

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ ve TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI
GÖLKÖY/BOLU

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN
RATLARDA SELENYUM'UN KIRIK İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN RADYOLOJİK,
HİSTOPATOLOJİK VE BİYOMEKANİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. SERDAR İPEK

BOLU 2012

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ ve TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI
GÖLKÖY/BOLU

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN
RATLARDA SELENYUM'UN KIRIK İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN RADYOLOJİK,
HİSTOPATOLOJİK VE BİYOMEKANİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. SERDAR İPEK

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. KUTAY ENGİN ÖZTURAN

BOLU 2012

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile yetişmemde büyük emek sahibi kıymetli hocalarıma; eğitimim boyunca çok şey öğrendiğim, çalışmaktan hiç bıkmayan tez hazırlama aşamasında ilgi, bilgi ve yardımlarını her an yanımda hissettiğim sayın Doç Dr Kutay Engin ÖZTURAN'a, eğitimimin ilk gününden itibaren hayat boyunca kullanacağım her konuda tecrübe ve bilgisini bizimle paylaşan, eğitimimde büyük emeği olan sayın Yrd Doç Dr Hüsamettin ÇAKICI'ya, eğitimimin son yılında farklı bilgi ve becerilerinden faydalandığım sayın Yrd Doç Dr Cengiz Işık'a, uzmanlık eğitimimin son döneminde çalışma fırsatı bulduğum ve tecrübelerinden faydalandığım sayın Prof Dr Fuat AKPINAR'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, kardeş kadar yakın gördüğüm asistan arkadaşlarım Dr Sadullah KARA, Dr Murat Toygar GÜLER, Dr Recai ÖZKILIÇ, Dr Yasin Emre KAYA ve Dr Tolgahan KURU' ya teşekkür ederim.

Çalışma hayatımızın zorluklarını yardımları ile kolaylaştıran servis, poliklinik ve ameliyathane hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde çok büyük pay sahibi olan ve bana güvenmekten hiç vazgeçmeyen anne ve babama teşekkürlerimi sunarım.

Meslek hayatımın bütün zorluklarına benimle birlikte katlanan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşime ve varlığıyla hayatımıza hem mutluluk hem anlam katan sevgili oğluma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
KISALTMALAR.....	III
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
RESİM LİSTESİ	VII
GRAFİK LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
SUMMARY	XI
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER:	3
GEREÇ VE YÖNTEM	39
BULGULAR	47
TARTIŞMA	56
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR.....	65

KISALTMALAR

DM.....	Diyabetes Mellitus
GSH-Px.....	Glutasyon Peroksidaz
CAT.....	Katalaz
IGF-I.....	İnsulin Like Growth Factor-I
cAMP.....	Siklik Adenin Mono Fosfat
Se.....	Selenyum
ALP.....	Alkalen Fosfataz
Cox-2.....	Siklooksijenaz-2
RANK.....	Reseptör Aktivator Nükleer Kappa B
RANKL.....	Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand
Ca.....	Kalsiyum
IL.....	İnterlökin
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
PDGF.....	Platelet Delivered Growth Factor
FDGF.....	Fibroblast Delivered Growth Factor
EGF.....	Epidermal Delivered Growth Factor
CDGF	Condrolast Delivered Growth Factor
MDGF.....	Macrophage Delivered Growth Factor
ECDGF	Endotelial Cell Delivered Growth Factor
PGE-1.....	Prostaglandin E-1
PGE-2.....	Prostaglandin E-2
PGI-2.....	Prostasiklin
BMP.....	Bone Morphogenic Protein
SOR.....	Serbest Oksijen Radikalleri

O_2^-	Süperoksit
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
OH^-	Hidroksil
MDA	Malondialdehit
Fe	Demir
Cu	Bakır
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
PLGSH-Px	Fosfolipid hidroperoksit glutatyon Peroksidaz
GST	Glutatyon S-transferaz
GSSG-R	Glutatyon redüktaz
GLUT-1	Glikoz Transporter-1
GLUT-2	Glikoz Transporter-2
N	Newton
kN	kilo Newton

TABLO LiSTESi

1. **Tablo-1** : Kemik oluşum tipleri
2. **Tablo-2** : Tespit yöntemlerine göre kırık iyileşmesi çeşitleri
3. **Tablo 3** : Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi
4. **Tablo 4** : Üçüncü Hafta radyoloji sonuçları
5. **Tablo 5** : Üçüncü hafta radyografi yüzde ve frekanslar
6. **Tablo 6** : Altıncı Hafta radyoloji sonuçları
7. **Tablo 7** : Altıncı hafta radyografi frekans ve yüzdeler
8. **Tablo 8** : Histopatoloji sonuçları
9. **Tablo 9** : Biyomekanik test sonuçları (Newton)

ŞEKİL LİSTESİ

1. **Şekil 1** : Matür kemik dokusu
2. **Şekil 2** : Matür ve immatür (woven) kemiğin mikroskopik görüntüsü
3. **Şekil 3** : Volkman kanalları (siyah okla gösterilen) ve Haversian sistem (beyaz oklarla gösterilen).
4. **Şekil 4** : Kemiğin kanlanması şematik görünümü
5. **Şekil 5** : Kemiğin kan dolaşımı
6. **Şekil 6** : Osteoklast hücresi (adezyon, hücre farklılaşması, sekresyon ve elektronmikroskopik görüntüleri)
7. **Şekil 7** : Osteoblastların RANKL salgılaması ve osteoklast aktivasyonu
8. **Şekil 8** : Kemiğin hücresel elemanları
9. **Şekil 9** : Enkondral kemikleşme
10. **Şekil 10** : İntramembranöz kemikleşme
11. **Şekil 11** : Kırık iyileşme evrelerinin şematik görünümü
12. **Şekil 12** : Kırık iyileşme evreleri

RESİM LİSTESİ

1. **Resim 1** : Tibia anteromedialindeki cilt insizyonu
2. **Resim 2** : Yumuşak dokulardan sıyrılmış tibia
3. **Resim 3** : Tibia diafizinde yapılan osteotomi
4. **Resim 4** : K telinin intramedüller olarak gönderilmesi
5. **Resim 5** : İntramedüller gönderilen K telinin distal fragmana ilerletilmesi
6. **Resim 6** : Redüksiyon sonrası görüntü
7. **Resim 7** : Cilt kapatıldıktan sonra görüntüsü
8. **Resim 8** : Cerrahi işlem sonrası direk grafi görüntüleri
9. **Resim 9** : Zwick/Roell Z020 marka biyomekanik test cihazı
10. **Resim 10** : Biyomekanik cihazının üç nokta bükme testi yapan parçası
11. **Resim 11** : Grup I 3. hafta grafisi
12. **Resim 12** : Grup II 3. hafta grafisi
13. **Resim 13** : Grup III 3. hafta grafisi
14. **Resim 14** : Grup I 6. hafta grafisi
15. **Resim 15** : Grup II 6. hafta grafisi
16. **Resim 16** : Grup III 6. hafta grafisi
17. **Resim 17** : Altıncı hafta Grup I kırık hattından geçen histopatolojik kesit (x40 HE)
18. **Resim 18** : Altıncı hafta Grup II kırık hattından geçen histopatoloji kesiti(X40 HE)
19. **Resim 19** : Grup II’de artmış inflamasyon dokusu (x40 HE)
20. **Resim 20** : Altıncı hafta Grup III kırık hattından geçen histopatolojik kesit (x40 HE)

GRAFiK LiSTESi

1. **Grafik 1** : Grup I (K), Grup II (D) ve Grup III (S)'ün ortalama kırılma noktaları
2. **Grafik 2** : Grup I gerim/gerinim grafiği
3. **Grafik 3** : Grup II gerim/gerinim grafiği
4. **Grafik 4** : Grup III gerim/gerinim grafiği

ÖZET

Kemik kırıkları; klinikte sık karşılaştığımız yaralanmalardan biri olup bu kırıkların yaklaşık %10 kadarlık bir bölümü kaynama sorunları nedeniyle cerrahi müdahale gerektirmektedir. Çok uzun zamanlardır kullanılan kırık tedavi yöntemlerinin (alçılı tespit, traksiyon vb.) yanı sıra, gerek kırık iyileşmesinin biyolojisinin gerekse de biyolojik faktörler ve matriks komponentlerinin iyileşme üzerine etkilerinin anlaşılır hale gelmesiyle, iyileşme süresini kısaltmak ve kaynama oranlarını en üst düzeye çıkarmak için kırık tedavisinde bir takım yenilikler gündeme gelmiştir. Öte yandan kırık iyileşmesini etkileyen bir çok faktör vardır. Yaptığımız bu çalışmada kronik ve sistemik bir hastalık olan ve kırık iyileşmesine olumsuz etkilerinin olduğu bilinen diyabetin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ve selenyumun diyabetin kemikte oluşturduğu bu etkilere karşı kullanılabilir olup olmadığını araştırdık.

Hayvan deneyleri etik kurulu onayını aldıktan sonra ağırlıkları 250-300 gr arası 3 aylık 36 adet Wistar cinsi rat'ın sol tibiası çalışmaya alındı. Denekler kontrol grubu (grup 1), sadece diyabet oluşturulan (diyabet grubu-grup 2) ve diyabet oluşturulduktan sonra selenyum verilen (diyabet + selenyum grubu-grup 3) olarak 3 gruba ayrıldı. Grup 2 ve grup 3'teki deneklere 60mg/kg STZ intraperitoneal uygulanarak deneysel diyabet oluşturuldu ve kan glikoz düzeyleri 250mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edilerek çalışmaya alındı. 1 hafta sonra her üç gruba da sol tibialarına açık osteotomi yapıldıktan sonra intrameduller K teli ile tespit edildi. Grup 3'e 6 hafta boyunca 10mg/kg/gün intraperitoneal sodyum selenit enjeksiyonu yapıldı.

Her üç grubun da 0. gün, 3. ve 6. hafta sonunda radyografileri çekildi. 6. Hafta sonunda kurban edilen deneklerin sol tibiaları çıkartılarak yumuşak dokulardan temizlendi. Her 3 grubun yarısı histopatoloji diğer yarısı da biyomekanik değerlendirmeye alındı. Sonuçlar Chi-Square test, Cramer's V test ve ANOVA kullanılarak yapıldı. $P<0.05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Her üç grubun sonuçları değerlendirildiğinde 3. hafta ve 6. hafta sonunda radyografik olarak diyabet grubunda (grup 2) iyileşmenin diğer gruplardan daha kötü olduğu istatistiksel olarak gösterilmiş ($p=0,014$), kontrol grubu (grup 1) ile selenyum grubu (grup 3) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Her üç grupta da 3. hafta ve 6. hafta radyolojik sonuçları değerlendirildiğinde 6. haftada iyileşmenin daha iyi olduğu görülmüştür. Altıncı hafta sonunda histopatolojik sonuçlar değerlendirildiğinde her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu ($p=0,001$) kontrol grubunda (grup 1) en iyi sonuç olduğu, selenyum uygulanan grupta (grup 3) diyabet grubuna (grup 2) göre kırık iyileşmesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde iyi olduğu

bulunmuştur. Biyomekanik sonuçlara bakıldığında benzer şekilde diyabet grubunda en kötü sonuçlar elde edildiği istatistiksel olarak gösterilmiş olup ($p=0,015$) kontrol ve selenyum grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p= 0,137$).

Sonuç olarak; çalışmamız selenyumun diyabet varlığında kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini ve iyileşme süresince diyabetin kemik dokusu ve kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini azalttığını göstermiş ve klinikte kullanımı açısından yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz.

SUMMARY

Bone fractures are common injuries that we encounter at clinics and 10 % of these injuries require surgery. Addition to a long time experience about fracture treatment methods (casting, traction), fracture healing biology, biologic factors and matrix components on fracture healing are searched, and to shorten the time of healing and to increase the rates of healing, some innovations are appeared. On the other side there are lots of factors that affect fracture healing. Diyabetes mellitus is a chronic and sistemic disease known as unfavourable on fracture healing. The purpose of this study is to show the positive effects of the selenium to the fracture healing at the diyabetic environment.

After ethic council approval for the experimental study left tibias of 250 – 300 gr weight, 3 months old 36 Wistar rats was taken to our study. Animals were divided into three groups; first one was control (group 1), second was diyabetic (diyabetic group – group 2) and the third was diyabetic rats which was treated by selenium (diyabetes + selenium group – group 3). 60 mg/kg STZ injected intraperitoneally per rat at group 2 and group 3. Rats with blood glucose levels above 250 mg/dl accepted diyabetic and used in the study. One week later we performed osteotomy to the left tibiae of the rats at all groups and fixed by intramedullary kirshner wire method. 10mg/kg/day sodium selenite was administered intraperitoneally for 6 weeks.

Radiographs of the left tibiae at all groups were obtained were at 0. day, 3. and 6. weeks. At the end of the 6. week left tibiae of sacrificed rats were excised and soft tissues were removed. Biomechanical analysis was performed to the half of the rats from each group and the other half were examined histopathologically. Chi-Square , Cramer's V and ANOVA tests were used to evaluate the results.

Statistical results showed that, radiological healing in diyabetic group (group 2) was worse than the other groups at the end of 3. and 6. weeks. In all three groups, radiological healing results were better at 6. week then 3. week. At the end of the 6. week according to the histopathological results there was a statistically significant difference between three groups. The control group had the best results. According to statistical results of healing, group 3 (diyabetes + selenium) was significantly better then group 2 (only diyabetes). According to

the biomechanical tests, diabetes group had the worst result but there was no statistically significant difference between control and selenium groups.

In this study we exhibit that selenium enhances fracture healing at diabetic environment and reduce the effects of diabetes mellitus on bone and its healing biology. In conclusion our study can light the way for the other studies about clinical usage of selenium.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik kırıkları, ortopedi ve travmatoloji pratiğinde yaşlı ve genç tüm popülasyonda sık karşılaşılan bir durumdur. Kırık sadece kemiğin değil, çevre yumusak dokuların da değişik oranlarda hasar gördüğü bir olaydır. Kırık iyileşmesi, kompleks bir takım hücresel ve biyokimyasal süreçler sonunda gerçekleşir. Bu süreçler birçok faktör tarafından uyarılarak kırık iyileşmesi olumlu ya da olumsuz yönde etkilenebilir. Gerek cerrahi gerekse konservatif tedaviden sonra kırık iyileşmesi skar dokusu kalmadan orjinaline en yakın anatomik ve fonksiyonel özelliklerde olmaktadır. Tüm bu tedavi yöntemlerine rağmen kırıkların yaklaşık onda birlik kısmında kaynama ile ilgili sorunlar görülmektedir. Morbidite artışı, işgücü kaybı ve yüksek tedavi maliyetleri nedeniyle; kırık iyileşmesinin hızlandırılması ve kaynama oranının en üst düzeye çıkarılması için uygulanabilecek değişik tedavi yöntemleri araştırılmış ve bir kısmı kullanıma girmiştir. Kırık iyileşmesinin hücresel ve moleküler biyolojisinin açıklığa kavuşturulması ile beraber bu süreçlerde etkili birçok biyolojik büyüme faktörünün varlığı da ortaya konmuş ve çeşitli çalışmalarla kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri gösterilmiştir.

Sistemik bir hastalık olan diyabetin yapılan çalışmalarda kemik dokusu ve kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir ve bu etkileri özellikle hücre proliferasyonu ve kollajen sentezini azaltarak ortaya çıkarmaktadır. Deneysel diyabet oluşturarak yüksek kan şekeri elde edilen hayvan modellerinde insülinin kırık iyileşmesinin erken döneminde kritik bir etkiye sahip olduğu, encondral ossifikasyonda bozulma ve kallusta azalma olduğu gösterilmiştir (1). Yapılan retrospektif çalışmalarda elektif artrodez yapılan DM'lu hastalarda geç kaynama, kaynamama ve psödoartroz oranının arttığı görülmüştür (2).

Selenyum (Se) esas olarak antioksidan özelliğe sahip bir element olup bu özelliği serum ve karaciğer dokusunda GSH-Px aktivitesinde artış, lipid peroksidasyonunda azalma ile gösterir (3). Kemik iliği kök hücrelerine selenyum uygulandıktan sonra antioksidatif kapasitelerinin arttığı gösterilmiştir (4).

Se eksikliğinde görülen Kashin-Beck hastalığında irregüler kemik formasyonu, düşük mekanik kuvvette kemikler, kemik mineral dansitesinde değişim, kıkırdakta fibrozis ve diz eklemi subkondral ossifikasyonda bozulma olur (5,6).

Se eksikliği oluşturulan ratlarda plazma IGF-1 konsantrasyonu, protein ve albumin değerleri düşük, trabeküler kemik yapısı kötü ve kemik hacmi de

azalmıştır (7). Se'un IGF-1 benzeri etki ortaya çıkardığı gösterilmiştir (8). Bu etkiyi glikoz transportunu artırarak, cAMP protein fosforilasyonunu artırarak gösterir (9).

Tüm bu bilgiler ışığında biz ortopedistler için önemli bir sorun olan diyabetik hastalardaki kırık kaynamasının, daha kırık oluştuğunda başlayan inflamatuvar dönem ve ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin bir antioksidan olan Se ile ortamdan uzaklaştırılmasının kırık kaynaması üzerine olumlu etkileri olacaktır. Se eksikliğinde görülen Kashin-Beck hastalığında ortaya çıkan irregüler kemik formasyonu, kemik mineral dansitesinde değişiklikler, Se'un kemik oluşumu ve yapısında etkilerinin olduğunu göstermekte ve kırık kaynaması için gerekli olan yeni kemik oluşumu ve formasyonu sırasında olumlu etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. DM'ta esas patoloji olan insülin eksikliğinin sadece glikoz metabolizması değil aynı zamanda insülin etkisi ve dolayısıyla IGF-I azalacağından kemik büyümesi, kemik metabolizması ve oluşumunu da olumsuz etkilemektedir. IGF-I benzeri etki oluşturduğu gösterilmiş olan Se'un bu hastalarda kullanılması kırık kaynamasına olumlu etkileri olacağı ve bu süreci hızlandıracağını düşündürmektedir.

Bu çalışmada selenyumunu seçmemizin amacı; kırık oluşumu ile ortaya çıkan, diyabet varlığında daha da artan zararlı serbest oksijen radikallerine karşı antioksidan etki ile kemik üzerine direkt etkilerinin bulunması ve diyabetiklerde azalmış olan IGF-I benzeri etki ortaya çıkarmasıdır. Böylelikle birden çok mekanizma ile etki elde etmeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER:

2.1.Kemik Dokusunun Yapısı ve Histolojisi:

Kemik dokusu, son derece iyi organize olmuş, canlı, oldukça iyi kanlanma ve innervasyona sahip, heterojen, dinamik, mineralize bir bağ dokusudur. Yaşamsal organlara destek ve koruma sağlar. Kemik, üzerine yapışan kasların düzenli kontraksiyonu ile vücudun hareket etmesini sağlar. Organik ve inorganik komponentlerin oluşturduğu matriks içine yerleşmiş hücrelerden oluşan yoğun kompozit bir yapıya sahiptir. Vücutta sağlam bir destek dokusu olmasının yanında aynı zamanda mineral dengesinin düzenleyicisi ve kan hücreleri rezervuarı olarak da görev alır (10,11,12,13).

Kemik mikroskopik olarak 2 tipe ayrılır:

1. İmmatür (Woven) kemik
2. Matür (lameller) kemik

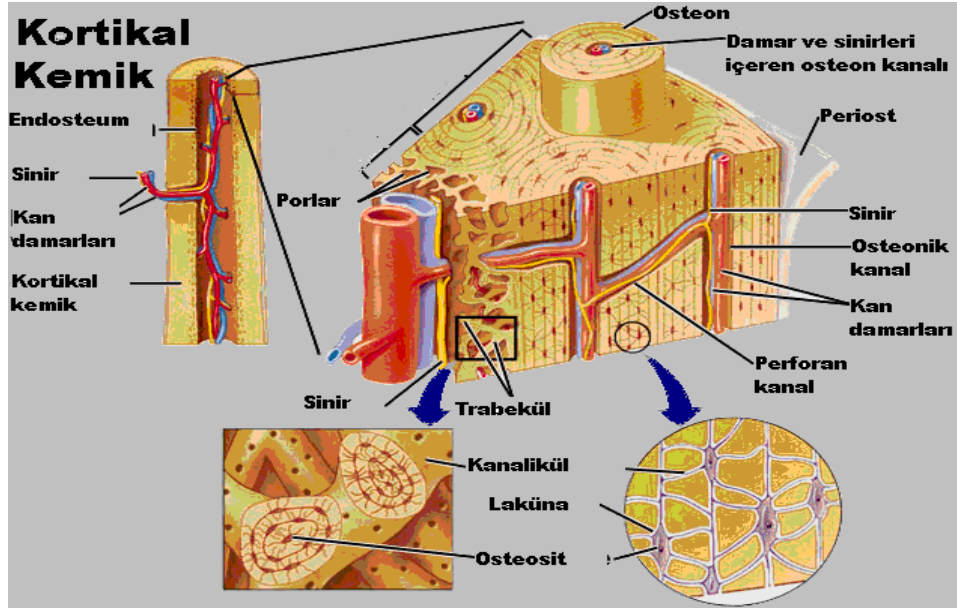
İmmatür kemik, primitif kemiktir. Embriyoda, yeni doğanda, kırık kaynama dokusunda ve büyüme sürecinde kemiğin metafizer bölgesinde bulunur. Bu durumların dışında kemikte normalde bulunmayan tümör dokusunda, Osteogenezis İmperfekta ve Paget Hastalığı gibi patolojilerde de görülebilir. İmmatür kemikte kollajen lifleri düzensiz yerleşmiştir. Lameller kemiğe göre aynı hacimde daha fazla hücre içerir. Mineral içeriği değişkendir.

Lameller kemik doğumdan bir ay sonra oluşmaya başlar. Bir yaş civarı aktif olarak immatür kemiğin yerini alır. Yaklaşık dört yaşında tüm normal kemikler lameller kemik yapısındadır. Wolff Kanunu'na göre kemik mekanik yüklenmeye göre remodele olur. Mekanik yüklenmenin artırılması belirgin kemik kazanımına neden olur. Mekanik yüklenmenin ortadan kalkması kemik yıkımına neden olur ve bu durum mobilizasyona başlanması ile değişen oranlarda geri dönüşümlüdür. Strese bağlı olarak yüksek oranda organize olmuş kollajen, lameller kemiğe anizotrop özellik kazandırır. Mekanik cevabı, etki eden güce ve yöne göre farklılık göstererek şekillenir.(12,14,15)

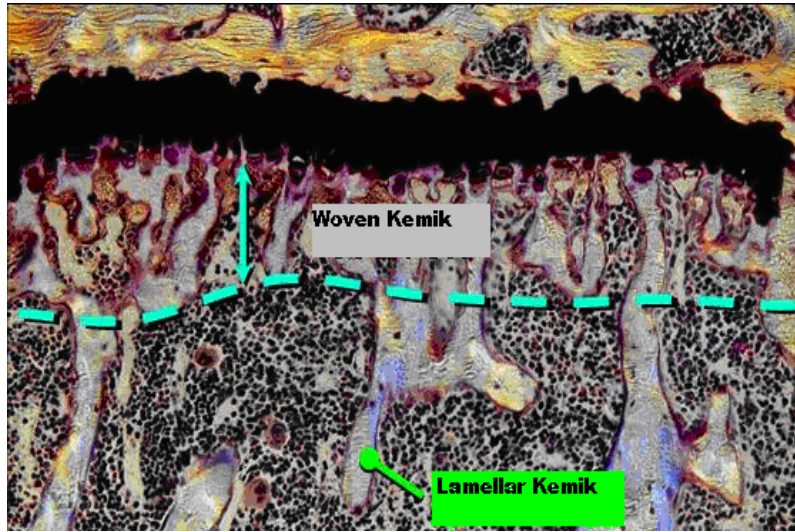
Lameller kemik yapısal olarak iki bölümden oluşur:

1.Kortikal kemik: Matür iskeletin %80'ini kortikal kemik oluşturur. Eklem yüzeyleri dışında uzun kemiklerde örtü gibi bulunur ve uzun kemik cisimlerini oluşturur. Kortikal kemik bükülme, dönme ve kompresif güçlere maruz kalır. Kortikal kemiğin ana yapısal ünitesi osteondur. Osteonlar kemik boyunca uzanmasına yerleşmiş dallanan ve anastomozlaşan silindirler şeklindedir. Osteonların merkezinde kan damarları, lenfatikler ve sinirleri içeren havers kanalları bulunur. Havers kanallarının çevresinde, içlerinde radial dizilimli

osteositleri barındıran lakunalar bulunur. Lakunaların birbirleriyle ve Havers kanallarıyla olan bağlantılarını ise kanaliküller sağlar.



