'nın (Allojenik greft uygulanan ve uygulanmayan) kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine olan etkilerinin deneysel araştırılması (2000) Doktora tezi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul; 4-22.
71. Gross, D., Williams, W. S (1982) Streaming potential and electromechanical response of physiologically- moist bone. J Biomech; 15: 277-295

72. Robert, B., Bently, G. (1983) Mercer's Orthopaedic Surgery. London, 8th ed. 1983 27-65.
73. Vanable, J. (1989). Integumentary potentials and wound healing. Electric Fields in Vertebrate Repair. R. Borgens. New York, Alan Liss Inc: 171-224
74. Scott, J. H. (1957) The mechanical basis of bone formation. J Bone Joint Surg; 39-B:134.
75. Graham G.F. Cryosurgery. Clin Plast Surg. 1993;20(1);131-47.
76. Baron T, Tran Van P, Vignery A. Local control of bone remodelling: a suggested role for receptor mediated endocytosis. New York, Excerpta Medica 1982; 123-127. 8-6.
77. Isogai Y, Akatsu T, Ishizuya T, Yamaguchi A. et al. Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation positively or negatively depending on the differentiation stages. T Bone Miner Res 1996; 11:, 1384-1393.
78. Yetkin H, Yazıcı M., (ed). Miller'in Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006: 19
79. Ege R. Travmatoloji. Kırıklar, Eklem ve Diğer Yaralanmalar 5. Baskı. Ankara:2003; 55-94.
80. Bassett CAL. et al. Biophysical principles of affecting bone structures. The Biochemistry and Physiology of Bone. G. H. Bourne (Ed.), Acad. Press, Inc. New York. 1971: 1-76.
81. Woll TS, Duwelius PJ: The segmental tibia fracture. Clin Orthop Relat Res. 1992 ;281:204-207
82. Persson BM. Ekelund L, Lovdahl R. Gunterberg B. Favourable results of acrylic cementation for giant cell tumors. Acta Orthop Scand. 1984 Apr; 55(2):209-14
83. Bernard G.W. Healing and repair of osseous defects. Dent Clin North Am.1991; 35: 469-477.
84. Oral O. Laser'in Ağız Cerrahisi Girişimlerinde İyileşme Üzerine Etkilerinin Deneysel Araştırılması, Doktora, 1987.
85. Caplan A.I., Pechak D. The cellular and molecular biology of bone formation. In: Peck W.A.(Ed). Bone and Mineral Research. New York: Elsevier, 1987:117.
86. Jensen JE, Jensen TG, Smith TK, et al: Nutrition in orthopaedic surgery. J Bone Joint Surg 1982; 64A: 1263-72

87. Kutsal Y.G.,(ed). Osteoporoz.2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2005: 46
88. Çankaya B. Kemik. İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. Seminer çalışması. 2004
89. Uzzan B,Campo J,Cucherat M.Effects of Bone Mass Long Term Treatment with Thyroid Hormone. A Meta-Analysis J Clin Endocrinol Metab 1996;81:4278-88
90. Kutsal Y.G.,(ed). Osteoporoz. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2005: 47
91. Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. The Journal of Bone and Joint Surgery 1995; 77-A: 940-955.
92. S.R. Patel, J.H. Hartwig and J.E. Italiano Jr: The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 115, 3348-3354 (2005)
93. O. Morel, F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George and J.M. Freyssinet: Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2594-2604 (2006)
94. A.S. Weyrich, S.M. Prescott and G.A. Zimmerman: Platelets, endothelial cells, inflammatory chemokines, and restenosis. Complex signaling in the vascular playbook. *Circulation* 106, 1433-1435 (2002)
95. P. von Hundelshausen and C. Weber: Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 100, 27-40 (2007)
96. E. Anitua, M. Sanchez, A.T. Nurden, P. Nurden, G. Orive and I. Andia: New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 24, 227-234 (2006)
97. Martin P. Wound healing, aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276: 75–81.
98. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UME. Biology and principles of periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000 2006;41: 30–47.
99. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83: 835–70
100. G.L. Reed: Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 30, 441-450 (2004)
101. O. Morel, F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George and J.M. Freyssinet: Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2594-2604 (2006)