Şekil 1: Matür kemik dokusu

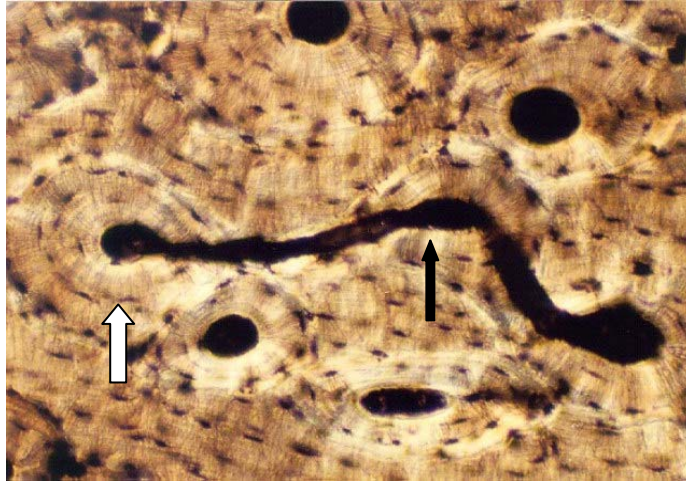


Şekil 2: Matür ve immatür (woven) kemiğin mikroskopik görüntüsü (x200)

Mineralize kemik matriksinden besin maddelerinin difüzyonu sınırlı olduğundan metabolik gereksinimleri ve kalsiyum dengesindeki rolleri için osteositler lakunalara ve kanaliküllere bağımlıdır. Osteonların kemik eksenine uzunlamasına yerleşmiş olmaları, diafizeal korteksin uzun eksenine paralel gelen gerilme ve kompresyon kuvvetlerine neden dayanaklı olduğunu açıklamaktadır. Her osteonun çevresinde osteonların dış sınırını oluşturan ince bir organik matriks tabakası bulunmaktadır. Bu ince tabakaya sement hattı denir. Bu tabaka rezorbsiyonun sonlanıp kemik yapımının başladığı sınırdır. Periost

altından başlayarak kompakt dokuyu enlemesine geçen diğ er bir kanal yapısı da Volkman kanallarıdır.(12,14)

2.Spongioz (trabeküler) kemik: Kortikal kemikle karşılaştırıldığında yoğunluğu daha azdır ve stres çizgilerine bağlı olarak daha fazla remodelasyon gösterir. Birim hacime düşen yüzey alanı kortikal kemikten yirmi kat daha fazladır. Kortikal kemikte hücreler kemik matriksi ile çevrelenmiş durumda iken, spongioz kemikteki hücreler trabeküllerin yüzeyinde yerleşmiş durumdadır (12).



şekil 3: Volkman kanalları (siyah okla gösterilen) ve Haversian sistem (beyaz oklarla gösterilen).

Periost :

Eklem yüzeyleri, sesamoid kemikler ve ligaman insersiyoları hariç kemiklerin dış yüzeyini örten osteojenik bağ doku yapısına periost denir.

Periost iki tabakadan oluşur :

- 1.Dış tabaka (Fibröz tabaka)
- 2.   tabaka (kambiyum veya osteojenik tabaka)

Dış tabaka fibroblast, kollajen ve elastinden zengin yoğun fibröz bir tabakadır. Periostun kemik matriksi ile olan bağlantısı kollajen liflerden oluşmuş Sharpey lifleri ile sağlanır. Periostun kemiğe bakan    yüzü mikrovasküler açıdan ve hücre sayısı bakımından daha zengindir. Kambium da denilen    tabakada osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, fibroblastlar, sempatik sinirler bulunur (16-17).

Periostal hücreler kemik çapının arttırılmasında matriks sentezleyerek, kırık iyileşmesinde ise hyalin kıkırdak sentezleyerek ekstraosseöz kallus oluştururlar. Periostun kalınlığı ve hücre sayısı çocuklukta fazla iken, yaş ilerledikçe azalır (12).

Endosteum:

Kemiğin içindeki boşlukları kaplayan tek katlı yassı kemik öncül hücreler ve az miktarda bağ dokusundan oluşur. Kemik tamiri ve büyümesinde periosteum ile beraber görev alır.

2.2. Kemik dokusunun kanlanması:

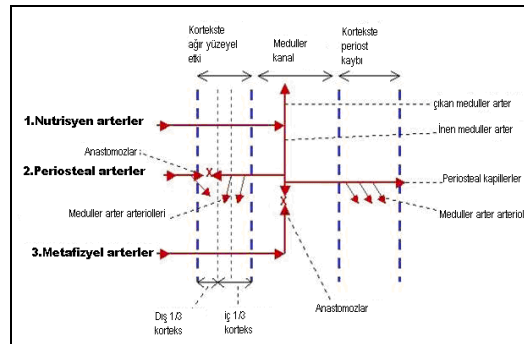
Bir organ olarak kemikler kardiyak çıkışın %5-10' unu alır. Uzun kemikler 3 kaynaktan beslenmektedir:

1. Besleyici arter sistemi (Nutrisyen arterler) : Besleyici arterler ana sistemik arterlerden dallanırlar. Diafizel kortekse nutrisyen forameninden girer ve medullar kanalda inen ve çıkan dallarını verir. Bu damarlar endosteal kortekste arteriollere dallanırlar ve haversian sistemi içindeki damarlar aracılığıyla matür diafizel korteksin iç yüzünün en az üçte ikisini beslerler. Besleyici arter sistemi yüksek basınçlıdır.

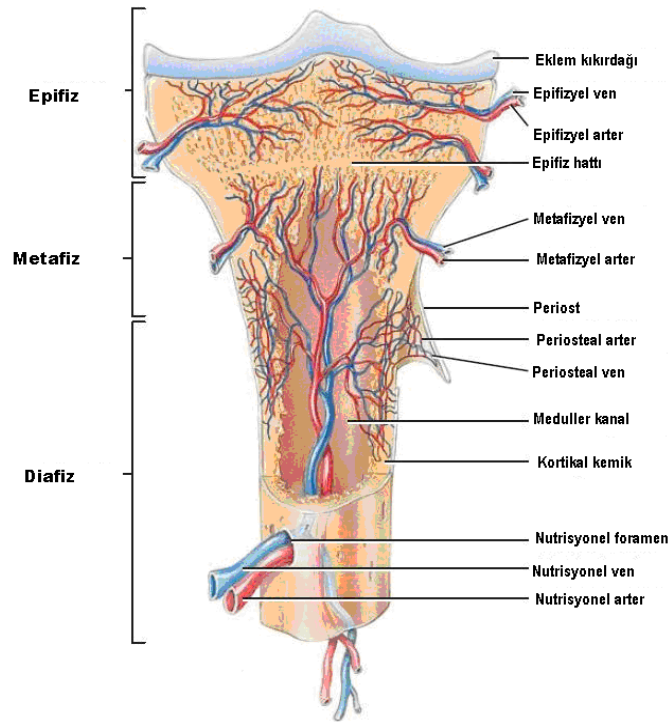
2. Metafizyo-epifizel sistem : Periartiküler vasküler pleksuslardan doğarlar.

3. Periosteal sistem : Diafizel korteksin 1/3 dış kısmını besleyen kapillerlerden oluşur. Bu sistem düşük basınçlıdır.

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 kırıkta basınç gradienti tersine döner. Periosteal sistem basıncı baskın hale gelir ve kan akımı sentripedal hal alır (dıştan içe doğrudur). Gelişmekte olan immatür kemikte arteryel akım sentripedaldır. Çünkü periost yüksek oranda vaskülarizedir ve kemik kan akımının baskın bileşenidir. Matür kemikte venöz akım sentripedaldır. Kortikal kapillerler daha sonra boşaltıcı venöz sisteme drene olan venöz sinuzoidlere drene olurlar (18-19).



Şekil 4: Kemiğin kanlanmasının şematik görünümü



Şekil 5 : Kemiğin kan dolaşımı

2.3. Kemik Dokusunun Hücresel Elemanları :

2.3.1 Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler; Haversiyen kanalları, periosteum ve endosteumun yüzeyini kaplayan mezenkimal kökenli, fuziform şekilli hücrelerdir. Fibroblastlara benzerler. Uzun çekirdekleri ve asidofilik sitoplazmaları vardır. Osteoblastların inaktif prekürsörleridir. Kırık iyileşmesi ve kemik büyümesi dönemlerinde aktive osteoblastlara dönüşürler (20).

2.3.2 Osteoblastlar

Osteoblastlar mezenkimal kök hücre ve perisitlerden köken alır. Aktif osteoblastlar; oval şekilli, bazofilik sitoplazma içinde eksantrik yerleşimli nukleus ve golgi cisimciği içeren, büyük granüllü endoplazmik retiküluma sahip hücrelerdir. Kemik yüzeyinde birbirleriyle sıkı bağlantılı şekilde yerleşirler. Transmembran proteinler ve integrinler, osteoblastların osteositlerle ve ekstrasellüler matriks ile iletişimini sağlarlar (12,14,21).

Osteoblastların görevleri;

1. Kemik dokusunda kollajen (tip I kollajen) ve kollajen olmayan proteinleri (osteokalsin, osteopontin, kemik siyaloproteini) sentezler

2. Ekstrasellüler matriks fibrillerinin düzenini sağlar
3. ALP sentezi ile mineralizasyona katkıda bulunur
4. Osteoklast aktivasyonu ile rezorbsiyona ve kemik döngüsüne katkıda bulunur
5. Kemik uyarıcı aktiviteleri ile kemik morfojenik protein ailesinin üyeleri olan büyüme faktörlerini üretirler (21).

Aktif osteoblastlar; kemik yüzeyinde kalarak sentez aktivasyonunu azaltıp yassı şekilli bone-lining hücreleri (yüzey kaplayan hücreleri) halini alabilir, etraflarını matriks ile çevreleyerek osteosit halini alabilir ya da apoptozise uğrayarak kemik yapım sahasından kaybolabilir (12,21). Daha iyi farklılaşmış, metabolik olarak aktif hücreler kemik yüzeyini kaplarken istirahat halindeki alanlarda daha az aktif hücreler kemiğin iyonik ortamını devam ettirir (22).

Osteoblastlar parathormona (PTH) cevap vererek ALP, tip I kollajen ve osteokalsin üretirler. Osteoblastların PTH, 1-25 dihidroksivitamin D, glukokortikoidler, prostaglandinler ve östrojen için reseptör-efektör etkileşimleri vardır (22). Core binding factor alfa-1 (cbf alfa-1/ Runx2) osteoblast diferansiasyonunda görevlidir.

Bone-lining hücreleri uzamış ve yassı şekilli, içi nükleus ve az miktarda organel içeren hücreler olup endosteal yüzeyde yer alırlar(21). Bu hücreler, istirahatteki osteoblastlar veya yüzey osteositleri olarak da adlandırılır(12). Osteoblastik belirteçler olarak bilinen sialoprotein, osteopontin, osteonektin ve ALP açığa çıkarılırlar (21). Parathormon etkisiyle bu hücreler kemik yüzeyini osteoklastların yapışması için uygun ortam haline getirerek kemik rezorbsiyonunun başlangıcına aracılık ederler(12,14).

2.3.3. Osteositler

Matür iskeletteki hücrelerin %90'ını oluştururlar. Korunmasına yardım ettikleri yeni oluşmuş matriks içinde sıkışmış olan eski osteoblastlardır. Yapı olarak osteoblastlara göre daha yassı ve elipsoiddirler ve çekirdek yapıları daha yoğundur. Laküna denen lameller arasındaki küçük boşlukları işgal eden gövdeleri ile oldukça fazla dallanmış hücrelerdir. Kanalikül denen küçük kanallar lameller boyunca ilerler ve komşu lakünaları birbirine bağlar. Besin maddeleri havers kanalı içindeki bitişik kan damarlarından kanaliküller boyunca lakün içerisine yayılır (12,14,22).

Bu hücreler kemik matriks devamlılığı için aktif rol alırlar. Esas görevleri; kemik remodelasyonunu kontrol etmek ve kemiğe gelen yüklerin mekanik özelliklerini algılamaktır. Ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor konsantrasyonlarının kontrolü için önemlidirler. Kalsitonin tarafından direkt olarak uyarılırlar ve PTH

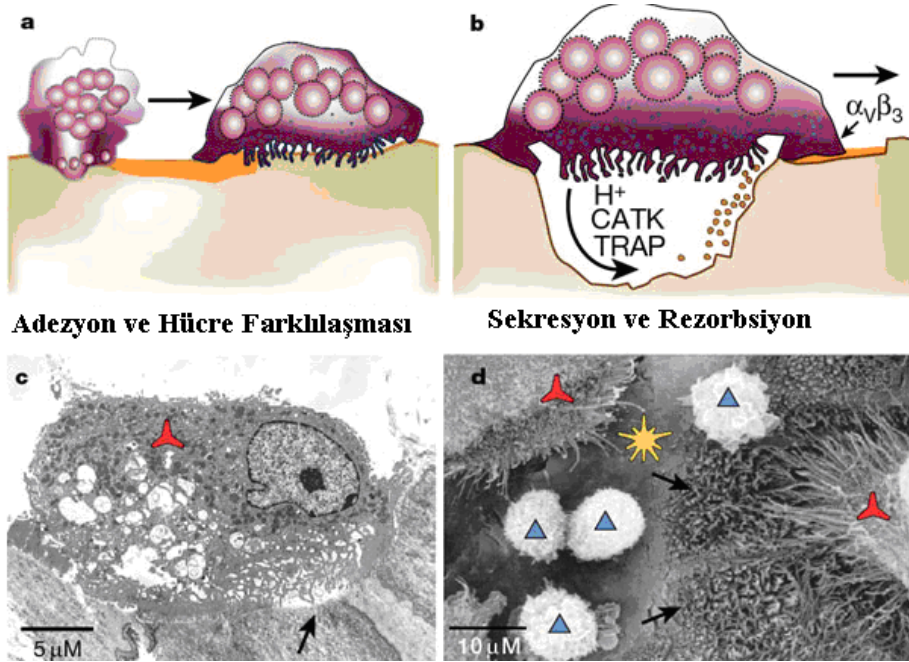
tarafından inhibe edilirler. Bir kemiğin canlılığı osteositlerin canlılığıyla orantılıdır. Osteosit ölümüyle birlikte matriks rezorpsiyonu da başlar (21,22).

2.3.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar kemik doku rezorpsiyonunda görevli, çok nükleuslu, mitokondri ve vakuolden zengin dev hücrelerdir. Osteoprogenitör kökenli olmayıp monosit-makrofaj orjinlidir. Monositler, kemik iliğinin stromal hücreleri ve osteoblastlar tarafından düzenlenen bir işlemle 30 kadar çekirdekten meydana gelen çok çekirdekli osteoklastları oluşturmak için birleşirler.(12,14,21)

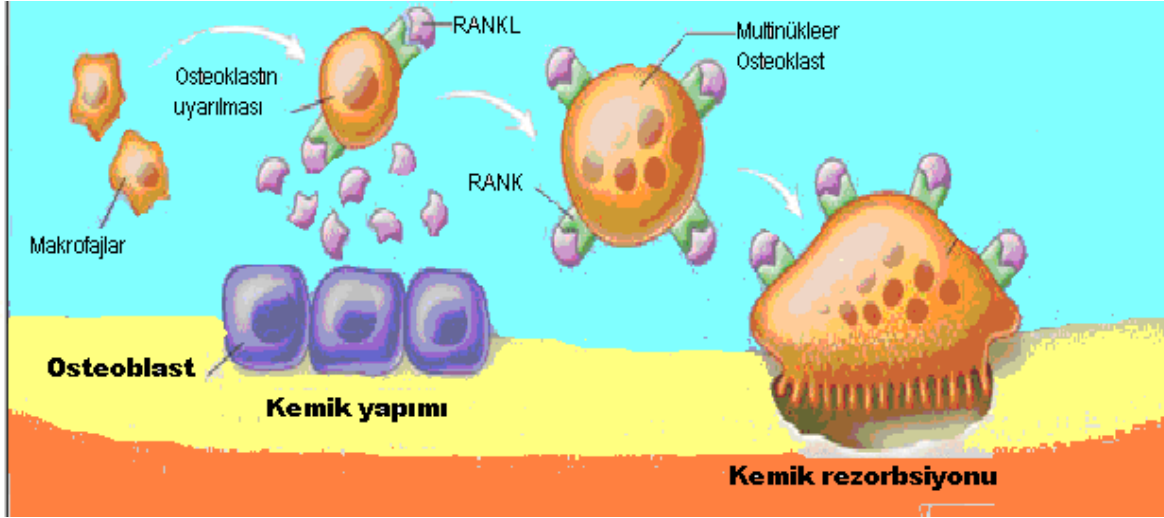
Kemik rezorpsiyonunda yüzey alanını artırmaya yarayan fırça şeklinde sitoplazma katlantıları vardır (22). Osteoklastlar kortikal kemikte cutting cone denen tünelleri açarlar, kansellöz ve periosteal yüzeylerde Howship lakunaları adı verilen karakteristik çukurları oluştururlar (12-14)

Hedef kemik matriksine bağlandıktan sonra, osteoklastlar karbonik anhidraz salgılayarak kemik emilimi için gerekli olan korunmuş bir asidik çevre meydana getirirler. Kemik emilimi önce ATP-az aracılığı ile düzenlenen asidik bir ortamda inorganik kemik bileşenlerinin ayrılmasını, takiben de katepsin K denen bir lizozomal proteaz ile organik bileşenlerin enzimatik yıkımını içerir. Kemik rezorpsiyonu tamamlandıktan sonra apoptozise uğrarlar. Osteoklastlar, kemiğin yeniden şekillenmesinde ve yenilenmesinde önemli rol oynarlar (12-14).



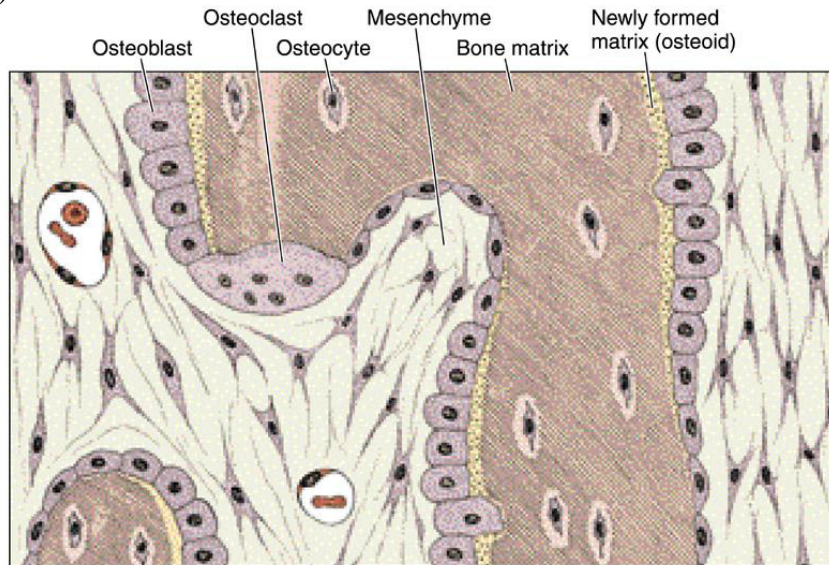
Şekil 6 : Osteoklast hücresi (adezyon, hücre farklılaşması, sekresyon ve elektronmikroskopik görüntüleri)

Osteoblastlar (ve tümör hücreleri), osteoklastlar üzerinde bulunan reseptor activator of nuclear factor kappa beta (RANK) denen reseptörlere bağlanan ve osteoklastları aktive ederek kemik yıkımını artıran bir molekül olan reseptor activator of nuclear factor kappa beta ligand (RANKL) salgılar. Bu mekanizma RANKL'ye bağlanan osteoprotegerin tarafından inhibe edilir ve osteoklastlarla etkileşim engellenir (22).



Şekil 7 : Osteoblastların RANKL salgılaması ve osteoklast aktivasyonu

Osteoklastlar tartarat-rezistans asit fosfataz sentezlerler. Kemik yüzeylerine integrinler ile bağlanırlar. Kemik rezorpsiyonunu direk olarak inhibe eden kalsitonine özgü reseptörler içerir. İnterlökin -1 (IL-1) osteoklastik kemik yıkımının güçlü bir uyarıcısı iken interlökin-10 (IL-10) osteoklast oluşumunu baskılar (22).



Şekil 8 : Kemiğin hücresel elemanları

2.4. Kemik Matriksi :

Kemik matriksi organik ve inorganik bileşenlerden oluşan kompozit bir yapıya sahiptir. Kemik kuru ağırlığının %40'ı organik, %60'ı inorganik bileşenlerden oluşur (22).

2.4.1 Organik Matriks:

Başlıca kollajen, proteoglikanlar, kollajen dışı matriks proteinleri (glikoproteinler, fosfolipidler, fosfoproteinler), büyüme faktörleri ve sitokinler oluşturur.

a.Kollajen: %90 oranında Tip I kollajen bulunur. Kollajen kemiğin gerilme kuvvetinden sorumludur. Bunun dışında Tip III-V-XII kollajen de kemiğin yapısında yer alır. Kollajen molekülünün sonları arasında kollajen fibrili içerisinde boşluklar ve paralel moleküllerin yan yüzlerinde porlar bulunur. Mineralizasyon işte bu por ve boşluklar arasına hidroksiapatit kristallerinin birikmesi ile oluşur (14-22).

b.Proteoglikanlar: Core protein ve glikozaminoglikan yan zincirinden oluşan molekülüdür. Kısmi olarak kompresif kuvvetlerden sorumludur. Hyalüronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat, biglikan ve dekorin kemik matriksinde bulunur.

c.Kollajen olmayan matriks proteinleri: Mineralizasyon ve kemik formasyonunda görev alırlar. Osteokalsin, osteonektin, osteopontin olmak üzere 3 adettir. Bunların yanında matricellular proteinler, fosfoproteinler ve adeziv proteinler de bulunur. Osteokalsin (kemik gamakarboksiglutamik asit içeren protein - K vitamini bağımlı protein), osteoklastları etkiler, doğrudan kemik yoğunluğu regülasyonu sağlar. Osteonektin, trombosit ve osteoblastlarca salgılanır. Ca regülasyonu ve matriks mineral organizasyonunda rolü olduğu düşünülüyor. Osteopontin ise integrine benzer ve hücre bağlayıcı proteindir (22).

d.Büyüme faktörleri ve sitokinler: Kemik hücresi farklılaşması, aktivasyonu, büyümesi ve kemik döngüsüne yardım ederler. TGF- β (transforming growth faktör), PDGF (platelet derived growth faktör), BMP (bone morfojenik proteinler), IL-1,6 (interlökin), CSF (colony stimulan factor) ve IGF-I,II (insulin like growth faktör) kemik matriksinde bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerdendir (22).