-
102. G. Burnstock: Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 364-373 (2002)
103. A.B. Lansdown: Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen* 2002; 10: 271-85 (2002)
104. M. Lesurtel, R. Graf, B. Aleil, D.J. Walther, Y. Tian, W. Jochum, C. Gachet, M. Bader and P.A. Clavien: Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 312, 104-107 (2006)
105. J.A. Coppinger, R. O'Connor, K. Wynne, M. Flanagan, M. Sullivan, P.B. Maguire, D.J. Fitzgerald and G. Cagney: Moderation of the platelet releasate response by aspirin. *Blood* 109, 4786-4792 (2007)
106. Y. Cheng, S.C. Austin, B. Rocca, B.H. Koller, T.M. Coffman, T. Grossner, J.A. Lawson and G.A. Fitzgerald: Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 296, 474-475 (2002)
107. M. M. Denis, N.D. Tolley, M. Bunting, H. Schwertz, H. Jiang, S. Lindemann, C. Yost, F. J. Rubner, K.H. Albertine, K.J. Swobodo, C.M. Fratto, E. Tolley, L.W. Kraiss, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman and A.S. Weyrich: Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122, 379-391 (2005)
108. S. Lindemann, N.D. Tolley, D.A. Dixon, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, and A.S. Weyrich. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 154, 485-490 (2001)
109. T.R. Kyriakides and P. Bornstein: Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost* 90, 986-992 (2003)
110. N.V. Narizhneva, O.V. Razorenova, E.A. Podrez, J. Chen, U.M. Chandrasekharan, P.E. DiCorleto, E.F. Plow, E.J. Topol and T.V. Byzova: Thrombospondin-1 upregulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB J* 19, 1158-1160 (2005)
111. H.G. Kopp, A.T. Hooper, M.J. Broekman, S.T. Avecilla, I. Petit, M. Luo, T. Milde, C.A. Ramos, F. Zhang, T. Kopp, P. Bornstein, D.K. Jin, A.J. Marcus and S. Rafii: Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization. *J Clin Invest* 116, 3277-3291 (2006)
112. B.J. Rybarczk, S.O. Lawrence and P.J. Simpson-Haidaris: Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood*

-
- 102, 4035-4043 (2003)
113. N. Laurens, P. Koolwijk and M.P. M. De Maat: Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 4, 932-939 (2006)
114. A. Sahni, O.D. Altland and C.W. Francis: FGF-2 but not FGF-1 binds fibrin and supports prolonged endothelial cell growth. *J Thromb Haemost* 1, 1304-1310 (2003)
115. J. Romer, T.H. Bugge, C. Pyke, L.R. Lund, M.J. Flick, J.L. Degen and K. Dano: Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 2, 287-292 (1996)
116. M.C. Bryckaert, M. Lindroth, A. Lonn, G. Tobelem and A. Wasteson: Transforming growth factor (TGFbeta) decreases the proliferation of human bone marrow fibroblasts by inhibiting the platelet-derived growth factor binding. *Exp Cell Res* 179, 311-321 (1988)
117. J. Ma, Q. Wang, T. Fei, J-D.J. Han and Y-G. Chen: MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 109, 987-994 (2007)
118. J. Folkman, T. Browder and J. Palmblad: Angiogenesis research: Guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost* 86, 23-33 (2001)
119. D.K. Skovseth, M.J.T. Veuger, D.R. Sorensen, P.M. De Angelis and G.
120. Haraldsen: Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morphogenesis, and peripheral cell recruitment in vivo. *Blood* 105, 1044-1051 (2005)
121. L. Ma, R. Perini, W. McKnight, M. Dickey, A. Klein, M.D. Hollenberg and J.L. Wallace: Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 216-220 (2005)
122. E.I. Lev, Z. Estrov, K. Aboulfatova, D. Harris, J.F. Granada, C. Alviar, N.S. Kleiman and J.F. Dong: Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost* 96, 498-504 (2006)
123. H.C. De Boer, C. Verseyden, L.H. Ulfman, J.J. Zwaginga, I. Bot, E.A. Biessen, T.J. Rabelink and A.J. van Zonneveld: Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1653-1659 (2006)
124. A-K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger and L. Claesson-Welsh: VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371 (2006)