2.4.2. İnorganik Matriks:

Kuru kemik ağırlığının %60'ını oluşturur. İyon rezervuarı olarak görev görür ve kemiğin kompresif güçlere karşı direncini sağlar. Kemiğin inorganik kısmını kalsiyum fosfatın birleşmesiyle oluşan kalsiyum hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ve osteokalsiyum fosfat tuzları oluşturur (22). Kalsiyum ve fosfatın yanı sıra bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve eser elementler bulunur. Kalsiyum ve fosfat elementleri, iğ biçimindeki hidroksiapatit kristalleri şeklinde kristallerin yüzeyindeki hidrate iyonlar, hidrasyon kabuğu denilen ve vücut sıvılarıyla kristaller arasında iyon değişiminin sağlandığı bir oluşuma sebep olurlar (12). Hidroksiapatit ve kollajen lifleri arasındaki ilişki kemiğin sertlik ve dayanıklılık özelliğinden sorumludur. İnorganik matriks kemiğin kompresif gücünü sağlar.

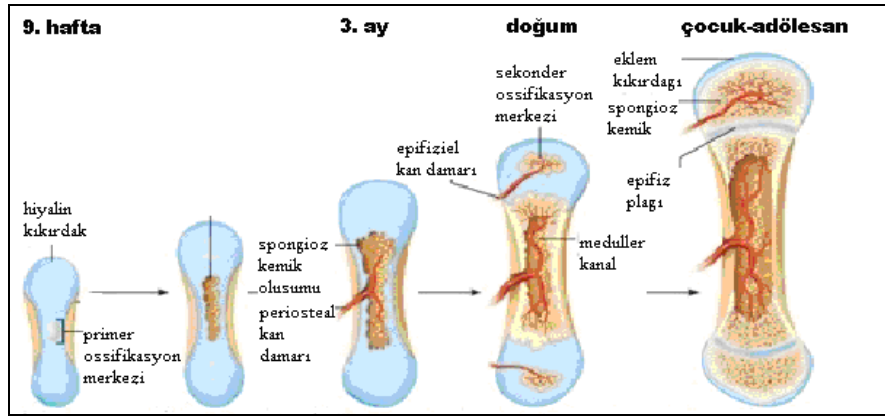
2.5.Kemik Yapımı:

Kemik yapımı 3 farklı şekilde olur :

1. Enkondral kemik yapımı
2. İntramembranöz kemik yapımı
3. Apozisyonel kemik yapımı

2.5.1 Enkondral Kemikleşme:

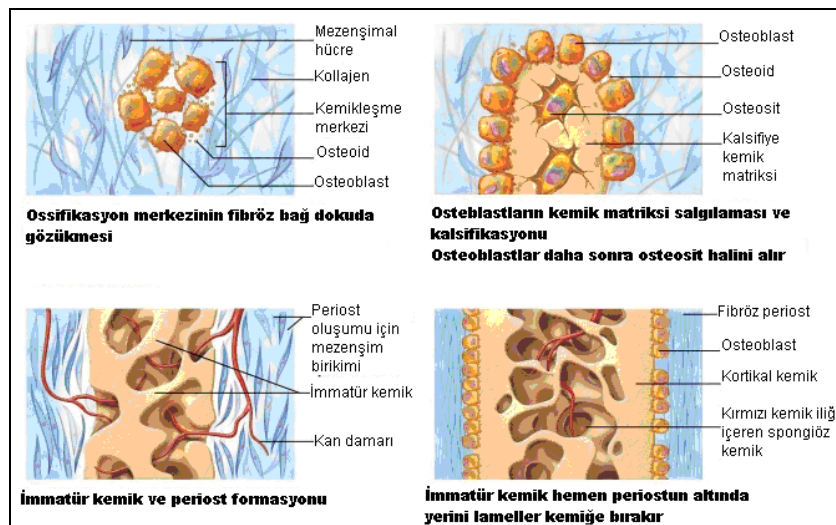
Mineralize kıkırdığın model olarak kullanılarak kıkırdak modelin yerini kemik dokusunun alması ile oluşan kemik yapımı şeklidir. Osteoprogenitör hücreler kıkırdak matriks salgılar ve kondrositlere dönüşürler. Hyalin veya hyalin benzeri çoğunlukla tip II kıkırdak oluşumu görülür. Bunu kıkırdığın mineralizasyonu ve vaskülarizasyonu takip eder. Vaskülaritenin artışıyla hücreler kıkırdığın rezorbsiyonuna başlar. Rezorbe olan kıkırdığın ortasında medüller boşluk oluşur. Hematopoetik kemik iliği bu alanda gelişir. Osteoprogenitör hücreler kıkırdakimsi septumun üstünü kemik matriksi ile kaplayacak olan osteoblastlara dönüşür. Sonraki aşamada ise immatür kemik ve kalsifiye kıkırdak karışımı osteoklastlarca rezorbe edilerek yerine osteoblastlarca matür kemik dokusu oluşturulur (12). Enkondral kemik oluşumu örnekleri; embriyonik uzun kemik formasyonu, uzun kemiklerin longitudinal büyümesi, kırık kallusu, demineralize kemik matriksi kullanılarak şekillenmiş kemik tipidir (Tablo-1).



Şekil 9 : Enkondral kemikleşme

2.5.2. İntramembranöz Kemikleşme:

Intramembranöz kemikleşme kıkırdak bir model olmadan kemik oluşumudur. İntramembranöz kemikleşmenin olacağı bölgedeki undifferansiye mezenkimal hücreler gevşek tabakalar halinde dizilir ve mezenkim hücrelerinden fibroblastlar gelişerek kollajen sentezlerler. Fibriller yapıdaki kollajenin membran yapısı oluşturmamasından dolayı bu adı almıştır. Bu membran içindeki mezenkim hücrelerinden osteoblastlar farklılaşır. Osteoblastlar daha sonra mineralize olacak 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 ağısı yapı oluştururlar. Bu ağısı alanda kemik iliği gelişir (23). Embriyonik yassı kemik formasyonu, distraksiyon osteogenezisi sırasındaki kemik formasyonu ve blastema kemik intramembranöz kemikleşme ile oluşur (Tablo-1) (22).



Şekil 10 : İntramembranöz kemikleşme

2.5.3. Apozisyonel Kemikleşme:

Apozisyonel kemik yapımı, kemiklerin periosteal genişlemesi ve kemik remodelasyonu sürecinde gerçekleşir. Mevcut kemik yüzeyinde osteoblastların dizilimiyle başlar. Bu hücreler üst üste dizilerek kemik lamellalarını oluşturan osteoidi sentezler. İskelet gelişimi ve büyüme sırasında, enkondral veya intramembranöz kemikleşme ile oluşan ilk kemik yapı periost ile çevrelenir. Periosteal osteoblastlar kemiğin dış yüzeyinde osteoid sentezleyerek yeni kemik üretir ve tabaka tabaka kemik çapını genişletir. Aynı zamanda kemik remodelasyonunun formasyon fazında osteoblastlar rezorbsiyon sahasında tabaka tabaka osteoid sentezlerler. Bu da apozisyonel kemik yapımı şeklinde olur (12).

Tablo-1 : Kemik oluşum tipleri

Kemikleşme Tipi	Mekanizma	Normal Mekanizma Örnekleri
1. Enkondral	-Kıkırdak modelin yerini kemik dokusu alır	a.Embriyonik uzun kemik formasyonu b.Longitudinal büyüme (fizis) c.Kırık kallusu d.Demineralize kemik matriksi kullanılarak oluşmuş kemik matriksi
2. İntramembranöz	-Farklılaşmamış mezenkimal hücre kümeleri osteoblastlara farklılaşır ve kemik halini alır	a.Embriyonik yassı kemik formasyonu b.Distraksiyon osteogenezisi c.Blastema kemik
3. Apozisyonel	-Osteoblastlar mevcut kemikte yeni kemiği hazırlarlar	a.Periosteal kemik büyümesi b.Kemik remodelasyonunda kemik formasyon fazı

2.6.Kırık İyileşmesi :

Kırık, dıştan ve içten gelen kuvvetlerle oluşan, beraberinde çevre yumuşak dokuların da etkilendiği kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasını ifade eden bir tanımdır. Kırıklar; kuvvetin geliş yönüne, kemik doku sağlamlığına, kırık çizgisine, kırık fragman sayısına, travmanın derecesine, bulunduğu anatomik bölgeye, cilt ve çevre dokularda oluşan hasara göre çeşitli tiplere ayrılmıştır. Fizyolojik reaksiyonlar, bozulan kemik bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yöneliktir. Kemik, skar dokusu oluşturmaz ve yeniden yapılanmayla iyileşir.

Kırık iyileşmesi, kırık olduğu andan itibaren başlar, düzenli kemik doku ile kırık uçları birleşinceye kadar devam eder. Bu tamir süreci oldukça kompleks ve aynı zamanda oldukça düzenli basamaklardan meydana gelmektedir. Bu süreçteki birçok biyokimyasal ve hücrel basamak; gelişim sırasında büyüme plaklarındaki basamaklarla paralellik göstermekle beraber, kırık iyileşmesinde bu süreç iyileşme ile sınırlıdır ve devamlılık göstermez (24,25).

Temel olarak 2 tip kırık iyileşmesi vardır (24,26):

1. Primer kırık iyileşmesi
2. Sekonder kırık iyileşmesi

2.6.1. Primer Kırık İyileşmesi

Anatomik redüksiyon ve rijid fiksasyon yapılabilen kırıkların iyileşmesinde görülür. Kallus oluşumu görülmez. Kırık hattında canlı osteojenik hücrelerden osteoklast ve osteoblast farklılaşması olur. Osteoklastlar havers kanallarını genişletirler. Osteoblastlar da genişleyen bu kanallara yerleşerek konsantrik lameller kemik oluştururlar. Periost reaksiyonu görülmez.

2.6.2. Sekonder Kırık İyileşmesi

Kırık iyileşmesi kallus oluşumu ile olur. Embriyolojik kemik oluşumuna benzediği için enkondral kemikleşme de denir. Bu iyileşme sürecindeki her faz bir önceki ile iç içedir.

Tablo-2 : Tespit yöntemlerine göre kırık iyileşmesi çeşitleri

STABİLİZASYON TİPİ	BASKIN İYİLEŞME TİPİ
Alçı (kapalı tedavi)	Periosteal köprüleşen kallus ve interfragmanter enkondral kemikleşme
Kompresyon plağı	Primer kortikal iyileşme
İntramedüller çivi	Erken: Periosteal köprüleşen kallus, enkondral ossifikasyon Gec: Medüller kallus
Eksternal fiksator	Rijiditenin derecesine bağlı Az rijid: Periosteal köprüleşen kallus Çok rijid: Primer kortikal iyileşme
Yeterli kan akımıyla beraber immobilizasyon yetersizliği	Hipertrofik kaynamama
Yeterli kan akımı yokluğunda yetersiz immobilizasyon	Atrofik kaynamama
Kırık hattında ayrılma ile birlikte yetersiz redüksiyon	Oligotrofik kaynamama

Kırık beklenen sürede kaynamazsa bir kaynama gecikmesi ya da kaynamamadan söz edilebilir. Sistemik ve lokal etkenler kaynamamaya neden

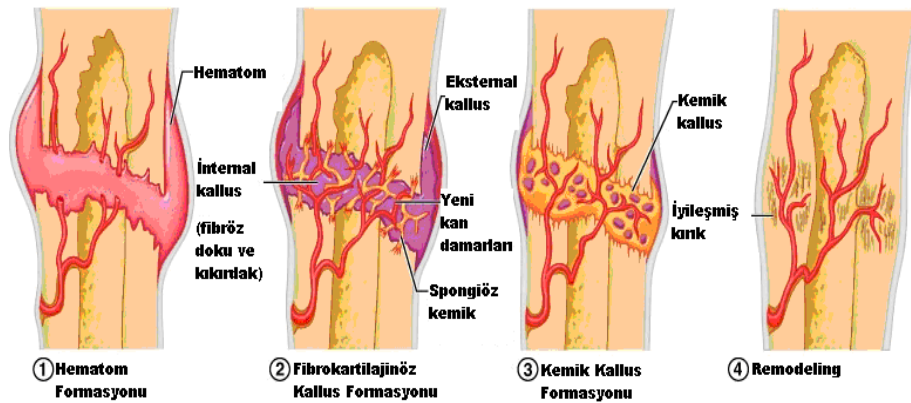
olabilir. Bir kırığın kaynadığını düşündüren bulgular kırık hattındaki hareketin kaybolması ve ağrısız tam yüklenmedir. Radyolojik olarak ise iki yönlü grafilere mevcut 4 korteksten en az üçünde kırık hattını köprüleyen kallusun görülmesidir. Kaynamama vasküler ya da avasküler olarak 2 ana tipe ayrılır. Vasküler kaynamamalar tespit yönteminde başarısızlık sonucu oluşurken, avasküler kaynamamalar ise kırık hattında kanlanmadaki problem sonucu oluşur.

De Palma'ya göre kırık iyileşmesi dört fazda incelenir (27):

- 1-Birincil hücresel kallusun oluşum fazı
 - a-Hematom fazı
 - b-Birincil hücresel kallusun oluşumu
- 2-Birincil hücresel kallusun damarlanma fazı
- 3-Hücresel kallusun kemikleşme fazı
- 4-Kemiğin yeniden şekillenme fazı

Cruess ve Dumart' a göre sekonder kırık iyileşmesi 3 evrede oluşur (28) :

- Yangı (enflamasyon)
- Onarım (reperasyon)
- Yeniden şekillenme (remodeling)



Şekil 11 : Kırık iyileşme evrelerinin şematik görünümü

1. Yangı (Enflamasyon) Evresi (1-4 gün):

Bir kırık; matrikste hasara, hücrelerde ölüme, periosteum ve endosteumda yırtıklara ve kırık kemik uçlarının yer değişimine neden olur. Tüm doku travmalarında olduğu gibi kırıklarda da ilk ortaya çıkan yanıt enflamasyon olup ilk 5 günü kapsar.

Kanama ve trombotik faktörlerin salınımından sonra başlayan doku yıkımı kan hücrelerinin ve mezenkimal hücrelerin göçünü düzenleyen mediatörlerin katılımıyla devam eder (29-30). Bu mediatörlerin ortama göçü kırıkta ve kemik oluşana kadar devam eder. Bundan sonra zamanında ve uygun yeni kemik doku oluşumu iki anahtar olaya bağlıdır. Bunlar kan akımı ve stablitedir (30). Erken dönemde kırık hattında, periosteum altında ve medüller kanalda oluşan kırık hematomu enflamasyon sürecini başlatır. Hematom içerisindeki trombositlerden ve zarar görmüş kemik ve yumuşak dokulardan salgılanan enflamatuar mediatörler, kan damarlarının vazodilatasyonuna, plazma ekstrasvazasyonuna ve kırık bölgesinde ödem oluşumuna neden olurlar (31,32,33,34). Bu mediatörler başlıca enflamatuar hücrelerden salgılanan interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) ile trombositlerden salgılanan dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) ve trombosit kökenli büyüme faktörüdür (PDGF). Bu mediatörler başlıca polimorfik hücre göçü, proliferasyonu ve mezenkimal kök hücre farklılaşmasından sorumludurlar (24). Ortamdaki makrofaj, lenfosit ve lökositler salgıladıkları çeşitli mediatörlerle anjiogenezi stimule ederler. Enflamatuar cevap yatışırken nekrotik doku ve eksuda rezorbe olur. Bölgeye göç eden fibroblastlar yeni matriks oluşturmaya başlar (30,33-36). Kırık hattındaki fibroblastlar, mezenkimal hücreler ve kemik öncül hücreler granülasyon dokusu oluşturarak kırık uçlarını şekillendirir (31).

2.Onarım (Reperasyon) Evresi (2-40 gün)

Onarım evresi kırık iyileşmesinde en önemli kısımdır. Onarım evresi kırık oluştuktan birkaç saat sonra enflamatuar evrede oluşan hematoma organize olmasıyla başlar, 7-12 gün içinde belirgin hale gelir, organize hematoma kalla dönuşümü ile devam eder. Kırık hematoma içindeki öncü hücreler lokal uyarıların etkisiyle fibroblast ve diğer hücrelere farklılaşırlar. Bu sayede hematoma organize olmaya başlar. Farklılaşma sonrası oluşan osteoblast ve kondroblast gibi hücrelerin aktiviteleri lokal ve sistemik mediatörlerce kontrol edilir. Öncü yani osteoprogenitör hücreler vasıtasıyla hematoma artık oluşmuş ve daha stabil olan granülasyon dokusu gelişmiştir (33).

Onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler mezenkimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip (pluripotent) hücrelerdir. Çoğunlukla kırık bölgesindeki granülasyon dokusunun içinden, ayrıca periosteumun osteojenik tabakası ve daha az olarak ta endosteumdan köken alırlar. Bu hücreler farklılaşmaya başladığında, ilk değişikliğe uğrayan hücreler, kılcal damarlarla hematoma içine giren fibroblastlardır. Üçüncü günde karşı kırık uçlarında, yoğun mezenkimal hücre mevcudiyeti vardır. Bu hücreler kırık parçaları arasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluşturur. Periosteal ve endosteal osteojenik hücrelerle, fibrin matriksteki fibroblastların çoğalıp farklılaşmasıyla, bu granülasyon dokusu oluşur. Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar

kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoidi salgırlar. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içediği kollajen kapsamıyla yakın ilişkilidir. Kallusun boyutu kırığın hareket derecesiyle doğru orantılıdır. İleri yaşlarda bu hücrelerin farklılaşma kapasiteleri azalır. Periosteumun hasar görmesi ya da ortamdan uzaklaştırılması kırık iyileşmesini yavaşlatır (22).

Kırık bölgesinde mezenkimal hücrelerin çoğalması ilk 16 saatte saptanmıştır. Bu çoğalma, kırık sonrası 32 saatte en üst düzeye çıkar. Kırık iyileşmesinin ilk dönemlerinde periosta ait damarlar, geç dönemde ise besleyici damarlar kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Kanla beslenmenin daha iyi olduğu kemiğe yakın seviyedeki hücreler osteoblastlara dönüşür, yakın olmayan kısımda kılcal damarların gelişim hızı hücre çoğalmasının hızına uyum gösteremediğinden, hücreler kondrosit ve kondroblastla farklılaşarak kırık dokuyu oluşturur. Onarımın ilk zamanlarında kırık dokusu (**kırık dokusu**) belirginleşir. Kırık dokusu damarlanmasından sonra kemik gelişimi başlar. Kan dolaşımı yeterli düzeyde olursa osteoblastlar kırık içinde normal kemik gelişimine elverişli matriksi sağlamış olurlar. Hücre düzeyinde yapılan çalışmalara göre; damar endoteli sialik aside bağlı olarak, kırık dokuda proteoglikanlardan zengin olduğu için negatif yüklüdür. Yeni damarlar ile kırık dokusu arasındaki bu itme kuvveti nedeni ile damarlanma engelleniyor gibi gözükmeştir. Ca bu negatif yükü pozitif çevirerek, yeni damarların kırık dokuya yönelimini sağlamaktadır. Dolayısıyla kemik kırık dokusu gelişimi için damarlanma, bunun sağlanabilmesi için de osteoidin mineralizasyonu gereklidir. Kemik normalde negatif yüklüdür. İyileşme ve büyüme döneminde pozitif yüklü hale alır ve daha sonra tekrar negatif yüklü hale gelir (15,22,27).

Mineralizasyon (kalsifikasyon) olayında en ortak teori; osteoiddeki matriks vezikülleri varlığına dayandırılır. Hücresel düzeyde osteoblast ve kondrositlerden kaynaklanan matriks vezikülleriyle başlayıp devam eder. Bu veziküller, yüksek konsantrasyonda Ca ve PO₄ iyonları, cAMP, ATP, adenozintrifosfat, alkalen fosfat, pirofosfat, Ca bağlayan protein ve fosforin içerirler. Matriks vezikül membranı, Ca iyonlarını veziküle taşıyan çok sayıda Ca pompasına sahiptir. Vezikül içindeki iyon konsantrasyonu arttığında, kristalizasyon oluşur ve büyüyen kalsiyum hidroksiapatit kristal parçaları membranı delip matriks vezikülünü patlatarak içeriğini salar. Pirofosfat enzimi, kalsifikasyonu önleyen pirofosfatları parçalar. Alkalen fosfat ise fosfat esterlerinden fosfat iyonunu serbestleştirerek kalsiyumun çökmesini sağlar. Matriks veziküllerinden salınan kalsiyum hidroksiapatit kristalleri kristalizasyon kaynağı olarak hareket eder. Kristalizasyonun çevresindeki iyonların yüksek konsantrasyonu, kalsifikasyon faktörlerinin varlığı ve kalsiyum bağlayan proteinler, matriks kalsifikasyonunu teşvik ederler. Oluşan hidroksiapatit kristalleri de kristalizasyonu tetikler (28,29).

Osteoidin mineralizasyonu, sert kallusun oluşumu ve yapısal stabilitesi için gereklidir. Bu olay, osteoblastlar tarafından tropokollajen oluşturulmasıyla başlar. Tropokollajen, hücrenin iç tarafından dış tarafına hareket eden kollajen tellere polimerize olur. Kollajen teller kendi iç düzenlemelerine sahiptir ve tellerin arasında boşluklar (hole zones) vardır. Değişebilen kalsiyum ve fosfat eriyikleriyle, boşluk içindeki aminoasit zincirlerinin birbirini etkilemesiyle kırık bölgesinde minerallerin görülmeye başlamasının sonucu olarak, kalsiyum hidroksiapatit kristalleri dizili tellerin içinde veya etrafında kümelenir. Kalsifikasyon kemiğin telcikleri üzerine kalsiyum fosfat biriktiği zaman başlar. Bu olayın proteoglikanlar ve kalsiyum bağlayan glikoprotein olan osteonektinle uyarıldığı bilinmektedir. Onarımın bu döneminde kırık uçları arasında kemik miktarı artarak fuziform bir kallus (kemik kallus) kitlesi ile kırık aralığı örtülür (22,28,29).