125. Leitner GC, Gruber R, Neumu" ller J, Wagner A, Kloimstein P, Ho" cker P, et al. Platelet content and growth factor release in platelet rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sanguinis* 2006;91: 135–9.
126. Tsay RC, Vo J, Burke A, Eisig SB, Lu HH, Landesberg R. Differential growth factor retention by platelet rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63: 521–8.
127. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004, 62(4), s. 489–96.
128. Pietrzak WS, Eppley BL,. Platelet rich plasma: Biology and new technology. *J Craniofac Surg.* 2005, 16(6), s. 1043-54.
129. Nurden AT, Nurden P , Sanchez M, Andia S, Anitua E. Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience.* 2008, 13, s. 3525-3548.
130. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants.:. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jul, 14(4), s. 529–35.
131. Whitman, D.H. et al. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1997, 55, s. 1294–1299.
132. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009 Mar, 27(3), s. 158-67.
133. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001, 10(4), s. 225–8.
134. Heiple KG, Goldberg V M, Powell AE, Bos GD, at al: Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1987; 18:179-85
135. ASAE standarts, Shear and Three-point bending test of animal bone. ANSI/ASAE S459 DEC01, USA, 2003
136. Schemitsch EH, Bhandari M: Bone healing and grafting. In Koval KJ(ed). *Orthopaedic knowledge update-7.AAOS,* 2002;19-29
137. Claes L, Willie B: The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.*2006;1-15 Review
138. 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; 84A: 1032-44

139. Hannouche D, Petite H, Sedel L: Current trends in the enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg* 2001;83B:157-64
140. McKibbin B: The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg* 1978;60B: 150-62
141. Solheim E: Current concepts review: Growth factors in bone. *International Orthopaedics*. 1998;22:410-16
142. Busse JW, Bhandari M, Kulkarni AV, Tunks E: The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: A meta-analysis. *Canadian Med. Ass. Jou.*2002; 166(4) :437-41
143. Stevenson S: Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 ;355Supp:239-46
144. Enneking WE, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G: Physical and biological aspects of repair in dog cortical bone transplants. *J Bone Joint Surg* 1975;57A:237-52
145. Eckardt H, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, et al: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of nonunion. *Injury*. 2005;36:489-94
146. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, et al: Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg* 2001;83ASupp(1):151-58
147. Bostrom MPG, Asnis P: Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 ;355Supp: 124-31
148. Schmidmaier G, Wildeman B, Ostapowicz D, Kandziora F, et al: Long term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β) treatment on fracture healing: A safety study for using growth factors. *J Orthop Res*. 2004;22:504-19
149. Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, Poser JW: Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*.1998 ;355Supp:283-93
- 150.** Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox CW: Novel formulation of fibroblast growth factor-2 and hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res*. 1999;17:607-14

151. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT: The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop Relat Res.*1991 -264:295-301
152. Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Lijima T, et al: Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.*2003;41:173-78
153. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, et al: Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg* 2005;87B: 1434-38
154. Glowacki J: Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 ;355Supp:82-9
155. Cui GLY, McILmurray L, Allen WE, Wang H: rhBMP-2, rhVEGF165, rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res.* 2005 ;23:680-85
156. Jackson RA, McDonald MM, Nurcombe V, Little DG. Cool SM: The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model. *J Orthop Res.* 2006;Apr:636-44
157. Zimmermann G, Henle P, Küsswetter M, Moghaddam A, et al: TGF- β 1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone.*2005;36:779-85
158. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.*1998;355Supp:56-65
159. Kirker CA, Gerhart TN, Armstrong N, Schelling SH, et al: Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop Relat Res.*1998 ;349:205-17
160. Kaygusuz MA, Ataşlı N, Aydogdu İ, Özen S, et al: GM-CSF'nin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin sıçan tibiaları üzerinde araştırılması. *Acta Orthop Traumatol Turc.*1999;33:205-10
161. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, et al: A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair.*J Bone Joint Surg* 2003;85A: 1425-35
162. Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, Günal İ, et al:Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.*1995;66(5):473-75

163. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, et al: The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic and histomorphometric parameters in rats. *J. Orthop. Res* 1991; 9: 383-390
164. Hak DJ, Stewart RL, Hazelwood SJ: Effect of low molecular weight heparin on fracture healing in a stabilized rat femur fracture model. *Orthop Res.* 2006; Apr:645-52
165. Muratlı HH, Tabak AY, Korkusuz P, Örs Ü. et al: Endotelin antagonisti bosentanın kırık iyileşmesi üzerindeki etkisinin kobay modelinde incelenmesi. *İnsizyon* 1999;2(3): 171-80
166. Mikel Sanchez, Eduardo Anitua, Ramon Cugat, Juan Azofra, Jorge Guadilla, Roberto Seijas, and Isabel Andia: Nonunions Treated With Autologous Preparation Rich in Growth Factors. *J Orthop Trauma* 2009
167. Eduardo Anitua, Gorka Orive, Rafael Pla, Pedro Roman, Victoriano Serrano, Isabel Andia: The effects of PRGF on bone regeneration and on titanium implant osseointegration in goats: A histologic and histomorphometric study. *Wiley InterScience* 2008
168. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol.* 2008 Sep-Oct
169. Geng Z, Wang C, Zhou H Effect of platelet-rich plasma on tendon healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2011 Mar
170. Liu J, Yuan T, Zhang C. Effect of platelet-rich plasma on synovitis of rabbit knee. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2011 Mar
171. Saad Setta H, Elshahat A, Elsherbiny K, Massoud K, Safe I. Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. *Int Wound J.* 2011 Apr

10. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında büyük emeği olan S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji AD Öğretim Üyesi, proje danışmanım Doç.Dr. Nazım Karalezli'ye çok teşekkür ederim. Ayrıca tez danışmanım Yrd.Doç.Dr. Burkay K Kaçıra ve Anabilimdalı Başkanımız Prof.Dr. Mustafa Yel'e saygılarımla teşekkürü borç bilirim.

Yetişmemizde büyük emekleri bulunan Prof.Dr. Recep Memik, Prof Dr. Uğur Yensel, Prof.Dr. M.i.Safa Kapıcıoğlu, Prof.Dr. Mehmet Arazi, Prof.Dr. Tunç C Öğün, Prof.Dr. İbrahim Tuncay, Doç.Dr. H Mustafa Özdemir, Doç.Dr. Hakan Şenaran, Doç.Dr. Serdar Toker ve Yrd.Doç.Dr. Onur Bilge'ye ve sonradan aramıza katılan Prof.Dr. Orhan Büyükbebeci'ye teşekkür ederim.

Çocukluğumdan beri maddi manevi desteklerini hep arkamda hissettiğim muhterem anne ve babam Hayriye-Şaban Güzel ve ağabeyim yerine geçen Murat Alıcı'ya şükran ve saygılarımı sunarım.

Bu zorlu süreçte bana destek olup moral veren sevgili eşim Sıdika Güzel'e ve tez yazma aşamasında her fırsatta yanımda olan, beni çok mutlu eden ve işimi zorlaştıran oğlum Murat Enes'e sevgilerimi sunuyorum...