Periostun iç (kambiyum) tabakasındaki Pluripotent Mezenkimal Hücreler (PPMH) kırık bölgesindeki erken dönem kemik yapımında rol alırlar. Bunlar doğrudan osteoblastlara farklılaşarak periostal intramembranöz kemikleşmeyi başlatırlar. Yani periosttan kaynaklanan intramembranöz kemik yapımı, kırıktan hemen sonra başlar. Oluşan intramembranöz woven kemik kırık hattının her iki kenarına bitişik olarak görülmeye başlar ve kallus merkezine doğru ilerler. İntramembranöz kemikleşme sonucu meydana gelen kallusa kemik kallus (**sert kallus**) denir. Intramembranöz kemikleşme kırık sonrasında 8-16 günde periost altında belirgindir (24).

Kırık kemik uçları, iç ve dış kallus gelişimiyle çok sağlam bir yapıya kavuşur. Kallus oluşumu, yetişkinlerde çocuktan ve kompakt kemikte trabeküler kemikten daha yavaş meydana gelir. Yaralanmadan sonra kallus oluşması ve mineralizasyonu 4-16 hafta arasında zaman gerektirir. Kallus oluşumuyla beraber kaynamanın olduğu söylenebilir. Bununla beraber, kaynama henüz son noktasına ulaşmış değildir, onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz ve etkisiz kısımlarının geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzanması ile yeniden şekillenme evresi (remodeling) başlar (25).

3.Remodeling (Yeniden Şekillenme) Evresi (25-100 gün)

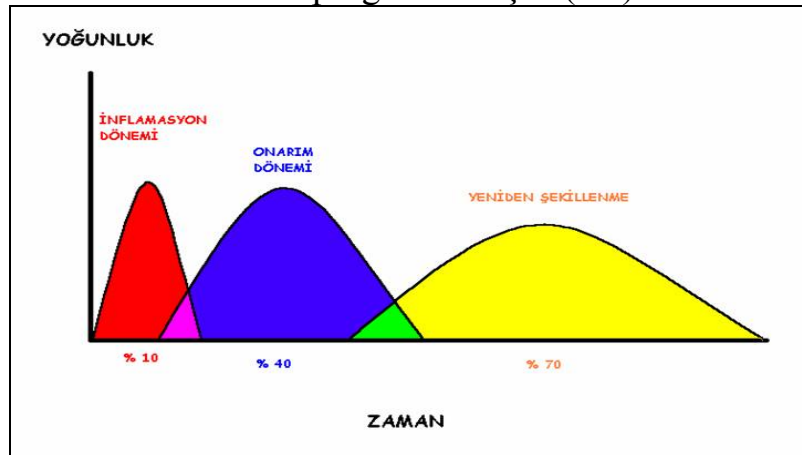
Kırık uçları kallus ile sıkıca stabil hale getirildikten sonra sıra bu tamir dokusunun fazlalık kısımlarının resorbe edilmesine gelir. Bu iyileşmenin en uzun dönemidir. Yıllarca sürebilir. Kemik uçları arasındaki stres aktarım yolundaki trabeküler kemik yerini kompakt kemiğe bırakır. Uzun bir süreçten sonra immatür kemik doku halindeki kallus dokusu, normal streslere dayanıklı

kemik haline gelir. Bu değişim aktivasyon, rezorbsiyon ve formasyon şeklinde sıralanabilir. Bu olaylar Wolff kanununa bağlı olarak gelişir (23,33).

Yeniden sekillenme döneminde başlıca 4 süreç öne çıkar:

- 1-Mineralize kırıkdağın osteoid doku ile yer değiştirmesiyle primer spongiozanın oluşumu
- 2- Spongioz dokunun yerini yeni lamellar kemik paketlerinin alması
- 3- Kompakt kemik uçlarındaki kallusun yerini lamellar kemikten yapılmış sekonder osteonların alması,
- 4- Medüller boşluğu kaplayan kallus dokusunun uzaklaştırılarak, boşluğun yeniden düzenlenmesi.

Bu dönemde hücre ve matriks değişiklikleri olur ancak asıl önemli değişim kemiğin mekanik stabilitesindeki progresif artıştır (35).



Şekil 12 : Kırık iyileşme evreleri

2.7.Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler:

Kırık iyileşme süreci organize olmuş bir çok hücre tipinin katkılarıyla gerçekleşen, bu süreç boyunca bir çok faktörün etkili olduğu, hayli karışık fizyolojik bir süreçtir. Kırığın olduğu yer, kırık yerinin kanlanma özellikleri, kırığın açık veya kapalı oluşu ve muhtemelen kullanılan ilaçlar (örneğin; steroidler, nonsteroid antienflamatuarlar, antikoagulanlar) gibi bir çok değişken kırık iyileşmesini etkiler. Şayet kırık uçları birbirine çok yakınsa, kırık uçlarında yeterli tespit yapılmışsa, kemiğin kanlanması iyiye, kırık yeri yumuşak doku örtüsü iyi ve osteomyelit yoksa genelde kırık iyileşir.

2.7.1. Sistemik Faktörler

A.Yaş:

Hastanın yaşı ile kırık iyileşme hızı birbiri ile direkt bağlantılıdır. Çocukluk çağı döneminde revaskularizasyon ve mezenkimal hücre farklılaşması oldukça

hızlı bir süreçtir. Bu nedenle çocuklarda kırık iyileşmesi erişkinlerden daha hızlıdır.

B.Beslenme Durumu:

Kırık iyileşmesi çok hassas dengeler üzerine kurulu bir sistemdir. Çok basit açlık durumunun kırık iyileşmesini olumsuz etkilediği deneysel modellerde gösterilmiştir.

C.Hormonlar:

Büyüme hormonu : Kırık iyileşmesi üzerine etkileri halen tartışmalıdır. Büyüme hormonu miktarındaki azalmanın kırık iyileşmesini yavaşlattığına ait çalışmaların varlığı yanında bu hormon miktarındaki fizyolojik sapmaların kırık iyileşmesinde çok az etkisi olduğuna ait çalışmalar da mevcuttur. Büyüme hormonunun, kallus hacminde artışa sebep olduğu belirtilmektedir.

Parathormon: Vücutta kalsiyum dengesini sağlayan temel hormondur. Kemik rezorbsiyonunu , 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. PTH nun osteoklast sayısını artırıcı, kemiğin yeniden şekillenmesini uyarıcı ve osteositleri uyatarak osteolizi hızlandıran etkileri vardır. PTH kemikteki rezorbsiyon etkisini osteoblastlar üzerinden gösterir. İnaktif osteoblastlar PTH sayesinde aktif hale gelerek kemik yüzeyinde osteoklastların yapışabilecekleri bir boşluk hazırlarlar (22).

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 yapım yıkım arasındaki dengenin yıkımı azaltarak yapıya kaymasını sağlar (25,37).

İnsülin: İnsülin anabolizan bir hormondur. Kırık iyileşmesini hızlandırmaktadır. Somatomedin reseptörleri üzerinden indirekt yolla kemik formasyonuna katkıda bulunur. Proteine bağlı kalsiyum artışını etkileyerek kırık iyileşmesine yardımcı olur. İnsülünün kemikteki kollajen sentezini stimüle edici etkisi son derece önemli bir durum olarak belirtilmiştir (22,38,39).

Tiroid hormonu: Kemiğin remodelizasyonuna yardım eder. Kemik rezorbsiyonunu kemik oluşumundan daha fazla etkiler. Kondrosit büyümesini,

tip X kollajen sentezini ve ALP aktivitesini uyarak fizisteki iskelet büyümesini düzenler (22).

Kortikosteroidler: Kollajen sentezini önleyerek ve osteoblast aktivitesini azaltarak kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etki gösterirler. Ayrıca kallus oluşumunu azaltır. Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü (FDGF), epidermal kaynaklı büyüme faktörü (EGF), ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) üzerine antagonist etki yaparak kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler (40,41).

Gonadal steroidler: Kemik gelişiminde ve bütünlüğünün sağlanmasında etkilidirler. Östrojen kemik rezorbsiyonunu önleyerek kemik kaybını engeller ve epifiz kapanması için mutlak gereklidir. Androjenler ise kas gücünü artırarak ya da dolaylı olarak kemik yapımını uyarak etkili olurlar (22,42).

D.Sistemik Hastalıklar:

Sistemik enfeksiyonlar, kan hastalıkları, metabolik hastalıklar, maligniteler, diyabet, anemi, nöropatiler ve diğer kronik hastalıklar kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir. Kronik hastalıklarda özellikle de enfeksiyonlarda artan lökositlerin proteolitik enzimleri, matriksin bozulmasına neden olur ve osteoid oluşumunu engeller.

E.Vitaminler:

A vitamini normal dozda mezenkimal hücre farklılaşmasını uyarak kırık iyileşmesine yardımcı olur. Eksikliğinde osteoblast farklılaşmasında ve osteoklast aktivitesinde bozulma olur ve kemik oluşumu engellenir. A vitamini fazlalığındaysa hücre çoğalmasının olmamasıyla birlikte kırıkta kolonlarında erozyon meydana gelir. Osteoklastlara farklılaşma fazla uyarılır ve kırık iyileşmesi gecikir.

C vitamini, kollajen sentezinde kofaktör olarak etki ederek dolaylı yoldan kemik iyileşmesini olumlu etkiler.

D vitamini, normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırır. D vitamini eksikliğinde kalsiyum düzeyi düşer ve kemik kalsifikasyonu zayıflar. Kalsiyumun kemikten kana geçişi yanında, kemik hücrelerinde sitrat üretimini artırır. Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme evresinde rol oynar. Sonuç olarak; D vitamini normal dozda kırık iyileşmesini hızlandırırken, toksik dozda olumsuz etki eder.

B5 vitamini eksikliği ve K vitamini antagonistleri kırık iyileşmesine olumsuz etki ederler.

F.İlaçlar:

NSAİİ'lar etki mekanizması çok net olmamakla birlikte PG sentezinin inhibisyonu ve azalmış mezenkimal hücre proliferasyonu yoluyla kırık iyileşmesi üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Cox-2 (siklooksijenaz-2) spesifik olan ilaçların daha az özgün olanlara göre kemik iyileşmesini daha olumsuz etkiledikleri gösterilmiştir (43,44).

Antikoagulanlar özellikle düşük molekül ağırlıklı heparin profilaktik dozda kırık iyileşmesine herhangi bir etkisi olmazken antikoagulan dozda ya da yüksek dozda heparin kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir.

G.Nikotin:

Sigara içenlerde kaynamama ve geç kaynamanın görülme sıklığındaki artma istatistiksel olarak gösterilmiştir. Nikotin kırık iyileşmesi sürecinde hücreler üzerine olumsuz etkileriyle makrofaj ve fibroblastların hem olgunlaşmasını hem de çoğalmasını bozmaktadır. Ayrıca vazokonstrüksiyon yaparak doku perfüzyonunda da azalmaya hipoksi ve iskemiye yol açmaktadır (45).

H.Büyüme Faktörleri:

Polipeptid yapıda olan büyüme faktörleri hücre fonksiyonunun lokal düzenleyicisidirler.

Prostaglandinler: Hücre membranında bulunan araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi yardımıyla oluşurlar. Hücre duvarı ya da kollajen hasarında ortaya çıkarlar. Kemotaktik ve güçlü vazodilatördür. Hücre proliferasyonunu hızlandırırlar. Hücre içine ve hücre dışına Ca akışını kolaylaştırırlar. PGE2 ve PGI2 kemik rezorbsiyonunu, PGE1 ve PGE2 'nin yeni kemik yapımını artırıcı etkisi vardır.

BMP: Yaralanan kemik kaynaklı morfogenetik proteindir. Mitojenik ve dönüştürücü bir faktördür. Mezenkimal hücrelerin kıkırdak ve kemik hücrelerine farklılaşmasına, ektopik kemik uyarımının artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür. BMP 1–10 olmak üzere 10 alt grubu vardır. Bunlardan BMP–1, TGF-β ailesinin alt grubuna bağlı değildir. BMP–7 osteojenik protein 1, BMP–8 ise osteojenik protein 2 olarak bilinir.

TGF-β: Dönüştürücü büyüme faktörüdür. Enflamasyon ve doku tamirinden sorumludur. Tüm hücreler moleküler formlarının birinde TGF-β oluştururlar ve tüm hücreler bu faktörün reseptörüne sahiptir. En önemli kaynağı kemiğin hücre

dışı matriksi ve trombositlerdir. TGF- β kondrosit ile osteoblastlarda sentezlenir ve encondral kemikleşme sırasında hücre dışı matrikste birikir. Onarım zincirinde rol almak üzere trombositlerden de salınır. Makrofajlardan salınan en güçlü kemotaktik ajandır. Hücrenin integrin reseptörlerini uyarmak yoluyla hücre dışı matriks bileşenlerinden olan kollajen, fibronektin ve proteoglikanların oluşumunu artırır. Bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılar. Sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna etki eder.

İnterlökinler: Makrofaj ve monosit kökenlidir. IL-1 fibroblast çoğalması, kollajenaz ve PGE2 üretimiyle ilgilidir. Ayrıca osteoklastlara etki ederek kemik rezorbsiyonu üzerine de etkilidir.

FDGF: Fibroblast kaynaklı büyüme faktörüdür. Kıkırdak ve fibroblastlar için mitojeniktir. Anjiogeneizde rol oynar. Kıkırdak oluşumu aşamasında kallusu genişletir. Yüksek dozda kemik gerilimini artırır.

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörüdür. Fibroblast ve kemik hücreleri için mitojeniktir. Kırık sahasında yerel olarak bulunabildiği gibi kan dolaşımında da bulunmaktadır. Bağ dokusunda kollajen sentezini artırır. Fibroblast çoğalmasını, mezenkimal hücre mitozunu, monosit ve makrofajların kırık bölgesine göçünü artırır. PDGF uygulamasıyla kallus yoğunluğu ve hacmi artmıştır.

İnsulin-like Growth Faktör (IGF): Polipeptid yapılı iki üyesi vardır. IGF-I kollajen sentezini ve hücre proliferasyonunu uyarır. Osteoblastların çoğalmasını ve aktive olmalarını sağlar. Ayrıca growth hormonun da kemik iyileşmesinde IGF'ler üzerinden etkili olduğu, lokal uygulanmasının değil sürekli infüzyon şeklinde uygulanımının etkili olduğu gösterilmiştir (1).

Plazma Fibronektini: Yeni damar oluşumu için mitojeniktir.

Somatomedin C: Büyüme hormonu iskelet sistemi üzerine etkilerini karaciğerde sentezlettiği somatomedin C aracılığıyla yapar. Kondroblastların bölünme ve farklılaşmalarını, ayrıca kemik matriksi oluşumunu uyarır.

EGF : Epidermal büyüme faktörüdür. Kemik geri emilimini hızlandırır.

CDGF : Kondroblast kökenli büyüme faktörüdür. 2 tipi vardır ve Tip II kollajen ve hyaluronik asit için düzenleyicidir.

MDGF : Makrofaj kaynaklı büyüme faktörüdür. Sıçanlarda osteoblast benzeri hücreler ve kondrositler için mitojeniktir.

ECGF : Epidermal hücre kaynaklı büyüme faktörüdür. Kıkırdak ve kemik için mitojeniktir.

ECDGF : Endotelial hücre kaynaklı büyüme faktörleridir. Yeni damar oluşumu için mitojeniktir.

I. Santral Sinir Sistemi Travmaları:

Kafa travmalı hastalarda uzun kemiklerde ve eklemlerde artmış bir osteogenesis saptanmıştır.

J. Radyoterapi:

Radyoterapi uygulanmış kemiklerin kırılma eğilimi arttığı gibi kırık iyileşmesi de yavaştır. Radyoterapi sahasında revaskülarizasyon bozukluğu önemli bir sebeptir. Ancak kanlanmada kırık iyileşmesini etkileyecek kadar bozukluğun oluşabilmesi için standart radyoterapi dozlarının üzerine çıkılması gerekliliği de vurgulanmıştır.

2.6.2 Lokal Faktörler

A.Travmaya bağlı nedenler:

Kırık fragmanlarının deplasmanı ve şiddetli travmaya bağlı doku hasarı, aşırı doku nekrozu, hücre göçü ve vasküler invazyonun engellenmesi, yerel kan dolaşımının bozulması nedeniyle kırık iyileşmesini geciktirir. Çevre yumuşak doku hasarı ve trombosit ve mezenkimal hücreden zengin kırık hematomunun ortamdaki uzaklaşması ve enfeksiyona yatkınlık nedeniyle açık kırıklarda iyileşmeyi yavaşlatır (48,49,50). Eklem içi kırıklarda, kırığın olduğu eklemin sinovial sıvısında bulunan kollajenazlar kallusun başlangıç matriksini bozarak, kırık iyileşmesinin ilk evresini geciktirir. Segmenter kırıklarda ortadaki fragmanın medüller kan dolaşımının bozulması ve periosteal hasar nedeniyle kaynama bu tip kırıklarda gecikse de bazı yayınlarda kallus oluşumu ve total kemik kan akımı bakımından fark olmadığı bildirilmiştir (35,51). Kas, fasya, tendon ve nadiren de damar ve sinirlerin kırık fragmanları arasına girmesi kırık iyileşmesini geciktirir (52). Femur başı, talus ve skafoïd gibi bazı kemiklerde kan dolaşımının yetersiz olması veya yumuşak doku travmasının aşırı olmasına bağlı kan dolaşımının yetersizliği kırık iyileşmesini geciktirir (35). Kırılan kemiğin spongioz yada kortikal olması da kaynamayı etkiler. Spongioz kemik yüzey alanı fazla, hücresel bakımdan zengin ve kanlanması iyi olduğu için daha kolay iyileşir. Metafiz bölgesindeki kırıklar diyafiz kırıklarına göre daha çabuk kaynamakta ve kaynamama oranları daha düşük bulunmaktadır. Bunun sebebi metafiz bölgesinde kemiğin daha iyi kanlanması ve daha çabuk rejenere olmasıdır.

B.Tedaviye bağlı nedenler:

Yeterli şekilde ve sürede tespit kırık kaynamasının temel prensibidir. Stabil bir fiksasyon kırık iyileşmesini artırırken erken yük verilmesine olanak

sağlayan tesbitler mikro hareketlerle kırık iyileşmesini olumlu yönde etkiler. Yük verilmesi kemik oluşumu ve kallusun mineralizasyonunu artırır. Yük verme büyüme faktörlerini ve PGE2'yi stimüle ederek kırık iyileşmesini hızlandırır. Yüklenme osteoblastik aktiviteyi de artırır (30). Stabilizasyon yapılırken kanlanmayı olumsuz yönde bozan yumuşak doku ve kemikteki tahribat kaynamayı olumsuz yönde etkiler.

Kırık hattında oluşan kompresif ve gerici kuvvetler kemik yapımını uyarmasının yanı sıra kırık hattının kanlanmasını artırması yoluyla iyileşmeyi olumlu etkiler (35). Biyolojik tespit yöntemleriyle kaynamanın temel felsefesini oluşturan Perren'in gerilim teorisine göre kırık hattındaki boşluk ve hareketin miktarları sonucu oluşan gerilim kırık kaynamasını hücresel düzeyde etkilemektedir. Osteoblastlar yüksek gerilimli ortamdan hoşlanmazken, kondroblastlar ve fibroblastlar için uygun bir ortam oluşmaktadır (53).

C.Enfeksiyon:

Enfeksiyon kırık bölgesine eksojen olarak açık yaralanmalarla, iatrojenik olarak cerrahi müdahalelerle çok ender olarak da sistemik enfeksiyonun kırık bölgesine gelmesi ile oluşabilir. Sonuç olarak kaynamamaya yol açtığı bilinse de doğrudan kaynamama sebebi değildir. Ancak kırık hattında bakterilere karşı gelişen yangısal yanıt kemik ölümüne, kallusun devamlılığının bozulmasına, kemik parçaları arasındaki boşlukların genişlemesine ve dolayısıyla hareketin artmasına yol açarak kırığın kaynamasına olumsuz etkiler yapar. Enfeksiyöz materyal fibröz kallus oluşumunu engeller. Ayrıca kemik kalitesinin olumsuz etkilenmesi neticesi oluşabilecek olan tespit gereçlerinde gevşeme de kaynamama sebebi olabilir (30).

2.8 Diyabetes Mellitus:

2.8.1.Tanım

DM, insülin hormonunun yetersizliği ya da periferik etkisizliği sonucu ortaya çıkan, başta kalp-damar, böbrek, sinir sistemi ve göz olmak üzere tüm sistemleri etkileyen sistemik ve kronik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluk, kapiller membran değişiklikleri ve hızlanmış ateroskleroz ile seyreder. İnsülin ve oral antidiyabetik (OAD) ilaçların keşfiyle diyabetli hastaların yaşam süreleri belirgin olarak uzamıştır. Bu sebeple, diyabetli yaşam süresinin artmasına bağlı gelişen, kronik komplikasyonlarının görülme sıklığı artmıştır. Bu komplikasyonlar diyabetik hastaların en önemli mortalite ve morbidite nedenidir (54).

DM köken ve insüline yanıt açısından birbirinden ayrılan iki farklı tip oluşturur:

Tip I diyabet, ciddi ve mutlak insülin yetmezliğinden kaynaklanır. Plazma insülin düzeyi bu tip hastalığın karakteristiği olan beta hücresi kitlesindeki azalmadan dolayı düşüktür. Bu hastaların yaşayabilmesi için dışarıdan insülin almaları gerekir; bundan dolayı da insüline bağımlı terimi kullanılır (55).

Tip II diyabet ise insülin sekresyonundaki gecikme ya da bazı vakalarda glikoz yüklemesine karşı göreceli bir yetmezlik ve buna eklenen periferik dokuların insüline yanıt vermedeki yetmezliği ile ilişkilidir. Tip I diyabetin aksine, insülin yetmezliğinin şiddetli olmadığını ve Tip II diyabetin patogeneğinde temel rolü insülin rezistansının oluşturduğunu belirtmek gerekir (56,57).

Yetişkin popülasyonda DM insidansı %1-2'dir. Hem Tip I ve hem de Tip II diyabette genetik faktörlerin bazı rollerini destekleyen bilgilere karşın günümüzde genel kabul gören, her ikisinin de multifaktöriyel hastalık olduğu görüştür. Bir çok çevresel ve yapısal faktör diyabet yapıcı olarak diyabetes mellitusa yatkınlık hazırlar ve genetik olarak yatkınlığı olan kişilerde insidansı önemli bir şekilde etkiler. Bunların arasında en önemlisi obezitedir. Gebelik, kalıtsal eğilimi olanlarda travma, enfeksiyon, hipoksi ve hipertermi gibi bütün stres şekilleri diyabeti açığa çıkarabilir. Bütün streslerin özellikle enfeksiyonların, insülin gereksinimini arttırdığı, klinik olarak iyi şekilde gözlenmiştir (56,57).

2.8.2 İnsülin Metabolizması

İnsülin; pankreasın beta hücreleri içerisinde proinsülinde sentez edilmekte ve golgi kompleksinden kaynaklanan membranla çevrili granüller içerisinde depo edilmektedir. Beta hücrelerinden salgılanması insülinin iki kaynağını ilgilendiren iki fazlı bir süreç olarak gelişir. Örneğin glikoz düzeyindeki bir yükselme öncelikle beta granülleri içerisinde depolanmış olan insülinin erken salgılanmasını başlatır. Eğer salgılanma için uyarı devam ederse, bunu aktif insülin sentezini kapsayan gecikmiş ve uzamış yanıt izler. İnsülin salgılanmasını tetikleyen ajanlar olarak bilinen maddelerin içerisinde en önemlisi glikozdur. Glikoz, insülinin hem sentezini hem de salgılanmasını başlatır (56,57).

İnsülin anabolik bir hormondur. Aminoasitler ve glikozun membranlardan geçişi için, karaciğer ve iskelet adelesinde glikojen yapılması için, glikozun trigliseritlere dönüşümü için, nükleik asit sentezi için, protein sentezi için

gereklidir. Temel metabolik işlevi hücre içerisine glikoz taşıma oranının artırılmasıdır (57).

2.8.3 Diyabetin Kemik Dokusu Üzerine Etkileri

Sistemik bir hastalık olan diyabet, kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Diyabet ve kemik iyileşmesi arasındaki olumsuz etki bir çok klinik çalışmada bildirilmiştir (58-61). Diyabetik kırık kallusunda özellikle kırık iyileşmesinin erken evrelerinde hücre proliferasyonu ve kollajen sentezi azalır ve kemik biyomekanik olarak zayıflar (58,61,62,63). Bunların nedeni tam olarak bilinmiyor, fakat kırık iyileşmesinde insülinin anahtar rol oynadığı görülüyor (1). Yapılan çalışmalarda osteoblastik hücrelerde insülin reseptörü tespit edilmiş ve insülinin osteoblastlarda nükleotid sentezini, hücre proliferasyonunu ve kollajen sentezini stimüle ettiği, IGF-I'in kollajen sentezi ve hücre proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (64-70). Ayrıca yapılan bir çalışmada insülin eksikliğinde kalsifikasyon/ossifikasyonda azalma olduğu bildirilmiştir (71).

Bunların yanında diyabetiklerde Ca atılım bozuklukları, duodenal Ca malabsorbsiyonu, D vitamini metabolizma bozuklukları, düşük PTH konsantrasyonu Ca homeostasisini bozarak kemik döngüsünü azaltarak sonuçta osteopeniye neden olur (72-76).

İnsülinin osteoblastlar üzerine stimüle edici etkisi vardır ve insülin eksikliği, osteoblast sayısında azalma, osteoid formasyonunda azalma ve hücresel disfonksiyon ile sonuçlanır (78,79,80). Yapılan retrospektif bir çalışmada elektif artrodez yapılan DM'lu hastalarda geç kaynama, kaynamama ve psödoartroz oranının arttığı görülmüştür (2).

Diyabette serbest oksijen radikalleri (SOR) artar (81). Fizyolojik şartlarda osteoklastların kemik resorpsiyonu için SOR gereklidir (82). Antioksidanlar verilerek yapılan çalışmalarda kemik formasyonu ve mineral apozisyonunda artış olduğu görülmüştür (83,84).

2.8.4 Deneysel Diyabet Modelleri

Çeşitli hastalıkların patogenezinin anlaşılması, hastalıktan korunmanın ve tedavi olanaklarının incelenmesi için deneysel hayvan modellerinin kullanımı yaygındır. Çevresel faktörlerin etkilerini belirlemek için kontrollerin kullanılabilmesi, araştırılan patolojiye uygun hayvan türlerinin genetik olarak seçilebilmesi, anlamlı istatistiksel değerlendirme yapmaya izin verecek sayıda örnekte çalışılabilmesi, hayvan modelleri ile çalışmayı rasyonel hale getiren temel faktörlerdir. İlaç araştırmalarında in vivo deneylerin bir bölümü, eğer varsa, insandaki hastalığı temsil eden hayvan modelleri üzerinde yapılır. Bu

modellerden bazıları (spontan hipertansif sıçan modeli gibi) insandaki hastalığa patolojik özellikleri bakımından benzerse de o hastalığı tam olarak temsil ettiği kesin olarak söylenemez (85).

Deneysel diyabet modelleri:

1. Spontan diyabet
2. Kimyasal diyabet: Alloksan ya da streptozosin kullanılır. Pankreas beta hücre harabiyeti sonucu diyabet oluştururlar
3. Viral diyabet
4. Cerrahi diyabet: Pankreasın çıkarılması ile oluşturulur.

2.8.4.1 Streptozotosin (streptozocin, STZ)

N-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine yapısındadır, ışıktan korunmalıdır. Nötral pH'da hızla dekompoze olduğundan optimum stabilitesi için ortamın pH'sı 4-4.5 olmalıdır. Bu nedenle STZ çözündürülürken sitrat tamponu kullanılmalıdır. Pankreas β hücrelerini hasarlayarak hem insüline bağımlı hem de insülininden bağımsız diyabete neden olmaktadır (86). Yetişkin sıçanlarda tek doz (40-60 mg/kg) damar içi yolla STZ uygulamasının insüline bağımlı diyabete , yeni doğmuş sıçanlara tek doz periton içi veya damar içi yolla 100 mg/kg STZ uygulamasının ise insülininden bağımsız diyabete neden olduğu bildirilmiştir (87,88).

Streptozotosin kullanıldığında karaciğerde glikojenin ani yıkımına bağlı olarak ilk iki saat içinde kan glikoz seviyesi geçici olarak yükselir. Hiperglisemik dönemde plazma insülin düzeyleri düşüktür. Hepatik glikojen yıkımının, epinefrin salıverilmesinin bir sonucu olabileceği düşünülmektedir ve bunu engellemek için STZ uygulamadan bir gece önceden deney hayvanlarının aç bırakılması önerilir. Yaklaşık uygulamadan 6 saat sonra başlayan ikinci faz şiddetli hipoglisemi ile karakterizedir. Hipoglisemi, beta hücrelerinin ölümüyle birlikte aşırı miktarda insülin salınımına bağlıdır. Bu dönemdeki hipoglisemiye bağlı kayıpları önlemek için uygulamadan 2 saat sonra 12 saat boyunca dekstrozu sıvı başlanmalıdır. Üçüncü ve son dönem ise yaklaşık 6-10 saat sonra başlar ve kalıcı hiperglisemi dönemidir (89,90).

2.9.Serbest Oksijen Radikalleri:

Atomlarda elektronlar “orbital” adı verilen uzaysal bölgede ve çift olarak bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki moleküller ise tek yani eksik elektronludur. Eksik elektronlu bu moleküller bulabilecekleri herhangi bir elektron ile iletişime girerek, bu molekülden ya bir elektron alır, ya da ona bir

elektron verirler. Fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere “serbest radikaller”, “oksidant moleküller” veya en doğru adlandırma ile “reaktif oksijen partikülleri” denmektedir. Bunların en önemlileri süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^-) radikalleridir. Serbest radikaller; aktive olmuş fagositler, antineoplastik ajanlar, radyasyon, alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar ve stres, küçük moleküllerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler, mitokondrial elektron transport sistemleri, peroksizomlar, plazma membranı ve oksidatif stres yapıcı durumlardan kaynaklanabilir (91-94).

Enflamatuvar hastalıklarda, lokal inflamasyonda, normal yara iyileşmesinde, iskemi ve reperfüzyonda, iyonizan radyasyon ve herbisit etkileriyle toksik miktarda serbest radikaller oluşmaktadır (93,95-97).

Kimyasal yapısı daha basit olan serbest radikallerin ömürleri de daha kısadır. Kompleks radikaller daha uzun ömürlü ve daha stabildirler. Serbest radikaller homoliz ya da elektron transfer tepkimeleriyle oluşabilirler. Bu süreçler genellikle, radyasyon (iyonize, ultraviyole, termal) emilimi ya da enzimatik olmayan elektron transferleri ve enzimlerin katalizlediği süreçler gibi redoks tepkimeleriyle ilerler (98).

Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikallerin çoğu oksijene dayanır. Hücreler hasta veya yaşlı olduğu zaman çok miktarda serbest radikal üretir. Postiskemik dokuda serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açan iki kaynak vardır. Birincisi, hipoksantin ve moleküler oksijen ile ksantin oksidaz enziminin reaksiyon zinciridir. İkincisi ise iskemik doku içine nötrofillerin infiltrasyonudur (99,100,101). Oksijenin elektron yapısı, molekülün kendisini düşük reaktiviteye sahip bir radikal yaparken aynı zamanda başka serbest radikalleri oluşturmaya elverişli kılar. Oksijen, dış elektron kabuğunda farklı yörüngelerde iki adet eşlenmemiş elektrona sahiptir. Bu elektronların dönüş yönü birbirine paralel olduğu için aynı yörüngede yer alamamaktadırlar. Termodinamik açıdan bakıldığında oksijen reaktif bir molekül olmakla birlikte; eşlenmemiş elektronları, organik moleküllerin kovalent bağlarında bulunan eşlenmiş elektronlarla hızlı bir şekilde tepkimeye giremez. Bunun sonucu olarak, metal içeren enzimler gibi bir katalizörün gerektiği tepkimelerde, yavaş bir şekilde tek elektronlar kabul ederek tepkimeye girebilir (102,103).

Normal aerobik metabolizmanın bir yan ürünü olarak oluşan serbest radikaller birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynarlar; yani hücrelerin bazı işlevlerini sürdürebilmeleri için ortamda bulunmaları gereklidir. Yine normal koşullar altında biyolojik sistemler, bu reaktif radikalleri etkisizleştirme yeteneğine sahiptirler. Uygun hücresel homeostazın korunabilmesi için reaktif oksijenlerin üretimi ve tüketimi arasında bir denge mutlaka olmalıdır. Ancak

bazı patolojik durumlarda serbest oksijen radikallerinin üretimi artar. Hücrel savunma sistemlerinin etkisizleştirebileceğinden daha fazla reaktif radikal oluşur. Hücrel savunma sistemleriyle serbest oksijen radikali oluşumu arasındaki dengenin radikal oluşumundan yana kayması oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (104).

Oksidatif stresin, malign hastalıklar, diyabetes mellitus, ateroskleroz, kronik enflamasyon, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, HIV enfeksiyonu, iskemi–reperfüzyon yaralanması, uyku apnesi gibi birçok klinik tablonun gelişiminde, yaşlanmanın etiyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir (105-113).

Serbest radikaller hücrelerin protein, DNA, karbonhidrat, lipidler, enzimler ve diğer molekül grupları ile reaksiyona girerek onların metabolizmalarını etkilerler. Ekstrasellüler matrikste hyaluronik asit ve kollajen yapısında değişiklik meydana getirerek dokularda hasara neden olurlar. Membran yapısında yer alan fosfolipidlerdeki poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonu ile doğrudan hücrelere zarar vermektedirler. Ayrıca lizozom ve mitokondrileri çevreleyen zarların permeabilitesini artırarak parçalamaktadırlar (91,94,114,115,116).

2.9.1.Kırık iyileşmesi Üzerine Serbest Radikallerin Etkisi

Serbest oksijen radikallerinin kemik metabolizması üzerine etkisi fizyolojik ve patolojik durumlarda çift yönlü olabilmektedir. Fizyolojik durumlarda osteoklastlar tarafından üretilen serbest radikaller, kalsifiye dokunun yıkımını arttırır ve böylelikle kemiğin remodelasyonuna katkı sağlarlar (117,118,119).

İskemi–reperfüzyon yaralanması, üzerinde çok fazla çalışılmış bir konudur; travma, şok, sepsis, kardiyovasküler cerrahi ve organ transplantasyonunda gözlenen organ disfonksiyonlarının patofizyolojisinden sorumlu tutulmaktadır. Bir organa giden kan akımının durmasıyla, yani iske miyle başlayan biyokimyasal olaylar zinciri, organın yeniden kanlanmasıyla, yani reperfüzyonla reaktif oksijen radikali üretiminde bir artışa yol açar. Bu radikallerin yol açtığı oksidatif hasarlanma, iskemi–reperfüzyon yaralanmasının temelini oluşturmaktadır. Kırık olduğu zaman kırık bölgesinde arteriyel vazokonstriksiyon gelişmektedir. Bunu takiben geçici bir iskemik periyot, arteriyel vazodilatasyon ve kırık bölgesinde reperfüzyonda bir artış olmaktadır (120,121,122,123).

Kırık iyileşmesi için çok önemli olan inflamasyon fazında (ilk beş gün) lökosit, makrofaj ve mast hücreleri gibi inflamatuvar hücreler kırık bölgesine

ulaşmaktadır. Polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu ile üretilen serbest oksijen radikallerinin granülasyon dokusunu bozduğu, yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmektedir (120,121,123).

Serbest oksijen radikallerinin yol açtığı hücre hasarlanmasının en iyi göstergelerinden biri lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunun osteoklastları direkt olarak aktive ederek kemik rezorpsiyonunu artırdığı bildirilmektedir. Lipid peroksidasyonunun belirteci olarak da malondialdehit (MDA) düzeyleri kullanılmaktadır. Yüksek MDA düzeyleri, yüksek serbest oksijen radikali konsantrasyonuna işaret etmektedir. Kırığın iyileşme sürecinde serbest oksijen radikali üretiminde bir artış olduğu, kan ya da kemik dokularında MDA düzeylerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (124,125,126).

Yapılan çalışmalarda E vitamininin antioksidan özelliği nedeniyle kemik rezorpsiyonu ve kaybını azalttığı, besinlerde yetersiz vitamin E bulunan ratlarda kalsiyum emiliminin ve kemiklerdeki kalsiyum depolanmasının azaldığı, serbest radikal toplayıcısı olan Vitamin C'nin kemik mineral dansitesinde yararlı etkiler gösterdiği bildirilmiştir (84,127,128,129).

2.9.2.Diyabet ve Oksidatif Stres

Diyabette meydana gelen oksidatif stresi başlatan etmen hücre içi ve dışı glikoz konsantrasyonunun artmasıdır. Hayvanlarda oluşturulan deneysel diyabette ve diyabet hastalarında, oksidatif stres oluşturan birçok mekanizmadan söz edilmektedir. Genel olarak kabul edilen görüş diyabette görülen hipergliseminin, glikoz oksidasyonuna, proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonuna ve poliyol yolunu içine alan kompleks mekanizmalar sonucu serbest radikallerin oluşmasına neden olduğudur (130-133).

Glikoz otooksidasyonu, geçiş metallerinin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda glikozun kısmen radikal olan anyonlarını oluşturması ile meydana gelir. Bu radikaller, O_2 'yi indirgeyerek süperoksit (O_2^-) anyonunu meydana getirirler. Bu da diğer SOR'lerin oluşumunu tetikler. Proteinlerin glikolizasyonu, glikozun proteinlerin amino grubuna bağlanmasıyla başlar. Bunun ardından bir seri kimyasal modifikasyon geçirerek, daha kararlı bir yapı olan protein-glikoz kompleksine dönüşür. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda oluşan glikolize proteinler ise Cu ve Fe varlığında O_2 'ye elektron vererek SOR'lerin oluşmasına neden olurlar (134,135).

Oksidatif stresin diğer bir hedefi, insülin sentezinden ve salgılanmasından sorumlu olan β hücreleridir (137). β hücrelerinin disfonksiyonunun yüksek kan glikoz düzeyine veya serbest yağ asitlerinin artmasına ya da kombinasyonlarına bağlı olduğu bildirilmektedir (136). Oksidatif stres düzeyindeki artışın, hücrede

SOR üretiminin artmasına ve buna bağlı olarak da toksikasyona neden olduğu ifade edilmektedir (136,138).

Diyabette, serbest radikallerin artışı ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin azalması, yalnızca hücresel organellerin ve enzimlerin hasarına değil, lipid peroksidasyonunun artmasına ve insülin reseptörlerinin insuline karşı duyarlılıklarının azalmasına neden olmaktadır (132). β hücrelerinin SOR'ne karşı duyarlı olmalarının nedeni; SOD, GSH-Px ve CAT gibi önemli antioksidan enzimler bakımından yetersiz olmalarıdır. SOR nedeniyle artan lipid peroksidasyonu Langerhans ada hücrelerindeki glikozun oksidasyonunu artırır, insülin salınımını ve insülin mRNA'sının transkripsiyon faktörüne bağlanmasını inhibe eder (136).

Yapılan çalışmalar diyabetle beraber artan SOR üretiminin antioksidan savunma sistemini baskılayarak, enzim sistemlerinde değişikliklere neden olduğunu, buna bağlı olarak da endotelial, vasküler ve nörovasküler disfonksiyonlar meydana getirdiğini açıkça göstermektedir. Gerek diyabetli kişiler, gerekse deneysel olarak diyabet oluşturulan deney hayvanları üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada, antioksidan karotenoidler, çeşitli vitaminler (vitamin C, E) aspirin, stobadin ve çeşitli bitkisel ekstraktların da içinde yer aldığı değişik ajanlar kullanılmıştır (131,139-142).

2.10. Antioksidan Savunma Sistemleri:

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için vücut antioksidanlar olarak bilinen birçok savunma sistemi geliştirmiştir. Bunlar antioksidanlar olarak bilinirler. Enzimatik aktiviteye sahip olmaları ya da olmamalarına, suda ya da yağda çözünmelerine, endojen ya da eksojen kaynaklı olmalarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (111,143).

Antioksidanlar dört ayrı mekanizma ile etki gösterirler (143,144,145):

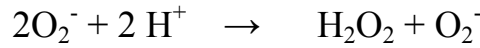
1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme; antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
2. Bastırıcı etki: SOR ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme; vitaminler, flavonoidler.
3. Zincir kırıcı etki: SOR'ni bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme; hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller.
4. Onarıcı etki: SOR'nin oluşturduğu hasarı onarıcı etki gösterirler.

Antioksidanlar endojen ya da eksojen kaynaklı olabilirler. Endojen antioksidanlar da enzim ve enzim olmayanlar olarak iki gruba ayrılır:

2.10.1 Enzimatik Etkiye Sahip Endojen Antioksidanlar

1. Süperoksit Dismutaz (SOD):

SOD enzimi vasküler endotelde bulunan en önemli antioksidan enzimlerden birisidir ve endotel hücreleri ile düz kas hücreleri arasında bol miktarda bulunur. Normalde damar duvarında süperoksit radikallerini detoksifiye ederek lipid peroksidasyonunu ve ateroskleroz gelişimini önler. Hücrede serbest oksijen radikalleri oluşurken ilk basamakta O_2^- meydana geldiği ve SOD enzimi bu radikalın dismutasyonunu sağladığı için, hücre içindeki ilk savunma sistemini bu enzim oluşturmaktadır (146-149).



Tablo 3 : Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi

Enzimatik	Nonenzimatik	
• Süperoksit dismutaz (SOD) • Katalaz • Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) • Fosfolipid hidroperoksit glutasyon Peroksidaz (PLGSH-Px) • Glutasyon S-transferaz (GST) • Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	• Glutasyon (GSH) • α-Tokoferol (vit E) • Askorbat (vit C) • β-Karoten • Flavonoidler • Ürat • Bilirubin	• Albumin • Seruloplazmin • Transferrin • Ferritin • Laktoferrin • Melatonin • Sistein

Süperoksit anyonunun üretimi ile serbest radikal reaksiyonları tetiklenir. SOD hücrel kompartmanlardaki O_2^- düzeylerini kontrol altında tutar. Bu enzimlerin aktif merkezlerinde bulunan aminoasitlerin çeşitliliği, kofaktör ve diğer bazı özelliklerine göre farklı izoformları bulunmaktadır. Mitokondriyal SOD' ın kofaktörü mangandır. Sitoplazmik SOD aktivitesi için bakır, stabilite için çinkoya ihtiyacı vardır. Ekstrasellüler SOD' ın kofaktörleri de yine bakır ve çinkodur (150).

2. Katalaz:

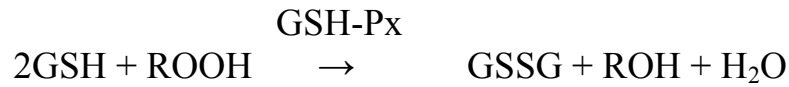
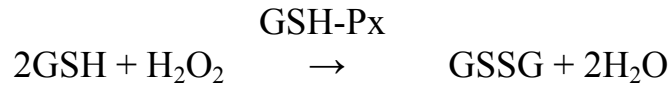
Hücrelerin peroksizomlarında yer alır. Eritrositlerin sitoplazmasında ve hepatositlerin mitokondrisinde bulunur. H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'e çevirerek etkisiz

hale getirir. Karaciğer ve eritrositler katalazın en yüksek aktiviteye sahip olduğu yapılardır. KAT hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalar. Hidrojen peroksitin yanı sıra metil-, etil-hidroperoksitler gibi küçük moleküllu lipid hidroperoksitleri de indirger (151,152).



3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) :

GSH-Px antioksidan enzimlerin en aktif olanıdır. Hücre içi hidroperoksitleri yok etmekle sorumludur (151). H_2O_2 'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür. Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (153,154).



Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Ayrıca sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGSH-Px membranın peroksidasyonuna karşı korunmasını sağlar (155).

2.10.2.Enzimatik Etkisi Olmayan Antioksidanlar

1. C Vitamini (askorbik asit) :

Suda eriyen bir vitamin olan askorbik asit hücre dışındaki en önemli antioksidandır. Çok güçlü bir indirgeyici olan C vitamini; süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hipoklorik asidi indirger. Aktif nötrofil ve monositlerden kaynaklanan oksidanları nötralize eder. Lipit peroksidasyonu başlamadan önce sulu ortamdaki peroksil radikalleriyle direkt olarak reaksiyona girerek membranları peroksidatif hasardan korur. LDL oksidasyonunu önler ve elektronları membrandaki E vitaminine transfer eder. Oluşan E vitamini radikalini redükte ederek E vitamininin yeniden kullanılabilmesini sağlar.

Ayrıca, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller (156,157).

2. E Vitamini (tokoferol) :

Vitamin E, tokoferol yapısında olup α , γ , δ , β , olmak üzere dört farklı tipin karışımı şeklinde bulunabilir ve yağda çözünür özelliğe sahiptir. α -tokoferol doğal dağılımı en geniş ve biyolojik aktivitesi en fazla olanıdır. En yüksek E vitamini konsantrasyonu mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Hücre ve organel zarları arasına girer ve serbest radikalleri daha az reaktif bileşiklere çevirerek zarları lipid peroksidasyona karşı korur. Zar fosfolipidleri yapısında bulunan araşidonik aside bağlanarak etkisini gösterir. Kolayca okside olarak diğer hassas moleküllerin istenmeyen oksidasyonunu önler. E vitamini hücre zarında bulunan doymamış yağ asitlerini koruyarak hücrenin yaşamının devam etmesini sağlar (91,116,120,123,158,159).

2. A Vitamini (β -karoten) :

Beta karoten retina gibi bazı dokuların membranlarında yüksek konsantrasyonlarda birikebilir. Serbest radikallerle direk reaksiyona girer. E vitamini ile sinerjik etki gösterir. Malonildialdehit oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu inhibe eder (160).

2.11. Selenyum :

Selenyum (Se), periyodik tabloda VI A alt grubunda yer alan bir elementtir ve aynı grupta yer alan sülfür ile kimyasal özellikleri büyük benzerlik gösterir. Selenyum havada ve suda erimiş olarak, ayrıca toprak ve kayalarda katı halde bulunur. Böylece buralardan bitkilere, mantarlara, bakterilere ve insanlara geçer, sonra tekrar doğaya döner (161).

Kandaki selenyum konsantrasyonu 60-100 μ g/l dır. Bir insanın günlük ihtiyacı 50-70 μ g'dır. Başta karaciğer ve böbrek olmak üzere insanın tüm dokularında bulunmaktadır. Selenyum yiyeceklerde esas olarak selenometionin, metilselenometionin, selenosistin ve selenosistein gibi organik bileşikler halinde bulunur ve selenyumun dışarıdan alındığı durumlarda, kullanılan bileşiğinin sodyum selenit (Na_2SeO_3) olması nedeniyle, özellikle deneysel selenyum çalışmaları selenit metabolizması üzerinde yoğunlaşmıştır (162).

Selenyum bazı metabolik hastalıkların ve kanser türlerinin önlenmesinde rol oynayan antioksidan özellikteki GSH-Px enziminin yapısında bulunur. Selenyumun biyolojik önemi bu enzimin bir ko-faktörü olmasından

kaynaklanmaktadır. Her alt ünitesinde selenosistein şeklinde bir adet selenyum atomu içeren GSH-Px, hücre içinde hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya indirgenmesinde rol oynamaktadır. Selenyum, E vitamini ile etkileşerek lipid metabolizması sonucu oluşan peroksitlerin neden olduğu oksidatif hasarlardan hücre membranını korumaktadır (163).

Önceleri toksik ve karsinojen özelliğiyle bilinen selenyum, yapılan son çalışmalar sonucunda biyolojik sistemler için önemli ve faydalı bir element olarak değerlendirilmiştir. 1957 yılında selenyumun hayvanlar için önemli bir eser element olduğunun bulunmasının ardından, deneysel olarak oluşturulan karaciğer tümörlerinin Se verilmesiyle tümör insidansında % 50 oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir (164).

Tiroid bezinde, selenoproteinler uzun ömürlü hücrelerin oluşturduğu hidrojen peroksit (H_2O_2)'e karşı koruyucu etkisi ile tiroid hormonlarının sentezine katkı sağlar. Bu yüzden de tiroid bezinde selenyum bol miktarda bulunur (165).

Son yapılan çalışmalar selenyumun immün sistemin tüm hücrel ve humoral komponentlerini etkilediğini göstermiştir (166,167,168). İnsanlarda düşük selenyum düzeylerinde natural kiler hücrelerde azalma olduğu (169) ve selenyum verilmesiyle T-lenfosit kaynaklı tümör lizis ve lenfosit proliferasyonunu artırdığı görülmüştür (170). Ratlarda selenyum eksikliğinde Ig A, M ve G düzeylerinde azalma, hücre kültürlerinde selenyum eksikliğinin lenfositlerde azalmış proliferasyona ve insanlarda nötrofil fonksiyon bozukluğu olduğu gösterilmiştir (166).

Selenyum eksikliği bulunan Çin'in kuzey bölgelerinde düşük selenyum alımı ve Cocksackie virus B birlikteliği tespit edilmiş, bir endemik kardiyomiyopati olan Keshan Hastalığı tanımlanmıştır (171). Kontrol grubu ile yapılan bir çalışmada selenyum eklenen grupta anlamlı olarak hastalığa yakalanma ve ölüm oranlarında azalma olduğu görülmüştür (172).

Selenyum eksikliğinde görülen diğer bir hastalık da dünyanın selenyumdan fakir bölgeleri olan kuzeydoğu ve güneybatı Çin, Sibiry ve Kuzey Kore'de sık görülen endemik, kronik ve dejeneratif osteoartropati ile seyreden Kashin-Beck Hastalığıdır (171). Eklem ve büyüme plağı kondrositlerinin selektif nekrozu ile karakterizedir. Multiple dejeneratif ve nekrotik lezyonlar, büyüme geriliği görülür (6). Yapılan bir çalışmada kemikteki tip I kollajen ve kırıkardaki tip II kollajende lizin rezidülerinin üst üste gelerek irregüler kemik formasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (5).

Yapılan çalışmalarda selenyumdan fakir diyet verilen gruplarda kontrol gruplarına oranla kemik biyomekanik kuvvetinde ve mineral dansitesinde kontrol grubuna göre azalma olduğu rapor edilmiştir (7,173).

Selenyum eksikliğinden çok az görülmekle birlikte fazla selenyum alındığında toksisite görülebilir (174). Kırılgan saçlar, kırılgan, tabaka halini almış ve bazen kaybedilen tırnaklar, nefeste ve ciltte sarımsak kokusu görülür. Akut zehirlenmelerde kusma ve pulmoner ödem olabilir (174,175).

2.11.1. Selenyumun Glikoz Metabolizması Üzerine Etkileri

Selenyumun fizyolojik olarak birçok insülin benzeri etkileri vardır. Bu etkileri hücrelerde glikoz transportunu, cAMP fosfodiesteraz aktivitesini ve ribozomal S6 protein fosforilasyonunu stimüle ederek yerine getirir. İnsüline benzer şekilde hücre membranlarında glikoz transportunu sağlayan GLUT-1 ve GLUT-2 proteinlerinin transkripsiyonunu uyarır (9). STZ ile deneysel diyabet oluşturulan ratlarda glisemik kontrolü sağlamış ve karaciğerde glikoliz ve glikoneogeneze sorumlu enzimlerin aktivitelerini düzenlediği görülmüştür. Bu etkileri insülin düzeylerinden bağımsız olarak yerine getirmiştir. Selenyum, glikoz metabolizması üzerindeki bu insülin benzeri etkilerini insülinin sinyal yolu üzerindeki tirozin kinazı stimüle ederek yerine getirir. (8,9,176-180).

Selenyum IGF-I'in biyoaktivitesi için önemlidir. Bir çalışmada selenyum alımı ile IGF-I aktivitesi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. IGF-I protein sentezi ve hücre proliferasyonunu artırır, apoptozisi inhibe eder (181,182).

Yapılan çalışmalarda selenyum verilen diyabetik ratlarda glikoz toleransı, kardiyak fonksiyonu, renal fonksiyonu ve artmış renal hasarı düzelttiği gösterilmiştir (179,183,184).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız deneysel bir çalışma olup Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulunun 04.05.2011 tarih ve 2011/09 sayılı onayı ile Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada ağırlıkları 200-250gr arasında 45 adet 3 aylık Wistar rat kullanıldı. Denekler, ortama alışmaları için çalışmaya başlamadan önce, bir hafta boyunca standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz - 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 24 ±2 derece oda ısısı, % 50–60 nem) tutuldu ve ihtiyaçları kadar su ve yem verildi. Her üç gruptan üçer denek çalışma sırasında telef oldu.

3.1.Çalışma Grupları:

Üç ayrı ana grup oluşturuldu. Her grup daha sonra histopatoloji ve biyomekanik olarak 2 gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=15) : Kontrol Grubu

Grup 2 (n=15) : Diyabet Grubu

Grup 3 (n=15) : Diyabet + Selenyum Grubu

3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması:

2.ve 3. gruplara diyabet oluşturmak için çalışmanın başında ilk 2 saatte oluşacak hiperglisemiden korumak için 12 saat aç bırakıldıktan sonra sitrat tamponda (pH 4.5) çözülerek hazırlanmış tek doz streptozotosin (Sigma-Aldrich®) 60mg/kg intraperitoneal olarak verildi. İşlem sonrası hipoglisemi oluşmaması için %10 glikoz solüsyonu 24 saat boyunca verildi. 72 saat sonunda kuyruk venlerinden alınan kan örnekleri glikometre (Accu-chek Go, İsviçre) ile ölçüldü. Ölçülen glikoz değerleri >250mg/dl olanlar diyabetik olarak kabul edildi.

3.3. Kırık Modelinin Oluşturulması:

Diyabet oluşturulduktan 1 hafta sonra tüm gruptaki deneklere i.m. Ketamin (40-90 mg/kg) ve Buprenorphin (0.45mg/kg) ile anestezi ve analjezi sağlandıktan sonra her bir rat için uygun dezenfeksiyon sağlandıktan sonra sol tibia anteromedialinden longitudinal cilt insizyonu sonrası dikkatli bir şekilde yumuşak dokular geçildi. Ossile testere yardımı ile tibia orta diyafizi seviyesinden transvers osteotomi yapılarak kırık oluşturuldu. 0,045 inch

Kirschner teli intramedüller olarak önce proksimale gönderildi, sonra kırık redükte edildikten sonra proksimalden distal fragmana gönderilerek fiksasyon sağlandı. Yıkama ve povidine-iodine ile temizlendikten sonra cilt 4/0 prolene ile kapatıldı. Postoperatif redüksiyon ve Kirschner tellerinin pozisyonunu değerlendirmek için radyografik görüntüleri alındı. Preop ve postop profilaksi için sefazolin sodium 20 mg/kg 2x1 72 saat, postop 2 gün analjezi için Buprenorphine 0.45mg/kg 2x1 im olarak uygulandı.



Resim 1: Tibia anteromedialindeki cilt insizyonu



Resim 2: Yumuşak dokulardan sıyrılmış tibia



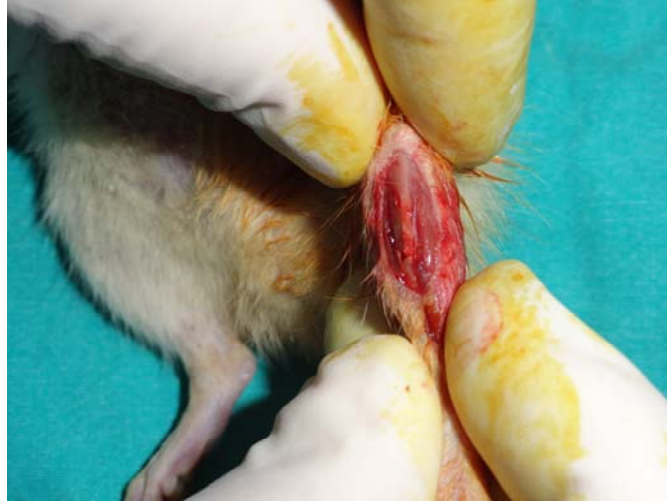
Resim 3: Tibia diafizinde yapılan osteotomi



Resim 4: K telinin intramedüller olarak gönderilmesi



Resim 5: İntramedüller gönderilen K telinin distal fragmana ilerletilmesi



Resim 6: Redüksiyon sonrası görüntü



Resim 7: Cilt kapatıldıktan sonra görüntüsü

3.4.Selenyumun Hazırlanması ve Uygulanması :

0,1 cc'de 2mg sodyum selenit olması için öncelikle 600 mg soyum selenit tartılarak 30cc izotonikte çözelti haline getirildi. Daha sonra bu çözeltiden 3 cc (60mg selenyum içeriyor) alınarak 30cc'ye tamamlanarak 1/10 oranında sulandırıldı. Böylece 1cc'de 2mg 0.1 cc'de 0.2 mg sodyum selenit elde edildi.

Grup 2 ve 3'e STZ ile deneysel diyabet oluşturup her grupta tibia kırığı oluşturduktan sonra 3. gruba günde bir kez 6 hafta boyunca intraperitoneal olarak insülin enjektörü ile 0.1 cc 10 mg/kg selenyum enjeksiyonu yapıldı.

Her 3 gruptan da üçer denek anestezi sonrası ölüm ve enfeksiyon nedeniyle çalışmadan çıkartıldı

3.5 Deneyin Sonlandırılması:

Deneyin 6. haftası bittiğinde yüksek doz eter inhalasyonu ile tüm denekler sakrifiye edildi. Altıncı hafta radyografileri çekildikten sonra tüm ratların tibiaları çıkartılarak yumuşak dokulardan sıyrıldı ve %10'luk formol içine konuldu.

3.6.Sonuçların Değerlendirilmesi:

3.6.1 Radyolojik Değerlendirme

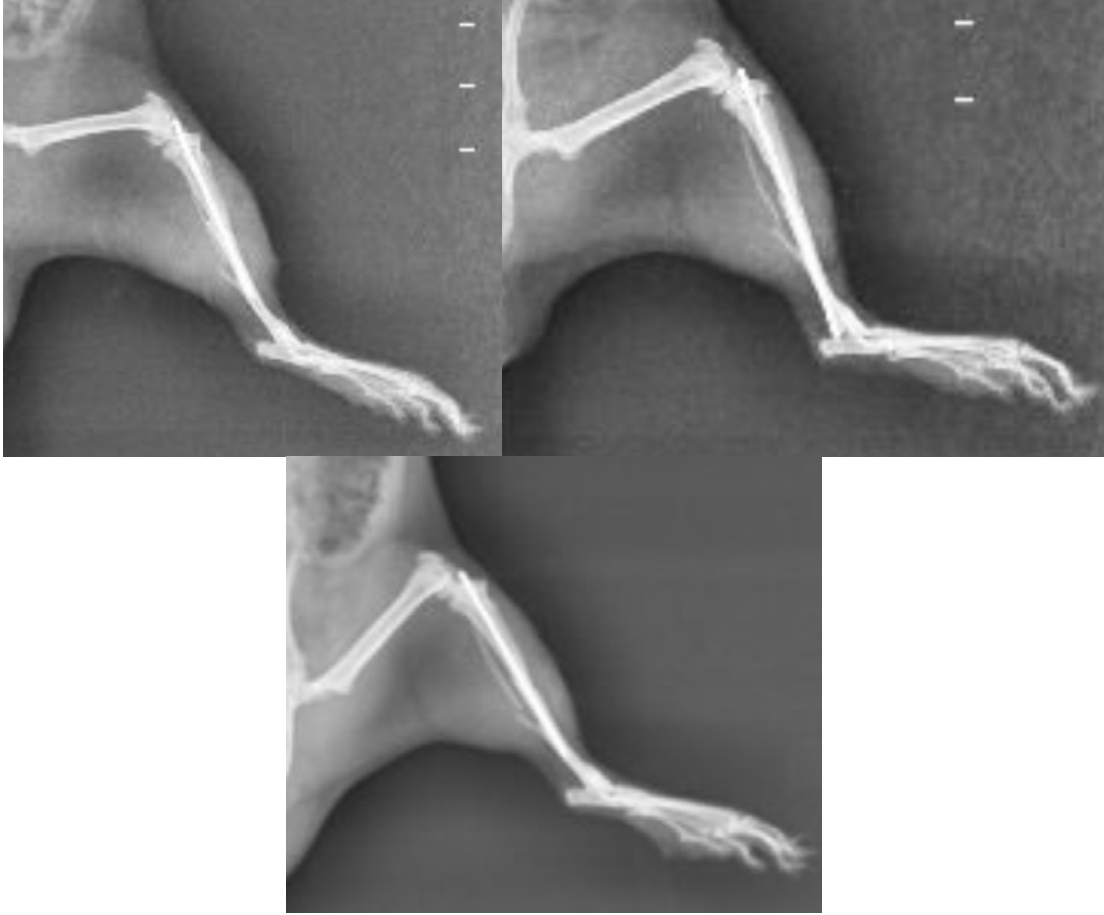
Radyolojik değerlendirme, her üç grubun da kırık modeli oluşturulduktan sonra redüksiyon ve fiksasyonun değerlendirilmesi için 0. gün, 20mg/kg İM ketamin ile anestezi sağladıktan sonra 3. haftada ve 6. hafta sonunda ratlar sakrifiye edildikten sonra çekilen direk radyografileri (Siemens, Model no: 4803404, Germany) ile yapıldı. Sonuçlar Goldberg sınıflamasına göre değerlendirildi (185).

Bu sınıflamaya göre:

Grade 1= Kaynamama

Grade 2= Kısmi kaynama/şüpheli kaynama

Grade 3= Tam kaynama şeklinde değerlendirildi.



Resim 8: Cerrahi işlem sonrası direk grafi görüntüleri

3.6.2 Histopatolojik Değerlendirme

Deney 6. haftada sonlandırıldıktan sonra tüm deneklerin radyografileri çekilerek histopatolojik incelemeye alınacak olan gruptaki ratların tibiaları yumuşak dokulardan temizlendikten sonra %10'luk formol içinde fiske edilerek 4 gün sonra dekalsifikasyon için % 10'luk formik asit içine alındı. 10 gün süreyle dekalsifikasyon için bekletildi. Dekalsifiye parçalar rutin doku takibinden geçirildikten sonra hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 -7 mikron kalınlığındaki seri kesitler hematoxilen–eozin yöntemiyle boyanıp ışık mikroskopunda incelendi. Doku mikrografları dijital fotoğraf makinesi bağlantılı binoküler araştırma mikroskobu ile patoloji uzmanı tarafından değerlendirildi. Tüm preparatlar fibröz doku, kıkırdak, yeni kemik ve olgun kemik oranlarına göre Huo ve arkadaşlarının önermiş olduğu skala ile değerlendirildi (186). Bu skalaya göre:

- | | |
|----------|---|
| Grade 1: | Fibröz doku |
| Grade 2: | Ağırlıklı fibröz doku, az miktarda kıkırdak |

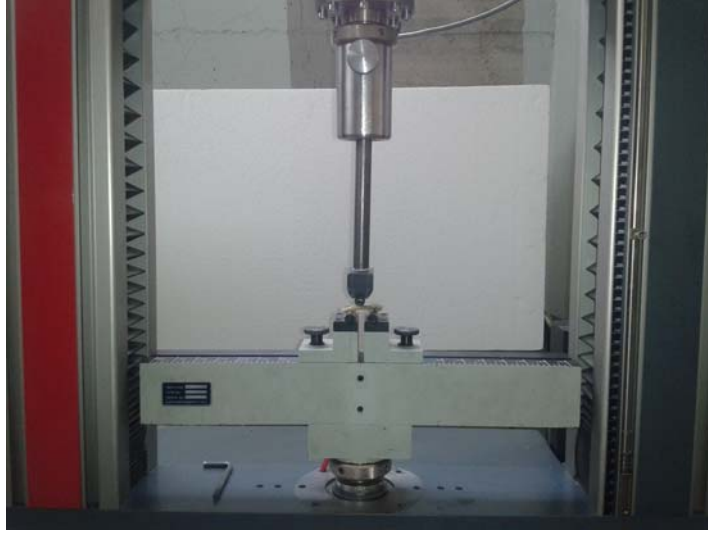
Grade 3:	Eşit oranda fibröz ve kıkırdak doku
Grade 4:	Ağırlıklı kıkırdak, az miktarda fibröz doku
Grade 5:	Kıkırdak doku
Grade 6:	Ağırlıklı kıkırdak, az miktarda immatür kemik
Grade 7:	Eşit oranda kıkırdak ve immatür kemik doku
Grade 8:	Ağırlıklı immatür kemik, az miktarda kıkırdak doku
Grade 9:	İmmatür kemik ile kırık iyileşmesi
Grade 10:	Matür kemik ile kırık iyileşmesi

3.6.3 Biyomekanik Değerlendirme

Biomekanik değerlendirme için ratlar 6. haftalarda sakrifiye edildikten sonra tibialar ayrılarak çevresindeki yumuşak dokular iyice temizlendi. İntramedüller tesbit için gönderilen Kirschner telleri proksimal uçtan çıkarıldı. Sonrasında tibialar üç nokta bükme testi uygulamak amacıyla, uzama kontrollü olarak çalışan, iki nokta arasında 21 mm uzaklık olacak şekilde, 2 mm/dk hızla hareket ederek uygulanan kuvveti bilgisayar ekranına grafiksel ve sayısal olarak aktarabilen 20 kN (kiloNewton)'luk biyomekanik test cihazına (Zwick/Roell, Z020, Germany) yerleştirildi. Kallus bölgesine kuvvet uygulanarak her grubun elemanlarının bükülmeye karşı direnç kuvvetleri Newton cinsinden ölçülüp karşılaştırıldı.



Resim 9: Zwick/Roell Z020 marka biyomekanik test cihazı



Resim 10: Biyomekanik cihazının üç nokta bükme testi yapan parçası

3.7.İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel analizler SPSS (version 15.0 for Windows, Chicago,IL,USA) programı kullanılarak yapıldı. Karşılaştırmalar ve değerlendirmeler yapılırken Chi-Square test, Cramer's V test ve ANOVA test kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

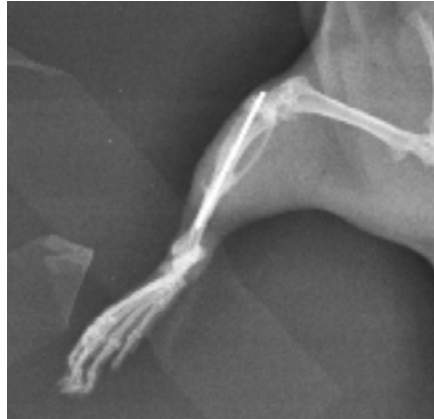
4. BULGULAR

4.1 Radyolojik Bulgular:

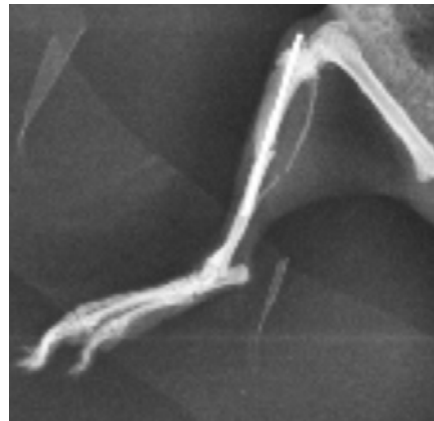
Tüm hayvanlar 3. hafta ketamin ile anestezi sağlandıktan sonra ve 6. Hafta sonunda sakrifiye edildikten sonra direk grafileri çekildi. Goldberg sınıflamasına göre kaynamama=1, kısmi kaynama=2 ve tam kaynama=3 olarak puanlama yapıldı.

Tablo 4: Üçüncü hafta radyoloji sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grup I	2	3	1	2	1	2	3	2	3	2	2	1
Grup II	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1
Grup III	1	1	2	2	3	1	1	2	3	2	3	2



Resim 11: Grup I 3. hafta grafisi



Resim 12: Grup II 3. hafta grafisi



Resim 13: Grup III 3. hafta grafisi

Tablo 5: Üçüncü hafta radyografi yüzde ve frekanslar

			veriler			Total	p
			1,00	2,00	3,00		
Gruplar	D	sayı	8	8	0	16	
		% grup içi	50,0%	50,0%	0,0%	100,0 %	
	K	sayı	3	12	9	24	
		% grup içi	12,5%	50,0%	37,5%	100,0 %	0.014
	S	sayı	4	10	9	23	
		% grup içi	17,4%	43,5%	39,1%	100,0 %	
Total		sayı	15	30	18	63	
		%	23,8%	47,6%	28,6%	100,0 %	

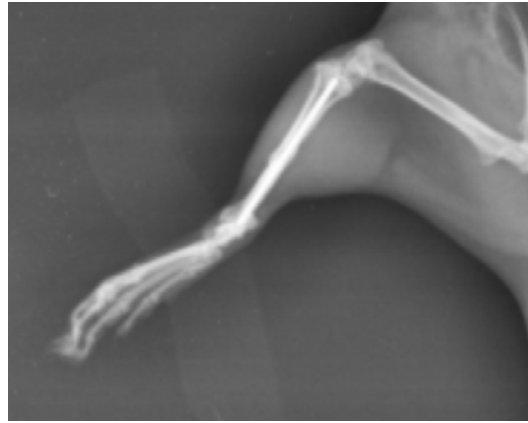
Üçüncü hafta radyolojik sonuçlara bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,014$, $p<0.05$). Grup II' de en kötü kaynama görülürken grup I'de en iyi kaynama oranları görülmüştür. Grup III'te kaynama oranlarının grup II'ye göre anlamlı olarak daha iyi olduğu görülmüştür. Her gruba ayrı ayrı bakıldığında grup I ve grup III'te üçer adet tam kaynama varken grup II'de hiç tam kaynama olmadığı görülmektedir. Grup I ve grup III'e bakıldığında ise tam kaynama olan denek sayısı eşit iken kaynama olmayan denek sayısı grup III'te daha fazladır. Grup I'de toplam puan 24, grup II'de 16 ve grup III'te 23 puan olarak hesaplanmıştır.

Tablo 6 : Altıncı Hafta radyoloji sonuçları

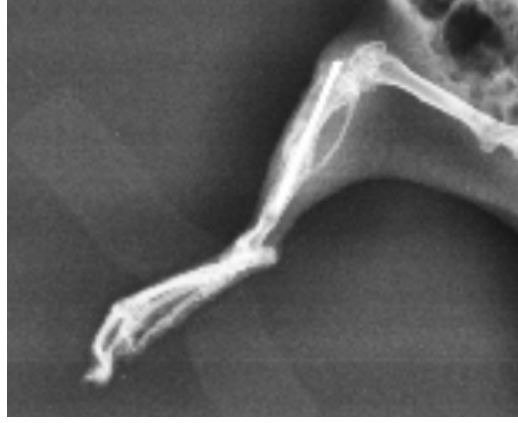
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Grup I	3	3	3	3	2	3	3	2	2	3	2	2
Grup II	3	2	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2
Grup III	3	3	2	2	3	3	3	3	2	2	2	3

Tablo 7: Altıncı hafta radyografi frekans ve yüzdeler

			veriler			Total	p
			1,00	2,00	3,00		
Gruplar	D	sayı	3	16	3	22	0.001
		% grup içi	13,6%	72,7%	13,6%	100,0 %	
	K	sayı	0	10	21	31	
		% grup içi	0,0%	32,3%	67,7%	100,0 %	
	S	sayı	0	10	21	31	
		% grup içi	0,0%	32,3%	67,7%	100,0 %	
Total		sayı	3	36	45	84	
		%	3,6%	42,9%	53,6%	100,0 %	



Resim 14: Grup I 6. hafta grafisi



Resim 15: Grup II 6. hafta grafisi



Resim 16: Grup III 6. hafta grafisi

Altıncı hafta radyolojik sonuçlara bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak fark bulunmuştur ($p=0.001$, $p<0.05$). Tablo 7'ye bakıldığında grup II (diyabet grubu)'de grup I (kontrol grubu) ve grup III (selenyum grubu)'e göre kaynama oranları daha azdır. Her grup ayrı ayrı incelendiğinde grup I de toplam puan 31, grup II de toplam puan 21, grup III de toplam puan 31 olarak görülmektedir. Ayrıca diyabet grubunda üç adet kaynamama varken kontrol ve selenyum grubunda hiç kaynamama görülmemiştir. Kontrol ve selenyum grupları arasında istatistiksel olarak fark yokken her iki grupta kaynama oranları diyabet grubuna göre anlamlı olarak daha iyi olduğu görülmüştür.

4.2 Histopatolojik Bulgular:

Altıncı hafta sonunda tüm denekler sakrifiye edildikten sonra histopatoloji için ayrılan tibialar hematoksilen-eozin ile boyama yapıldıktan sonra Huo ve

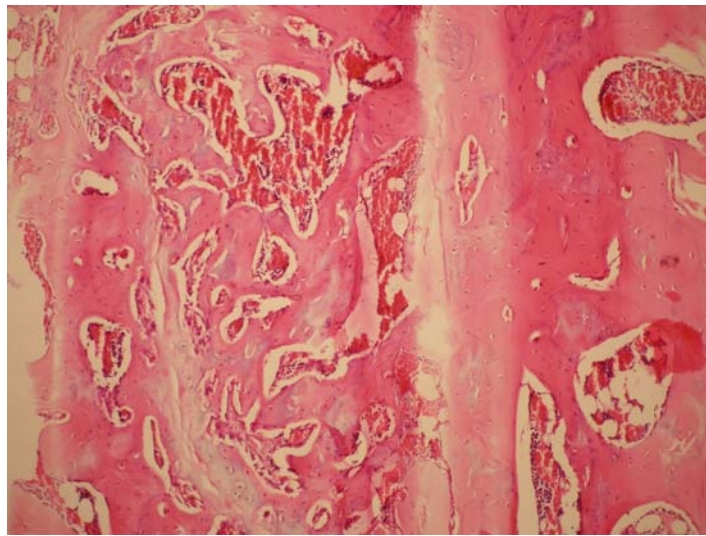
arkadaşlarının önermiş olduğu skalaya göre değerlendirme yapıldı. Yapılan değerlendirme sonuçları Tablo 8’de görülmektedir.

Tablo 8: Histopatoloji sonuçları

	Grup I	Grup II	Grup III
1	7	7	8
2	8	7	9
3	7	7	7
4	6	6	7
5	9	6	7
6	7	5	8

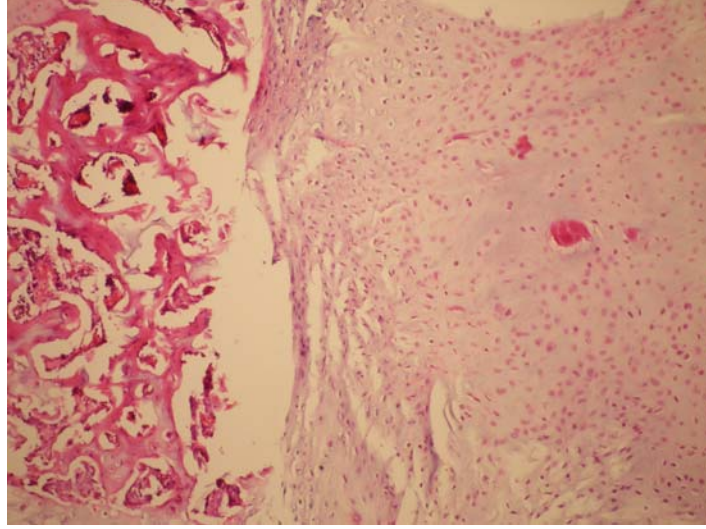
İstatistiksel analiz için Chi-square test kullanıldı. $p < 0.05$ olması nedeni ile her üç grup arasında histopatolojik açıdan anlamlı fark olduğunu gösteriyordu.

Grup I’de histopatolojik açıdan kemik iyileşme dokusunu genel olarak az miktarda kırık ile daha çok oranda immatür kemik oluştururken daha az oranda matür kemik dokusunun oluşturduğu görüldü (Resim 17).

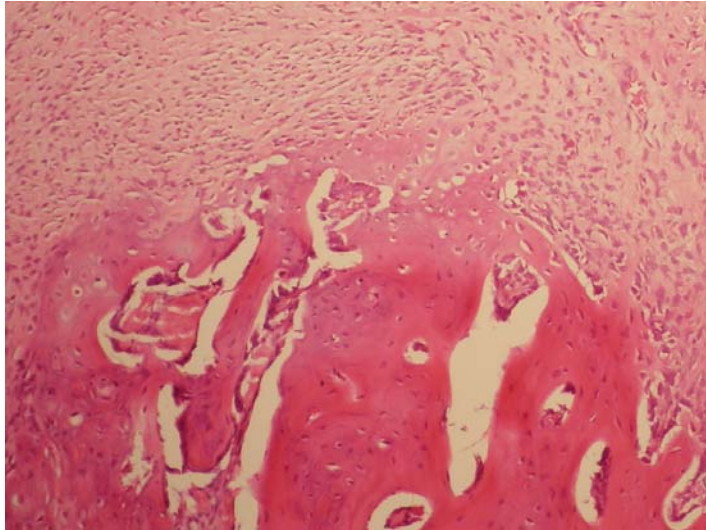


Resim 17: Grup I 6. hafta kırık hattından geçen histopatolojik kesit (x40 HE)

Grup II’de kemik iyileşme dokusunu ağırlıklı olarak kıkırdak dokusu ve az miktarda immatür kemik dokusunun oluşturduğu görüldü (Resim 18) . Bunun yanında bu grupta diğer gruplardan farklı olarak inflamasyon dokusu daha fazla oranda bulunmaktaydı (Resim 19).

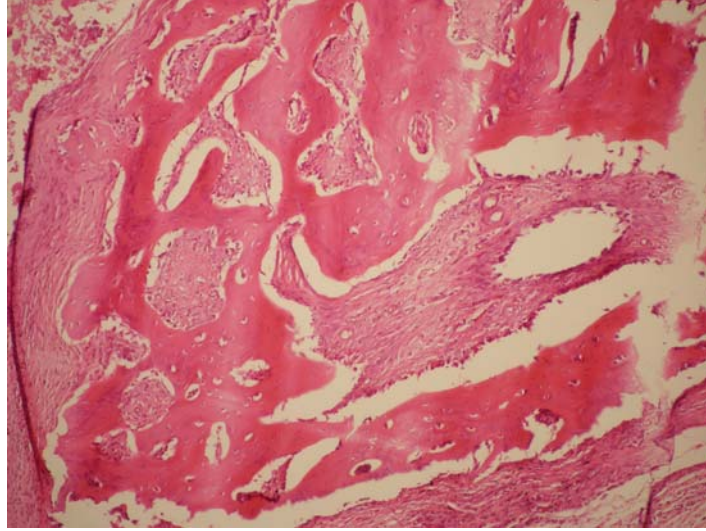


Resim 18: Grup II 6. hafta kırık hattından geçen histopatoloji kesiti (X40 HE)



Resim 19: Grup II 6. hafta artmış inflamasyon dokusu (x40 HE)

Grup III’te kemik iyileşme dokusunu büyük oranda immatür kemik ve az miktarda kıkırdak doku oluşturunuyordu (Resim 20).



Resim 20: Grup III 6. hafta kırık hattından geçen histopatolojik kesit (x40 HE)

4.3 Biyomekanik Bulgular:

Altıncı hafta sonunda tüm gruplar kurban edildikten sonra biyomekanik incelemeye alınacak deneklerin tibiaları yumuşak dokulardan temizlenerek üç nokta bükme prensibi ile biyomekanik cihazında teste alındı. Tüm gruplarda oluşan kallus dokularının bükülmeye karşı dirençleri ölçülüp grafiklendi. Tablo 9’da biyomekanik teste alınan tüm grupların test sonucu elde edilen kırılma kuvvetleri Newton olarak görülmektedir.

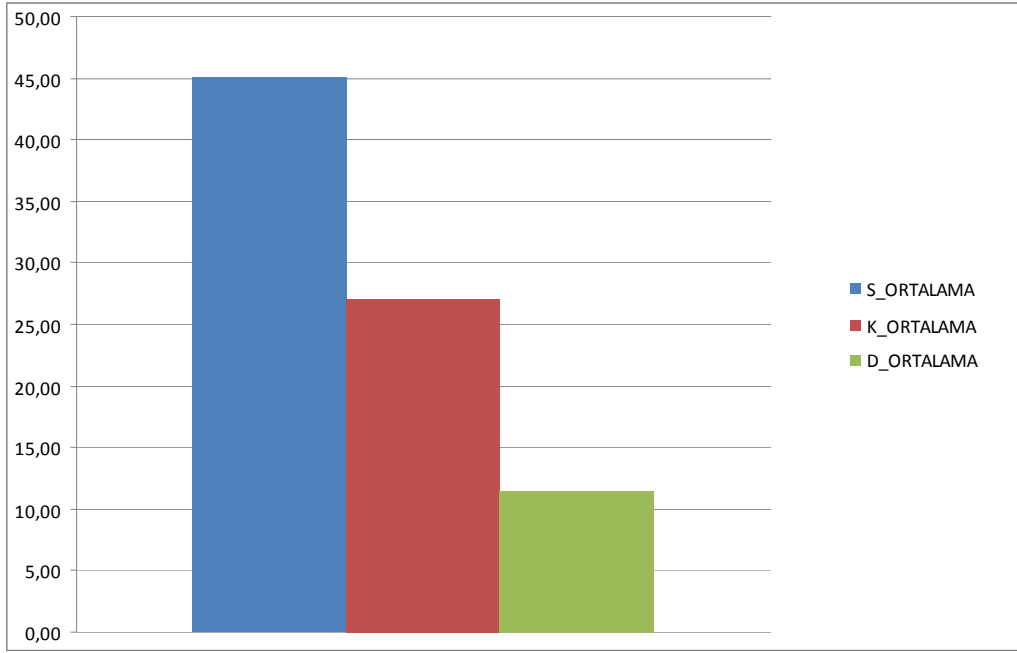
Tablo 9: Biyomekanik test sonuçları (Newton)

Grup	1	2	3	4	5	6
Grup I	21,80	33,86	26,92	21,76	31,18	25,24
Grup II	12,31	10,28	12,49	10,23	12,25	11,38
Grup III	69,94	21,34	56,10	29,67	48,57	47,42

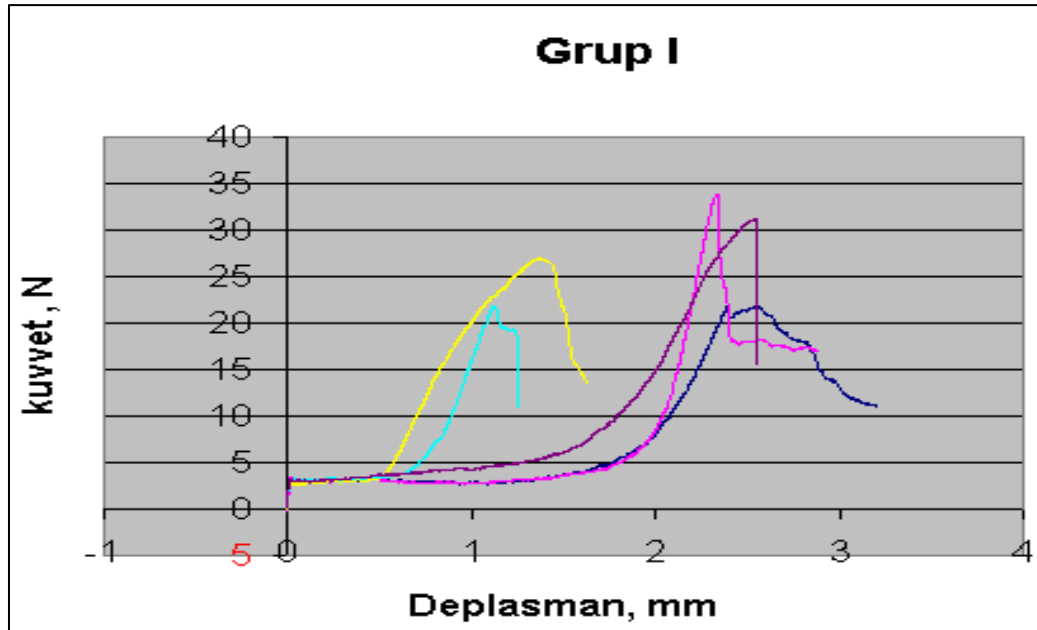
Her üç gruba ait veriler ANOVA ve Tamhane test ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında grup I ile grup II ($p=0.001<0.05$) ve grup II ile grup III ($p=0.015<0.05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. Grup I ile grup III arasında ise anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,137>0.05$). İstatistiksel

olarak anlamlı olmasa da grup III'te kırılma noktası 69.94 N'a kadar çıkan değerlerin olduğu ve ortalama olarak 45,12 N olduğu, grup I'de en yüksek kırılma noktasının 33,86 N, ortalama 27,10 N olduğu görülmektedir.

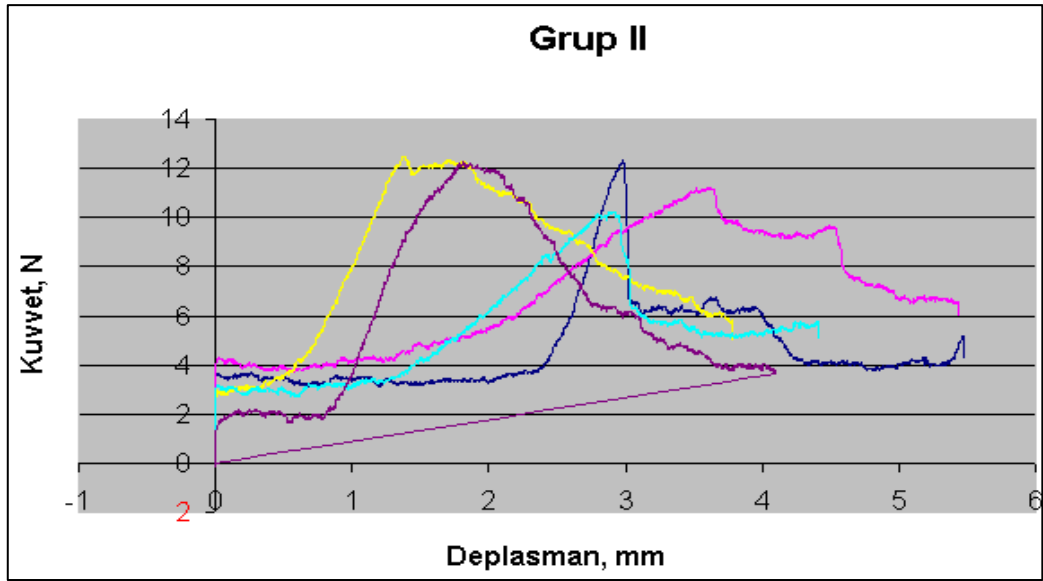
Her üç gruba ait verilerin gerim/gerinim eğrilerini içeren grafikler ve ortalama kırılma noktalarını içeren tablo aşağıda verilmiştir.



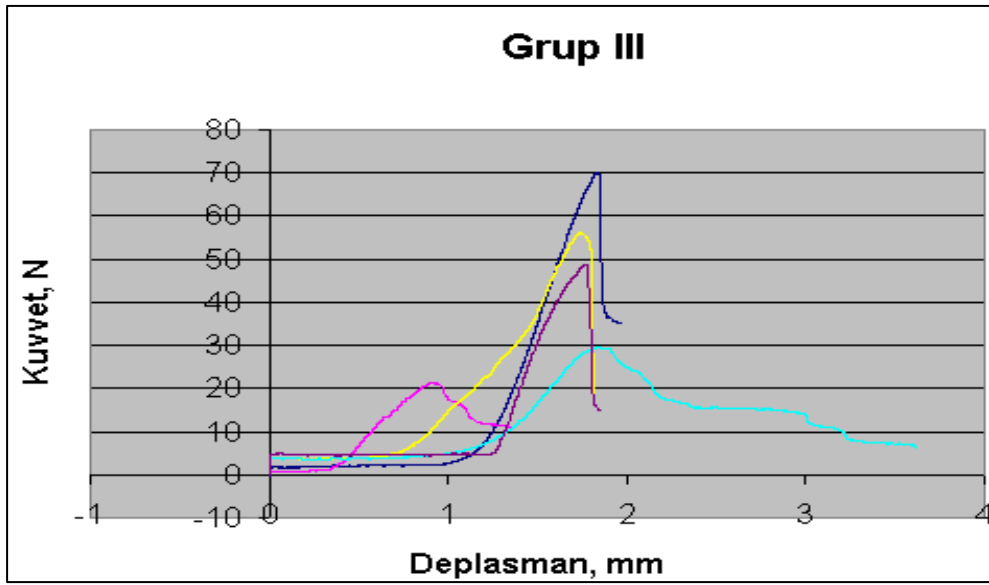
Grafik 1: Grup I (K), Grup II (D) ve Grup III (S)'ün ortalama kırılma noktaları



Grafik 2: Grup I gerim/gerinim grafiği



Grafik 3: Grup II gerim/gerinim grafiği



Grafik 4: Grup III gerim/gerinim grafiği

5. TARTIŞMA

Kemik dokusu, son derece iyi organize olmuş, canlı, oldukça iyi kanlanma ve innervasyona sahip, heterojen, dinamik, mineralize bir bağ dokusudur. Yaşamsal organlara destek ve koruma görevinin yanında kemik, üzerine yapışan kasların düzenli kontraksiyonu ile vücudun hareket etmesini sağlar. Vücutta sağlam bir destek dokusu olmasının yanında aynı zamanda mineral dengesinin düzenleyicisi ve kan hücreleri rezervuarı olarak da görev alır (10,11,12,13).

Travmatik, patolojik ve stres gibi birçok nedenlerle kemiğin anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıyla oluşan kırıklar ortopedi ve travmatoloji pratiğinde sık rastlanan yaralanmalardandır. Kırık sadece kemiği değil aynı zamanda çevresini saran periost ve yumuşak dokuları da ilgilendiren bir olaydır (24,36). Kemik, skar dokusu oluşturmada yeniden yapılanmayla şekil ve fonksiyon olarak orijinaline yakın biçimde iyileşir (24,25).

Travmanın oluş mekanizması ve şiddeti, çevre yumuşak dokularda meydana gelen hasar, tedavi şekli, hastanın genel durumu ve sistemik hastalıkları gibi birçok faktör kırık iyileşmesini etkiler (34,37). Az sayıda kırık, tedavi gerektirecek şekilde kaynamama ve geç kaynama gibi iyileşme sorunları gösterirken, bunun dışında kalan çoğu kırık konservatif ve cerrahi tedavi ile iyileşirler (187,188). Kırığın iyileşme sürecini hızlandırmak ve karşılaşılabilen bu kaynamama gibi olumsuz sonuçlardan kaçınmak için yapılan bazı çalışmalar klinikte kullanım alanı bularak; tekrarlayan tedavi gereksinimlerini, işgücü kaybını, morbidite miktarını ve tedavi masraflarının azalmasını, kişinin daha kısa sürede normal hayatına dönmesini sağlamıştır (187,189,190)

Diyabet, insülin hormonunun yetersizliği ya da periferik etkisizliği sonucu ortaya çıkan, başta kalp-damar, böbrek, sinir sistemi ve göz olmak üzere tüm sistemleri etkileyen sistemik ve kronik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluk, kapiller membran değişiklikleri ve hızlanmış ateroskleroz ile seyreder. İnsülin ve OAD ilaçların keşfiyle diyabetli hastaların yaşam süreleri belirgin olarak uzamıştır. Bu sebeple, diyabetli yaşam süresinin artmasına bağlı gelişen, kronik komplikasyonlarının görülme sıklığı artmıştır. Bu komplikasyonlar diyabetik hastaların en önemli mortalite ve morbidite nedenidir (54). Tüm sistemleri etkileyen diyabetin kemik ve kırık iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkileri bir çok çalışmada belirtilmiştir. DM'nin hangi mekanizmalarla osteopatiye neden olduğu halen araştırılan bir konudur (58-61). Hipergliseminin direkt etkisi, insülin yetersizliği, düşük IGF-1

düzeyi, diyabetin kronik komplikasyonları üzerinde en fazla durulan olası mekanizmalardandır. Diyabetik kırık kallusunda özellikle kırık iyileşmesinin erken evrelerinde hücre proliferasyonu ve kollajen sentezinin azaldığı ve kemiğin biyomekanik olarak zayıfladığı gösterilmiştir (58,61,62,63). Yapılan çalışmalarda osteoblastik hücrelerde insülin reseptörü tespit edilmiş ve insülinin osteoblastlarda nükleotid sentezini, hücre proliferasyonunu ve kollajen sentezini stimüle ettiği, IGF-I'in kollajen sentezi ve hücre proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (64-70). Ayrıca yapılan bir çalışmada insülin eksikliğinde kalsifikasyon/ossifikasyonda azalma olduğu bildirilmiştir (71). İnsülinin osteoblastlar üzerine stimüle edici etkisi vardır ve insülin eksikliğinin, osteoblast sayısında azalma, osteoid formasyonunda azalma ve hücresel disfonksiyon ile sonuçlandığını gösteren çalışmalar vardır. (78,79,80) Stuart ve ark. elektif artrodez yapılan DM'lu hastalarda geç kaynama, kaynamama ve psödoartroz oranının arttığını bildirmiştir (2). Biz çalışmamızı; tüm dünyada kronik komplikasyonlarıyla mücadele edilmeye çalışılan, günlük klinik uygulamalarımızda sık karşılaştığımız diyabetin kırık iyileşme sürecine olan olumsuz etkileri nedeniyle ortaya çıkan morbidite, işgücü kaybı ve maddi kayıpların en aza indirilmesi için klinikte yer bulması amacıyla seçtik.

Kimyasal, viral yada cerrahi yöntemle deneysel diyabet oluşturulabilir. Kimyasal diyabet oluşturmak için alloksan veya STZ kullanılabilir. Her iki ajan da pankreas β hücrelerinde selektif hasar oluşturarak etki eder. Alloksan insüline bağımlı diyabet oluştururken STZ hem insülin bağımlı hem de insülin bağımsız diyabet oluşturur. STZ tek doz uygulamak yeterli iken alloksanı ardışık üç doz intraperitoneal olarak uygulamak gerekir (191). Junod ve ark.'nın STZ'in uygulama dozu ve etkisi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada 25-100mg/kg STZ uygulamışlar. 65mg/kg uygulanan ratlarda hem klinik olarak diyabetik etkilerin görüldüğünü hem de insülin düzeylerinin 1,8 mU/ mg'dan 0.09 mU/mg'a düştüğünü gözlemlemişler, 55- 65 mg/kg uygulama dozlarında diyabetojenik etki arasında bir fark olmadığını göstermişlerdir (90). Çalışmamızda tek doz uygulama kolaylığı ve insüline bağımlı ve insülin bağımsız diyabet oluşturması nedeniyle 60 mg/kg STZ ile deneysel diyabet oluşturduk.

Literatüre bakıldığında deneysel diyabet oluştuktan ne kadar süre sonra kemikteki etkilerinin ortaya çıktığı konusunda bir fikir birliği olmadığı görüldü. Macey ve ark. yaptıkları bir çalışmada STZ ile deneysel diyabet oluşturduktan 10 gün sonra kırık oluşturdıklarını belirtmişlerdir (61). Başka bir çalışmada

deneysel diyabet oluşturulan ratlarda fonksiyonel, moleküler ve biyokimyasal analizler sonucu 2. haftada kronik diyabet olduğu gösterilmiştir (192). Çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturduktan bir hafta sonra kırık modelini oluşturduk.

Kırık iyileşmesi, enflamasyon, onarım ve remodelasyon olmak üzere birbiri içerisine geçmiş, karışık fiziksel ve biyokimyasal etkileşimlerin görüldüğü üç temel dönemde gerçekleşir (15,36). Bu süreçte kemiğin yanı sıra periost, kemiği çevreleyen yumuşak doku ve medulla da aktif rol oynar. Kırık iyileşmesi süresince meydana gelen hücresel ve biyokimyasal olayların açıklığa kavuşturulması bu süreçte etkili biyofiziksel ve biyolojik faktörlerin araştırılmasını sağlamıştır (187,189,190).

Bugüne kadar kırık iyileşmesini hızlandırmaya yönelik çeşitli teknik ve malzemeler kullanılmış ve bunların da bazıları klinikte kullanım alanı bulmuştur. Bunlar elektrik stimülasyonu, mekanik stimülasyon ve ultrason gibi biyofiziksel teknikler yanında, otojen ve allojen kemik greftleri, sentetik greftler, kemik iliği ve büyüme faktörleri gibi biyolojik malzemelerdir (22,46,47,188,193,194,195).

Enflamatuar hastalıklarda, lokal inflamasyonda, normal yara iyileşmesinde, iskemi ve reperfüzyonda, iyonizan radyasyon ve herbisit etkileriyle toksik miktarda oluşan serbest radikaller (93,95-97) diyabette görülen hipergliseminin, glikoz oksidasyonuna, proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonuna ve poliyol yolunu içine alan kompleks mekanizmalar sonucu da olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (130-133). Diyabette, serbest radikallerin artışı ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin azalması, yalnızca hücresel organellerin ve enzimlerin hasarına değil, lipid peroksidasyonunun artmasına ve insülin reseptörlerinin insuline karşı duyarlılıklarının azalmasına neden olmaktadır (132). Yapılan çalışmalar diyabetle beraber artan SOR üretiminin antioksidan savunma sistemini baskılayarak, enzim sistemlerinde değişikliklere neden olduğunu, buna bağlı olarak da endotelial, vasküler ve nörovasküler disfonksiyonlar meydana getirdiğini açıkça göstermektedir (131,142). Kırık iyileşmesinde de özellikle inflamasyon döneminde artan serbest oksijen radikallerinin granülasyon dokusunu bozduğu ve yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmiştir (120,121,123). E ve C vitamini gibi antioksidanlarla yapılan çalışmalarda kemik dokusu ve kırık iyileşmesi üzerine antioksidanların olumlu etkileri gösterilmiştir (84,127,128,129). Gerek diyabetli kişiler, gerekse deneysel olarak diyabet oluşturulan deney hayvanları üzerinde yapılan çok sayıda

çalışmada, antioksidan karotenoidler, çeşitli vitaminler (vitamin C, E) aspirin, stobadin ve çeşitli bitkisel ekstraktların da içinde yer aldığı değişik ajanlar kullanılmıştır (139-141). Biz de çalışmamızda antioksidan etkinliği çeşitli çalışmalarda kanıtlanmış olan selenyumu (3,4,162,163), diyabetin oluşturduğu oksidatif stresin etkilerini azaltmak için kullandık.

Selenyum, bazı metabolik hastalıkların ve kanser türlerinin önlenmesinde rol oynayan antioksidan özellikteki GSH-Px enziminin yapısında bulunur. Selenyumun biyolojik önemi bu enzimin bir ko-faktörü olmasından kaynaklanmaktadır. E vitamini ile etkileşerek lipid metabolizması sonucu oluşan peroksitlerin neden olduğu oksidatif hasarlardan hücre membranını korumaktadır (163). Yapılan çalışmalar ile, selenyumdan fakir bölgelerde görülen, kronik-dejeneratif osteoartropati ile seyreden, tip I ve tip II kollajen yapım bozukluğu sonucu irregüler kemik formasyonu ile karakterize selenyum eksikliğine bağlı Kashin-Beck Hastalığı tanımlanmıştır (5,6,171). Selenyumdan fakir diyet verilen gruplarda kontrol gruplarına oranla kemik biyomekanik kuvvetinde ve mineral dansitesinde kontrol grubuna göre azalma olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (7,173).

Selenyumun glikoz metabolizması üzerine etkilerini gösteren bir çok çalışma yapılmıştır. Selenyum bu etkileri insülin benzeri etki ile hücrelerde glikoz transportunu, cAMP fosfodiesteraz aktivitesini ve ribozomal S6 protein fosforilasyonunu stimüle ederek, hücre membranlarında glikoz transportunu sağlayan GLUT-1 ve GLUT-2 proteinlerinin transkripsiyonunu uyarak ve insülinin sinyal yolu üzerindeki tirozin kinazı stimüle ederek yerine getirir. (8,9,176-180). Selenyumun protein sentezi ve hücre proliferasyonunu artırarak ve apoptozisi inhibe ederek etki gösteren IGF-I arasında korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar vardır (181,182). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda hem kırık iyileşmesi sürecinde ortaya çıkan, diyabetin de biyokimyasal etkileriyle artan oksidatif stresin hem de diyabetin direkt olarak olumsuz etkilediği kırık iyileşmesinin selenyumun antioksidan ve aynı zamanda antidiyabetojenik ve kemik yapımı-mineralizasyonunu artırıcı etkilerinden faydalanmayı düşündük.

Literatürde kırık iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda rat, fare, tavşan, köpek, koyun ve domuz gibi çeşitli hayvanların kullanılabileceği belirtilmiştir. Literatürde benzer çalışmaların çoğunlukla ratlar üzerinde yapılmış olduğu görülmektedir (196). Çalışmamızda denek sayısının fazla olması, kolay temin edilebilirliği, şartlara hızlı uyumu ve enfeksiyona dirençli olmaları, izogenetik olmaları nedeniyle rat kullandık.

Kırık modeli oluşturulurken açık ya da kapalı yöntemle kırık oluşturulabilir. Kapalı kırık bir çok çalışmada kullanılmış olmasına rağmen açık osteotomi ile oluşturulan kırıklarda kaynamama ve geç kaynamaya yatkınlık olması nedeniyle kullanılacak tedavi yönteminin ya da etkisi araştırılan maddenin etkinliğini göstermede daha başarılı olabileceği bildirilmiştir (196). Biz de bu nedenle açık osteotomi ile kırık modeli oluşturmayı seçtik.

Yayınlanmış çalışmalarda oluşturulan kırığın tespiti için intrameduller, plak, ve eksternal fiksator gibi çeşitli tespit yöntemleri kullanılmış olduğu bildirilmiştir (197,198,199). Biz de çalışmamızda diz eklemine açmadan kırık hattından önce retrograd olarak gönderdiğimiz K telini redüksiyon sonrası antegrad olarak gönderdik. Bu yöntemi tercih etmemizin nedeni rat tibiasının küçük olması nedeniyle intramedüller uygulamanın kolay olması ve değerlendirmede kullanacağımız kallus dokusunun bu tür tespitlerde sekonder kırık iyileşmesi nedeniyle daha fazla oluşmasıdır.

Radyolojik değerlendirmede literatürde farklı yöntemlerin kullanılmış olduğunu gördük. Direk grafi ile kırık uçları arasında köprüleşme, kallus miktarı ve kırık hattının görülebilirliği gibi parametreler mevcuttu (199,200). Biz de çalışmamızda radyografik değerlendirmeyi kaynamama, kısmi/şüpheli kaynama ve tam kaynama olarak üç dereceye ayrılan Goldberg sınıflaması ile yaptık (185).

Kırık iyileşmesinin histolojik değerlendirilmesinde literatürde çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Korteks, spongios kemik ve medullanın ayrı ayrı değerlendirilip 20 puan üzerinden derecelendirilen Modifiye Lane Sandhu sınıflaması (201) ve Allen ve arkadaşlarının tanımladığı (202) 0'dan 4'e kadar puanlanan sınıflama bunlardan birkaçıdır. Biz de histolojik değerlendirmemizi fibröz doku, kırıkta, immatür ve matür kemik oranlarına göre ayrılan 10 dereceden oluşan Huo ve arkadaşlarının önermiş olduğu skala ile yaptık.

Çalışmamızın biyomekanik değerlendirmesinde öncelikle ölçümü etkilememesi için kemikler tüm yumuşak dokulardan sıyrıldı. Değerlendirme sırasında kemikleri kırmak için üç nokta prensibi ile uygulanan kuvvetler ölçüldü.

Deneyin tüm aşamaları tamamlanıp değerlendirme yapıldığında selenyumun diyabette kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini gördük.

Radyolojik sonuçlara bakıldığında 3. haftada 1. ve 3. grupta 2. gruba göre kaynama oranlarının daha iyi olduğu istatistiksel olarak görüldü. 6. hafta sonuçlarında ise 1. ve 3. grupta 2. gruptan daha iyi sonuç olmakla birlikte 1. grupta en iyi sonuç olduğu istatistiksel olarak gösterildi.

Stuart ve ark. yaptıkları retrospektif bir çalışmada diyabetli hastalarda geç kaynama, kaynamama ve psödoartroz oranlarının arttığını bildirmiştir (2). Bizim çalışmamızda da diyabetli grupta 3, diyabet+selenyum grubunda 1 kaynamama görülürken kontrol grubunda hiç kaynamama olmadığını gördük. Radyografik değerlendirmede kallus dokusu ve kaynama oranlarının selenyum verilen grupta diyabet grubuna göre anlamlı oranda artmış olduğunu, en iyi kaynamanın ise kontrol grubunda olduğunu gördük.

Histopatolojik değerlendirmede iyileşme bölgesini daha iyi değerlendirmek için tüm örnekleri kırık hattının proksimal ve distalinden aldık. Altıncı hafta sonunda değerlendirme yaptığımızda grup 3'te (selenyum+ diyabet) grup 2 (diyabet)'ye göre kemik iyileşmesinin daha iyi olduğunu gördük. İstatistiksel olarak da anlamlı fark olduğunu gösterdik. Ayrıca diyabetli grupta diğer gruplardan farklı olarak daha yoğun inflamasyon dokusu olduğunu gördük.

Son yapılan çalışmalar selenyumun immün sistemin tüm hücrel ve humoral komponentlerini etkilediğini göstermiştir (166,167,168). İnsanlarda düşük selenyum düzeylerinde natural kiler hücrelerde azalma olduğu (169) ve selenyum verilmesiyle T-lenfosit kaynaklı tümör lizis ve lenfosit proliferasyonunu artırdığı görülmüştür (170). Selenyum eksikliğinde Ig A, M ve G düzeylerinde azalma, hücre kültürlerinde selenyum eksikliğinin lenfositlerde azalmış proliferasyona ve insanlarda nötrofil fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (166). Asman ve ark. deneysel granülasyon dokusu oluşturarak yaptıkları bir çalışmada polimorfonükleer lökosit gibi inflamatuvar hücrelerin kollajen yıkımına neden olduğunu, vitamin E ve selenyum uyguladıktan sonra inflamatuvar hücrelerden kaynaklanan serbest radikal oluşumunu engelleyerek kollajen yıkımında azalma olduğunu göstermiştir (203).

Çalışmamızda 3. hafta radyografik değerlendirmemizde diyabet+selenyum grubunda diyabet grubuna göre kaynama oranlarının daha iyi olması selenyumun hem kırık oluşmasıyla ortaya çıkan hem de diyabet varlığında artan oksidatif strese karşı antioksidan özelliği sayesinde kollajen yıkımını azalttığını düşündürmektedir. Ayrıca 6. hafta sonunda yapılan histopatolojik değerlendirmede diğer gruplardan farklı olarak diyabet grubunda artmış

inflamasyon dokusunun varlığı selenyumun inflamasyon üzerine olan etkilerini doğrular niteliktedir.

Göktürk ve arkadaşlarının serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesi üzerine olan etkilerini incelediği bir çalışmada 3. hafta yapılan histopatolojik incelemede serbest oksijen radikalleri oluşturulan grupta kontrol grubuna göre kırık iyileşmesinde gecikme olduğunu göstermişlerdir (202). Keskin ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada antioksidan bir molekül olan E vitamini verilen grupta kontrol grubuna göre histopatolojik ve radyolojik olarak daha iyi kaynama olduğunu göstermişlerdir (123). Biz de çalışmamızda antioksidan özelliği taşıyan selenyumun, E vitaminine benzer şekilde kırık iyileşmesine olumlu etki ettiği sonucunu elde ettik.

Garett ve arkadaşları invivo ve invitro olarak yaptıkları bir çalışmada serbest oksijen radikallerinin özellikle de süperoksitin osteoklast oluşumu ve uyarılmasında dolayısıyla da kemik rezorbsiyonunda rol oynadığını göstermişlerdir (204). Bizim çalışmamızda da 3. hafta radyoloji sonuçlarına ve tüm sonuçlara genel olarak bakıldığında selenyum uygulanan grupta diyabet grubuna göre kırık iyileşmesinin daha iyi olması serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri olduğunu destekler niteliktedir.

Heather ve ark. deneysel diyabet oluşturarak histopatolojik ve biyomekanik olarak inceledikleri çalışmada 6. haftada yaptıkları biyomekanik değerlendirme sonucunda diyabetli grupta kırık oluşturma ve sertlik açısından kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma tespit etmişler, makaslama kuvvetlerine karşı anlamlı bir fark yokken diyabetli grupta özellikle torsiyonel stresin azaldığını belirtmişlerdir (1).

Bizim çalışmamızda biyomekanik sonuçlara bakıldığında 6. hafta sonunda yapılan biyomekanik testlerde kontrol grubu ve selenyum grubunda diyabet grubuna göre kırılma kuvvetleri açısından anlamlı fark olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile selenyum grubu arasında biyomekanik sonuçlar açısından anlamlı bir fark olmamakla birlikte selenyum uygulanan gruptaki kırılma noktaları diğer gruplara oranla önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bu da selenyumun daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiş olan hem kollajen sentezine hem de kemik mineralizasyonuna olan pozitif etkilerinin neden olabileceğini düşündürmüştür.

Radyolojik, histopatolojik ve biyomekanik sonuçları tek tek ele aldığımızda ve birlikte değerlendirdiğimizde selenyumun diyabet varlığında kırık iyileşmesini artırıcı etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda histopatolojik değerlendirmenin tek patolog tarafından yapılması ve radyolojik incelemede mikrotomografi destekli değerlendirme yapamamak çalışmanın dezavantajlarıdır.

Sonuç olarak; yaptığımız çalışmada elde edilen verilerle selenyum uygulanmasının diyabet varlığında ratlarda kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini göstermiş olduğunu düşünüyoruz. Bunun bir ön çalışma olarak değerlendirildiğinde ileride daha fazla sayıda denek ve daha çok parametre ile değerlendirecek çalışmalara ışık tutması ve klinikte uygulama alanı bulacağını umut ediyoruz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Deneyssel diyabet oluşturduktan sonra tibia kırığı yapılan ratlarda selenyumun diyabetiklerde kırık iyileşmesi üzerine etkileri radyografik, histopatolojik ve biyomekanik olarak incelendi ve çalışmanın sonunda aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1. Diyabetli hastalarda yara iyileşmesi gibi kırık iyileşmesi de etkilenmiştir ve bu klinikte önemli bir sorun olarak karşımıza çıkar. Diyabetin kemik metabolizması ve kırık iyileşmesi üzerine etkileri değişik mekanizmalarla olmaktadır.
2. STZ ile deneyssel diyabet oluşturulan çalışmalarda cerrahi müdahale uygulanacaksa hem STZ'in sistemik etkilerinin azalması hem de diyabet oluşması açısından literatürde belirtilen sürelerin beklenmesi önerilir.
3. Selenyumun değişik etki mekanizmaları ile diyabetin olumsuz etkilerine karşı etkili olduğu, kemik metabolizması ve diyabet varlığında kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini düşünmekteyiz.
4. Çalışmamızın değerlendirilmesinde histopatolojik, radyografik ve biyomekanik olarak 3 farklı parametre kullanılması çalışmamızın avantajıdır.
5. Kırık iyileşmesinin değerlendirilmesinde mikrotomografi ve kemik mineral dansitesi gibi daha objektif ve kantitatif yöntemlerin kullanılmaması çalışmamızın dezavantajıdır.

KAYNAKLAR

1. Heather A., Beam, J. Russell Parsons, Sheldon S : The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *Journal of Orthopaedic Research* 20 (2002); 1210-16
2. Stuart MJ, Morrey BF : Arthrodesis of the diabetic neuropathic ankle joint. *Clin Orthop Relat Res.* (1990); 209-11
3. Memişoğulları R, Gümüştekin K, Dane Ş, Akçay F : The Effect of Pre-Injury Supplementation with Selenium or Vitamin E on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Burn Injury. *Turk J Med Sci* (2006); 36 (3): 141-6
4. Regina E, Matthias U, Sabine Z, Jutta M-W, Doris S, Helga S, Nicole S, Moustapha K, Franz J: Selenium Supplementation Restores the Antioxidative Capacity and Prevents Cell Damage in Bone Marrow Stromal Cells In Vitro. *Stem Cells* (2006); 24:1226–35
5. Yang C, Wolf E, Roser K, Delling G and Muller P K : Selenium deficiency and fulvic acid supplementation induces fibrosis of cartilage and disturbs subchondral ossification in knee joints of mice: an animal model study of Kashin-Beck disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423 (1993); 483-91
6. Sokoloff L : Endemic forms of osteoarthritis. *Clin Rheum Dis* (1985); 11:187-212
7. Reyes RM, Egrise D, Neve J, Pasteels J, Schoutens A: Selenium Deficiency-Induced Growth Retardation Is Associated with an Impaired Bone Metabolism and Osteopenia. *Journal of Bone and Mineral Research* (2001); 16: 1556–63
8. McNeill JH, Delgatty HLM. and Battel ML : Insulin-like effects of sodium selenate in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* (1991); 40:1675-8
9. Ezaki O : The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *J Biol Chem* (1990); 265:1124-8
10. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Basic Histology, Çeviri Ed: Aytekin Y: Temel Histoloji, Barış Kitabevi, İstanbul, (1998); 132-50
11. Lian JB, Stein GS, 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, Lippincotti Williams & Wilkins, Philadelphia, (1999); ch:3, 14-38
12. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology-I. In Pritchard DJ(ed). Instructional Course Lectures Volume 45, AAOS, (1996); 371-86
 13. Hing KA: Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? Phil.Trans.R. Soc. Lond. A (2004); 362:2821-50
 14. 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
 15. 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
 16. Burchard H : Biology of cortical bone graft incorporation. In Burchard H(ed): Osteochondral Allograft (2nd ed). WB Saundres, Philadelphia: (1983); 51-7
 17. Meade JB, Cowin SC, Klawitter JJ, Van Buskirk WC. et al: Bone remodeling due to continuously applied loads. Calcif Tissue Int; (1984); 36, 25-30
 18. Strachan RK, McCarthy I, Fleming R, Hughes SPF: The role of the tibial nutrient artery: Microsphere estimation of blood flow in the osteotomized canine tibia. J Bone Joint Surg (1990); 72B: 391-4
 19. Whiteside LA, Lesker PA: The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection: II on fracture healing. J Bone Joint Surg (1978); 60A: 26-30
 20. Fawcett DW, Ronald P, Jensh RP : Concise Histology. (2nd edition) (2002); 88
 21. 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
 22. Miller M : Basic Sciences. Review of Orthopaedics. 4th Edition, Philadelphia-Pennsylvania: Elsevier, (2004); 1-23
 23. Marks SC, Popoff S N. Bone cell biology: The regulation development, structure, and function in the skeleton. The American Journal of Anatomy (1988); 183: 1-44.

24. Einhorn TA : The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res. (1998); 355 Supp:7-21
25. Sibel S : Mikroskopik Düzeyde Kırık İyileşmesi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 55 sayı 2 (2002); 143–50
26. Phillips AM : Overview of the fracture healing cascade. Injury (2005); 365:5-7
27. De Palma : The Management of Fractures and Dislocations London: W.B. Saunders, (1970); 1:10–12
28. Cruess RL: Healing of bone, tendon and ligament. Fractures 2nd ed. Philadelphia, Lippincott Co, (1984); 1: 147-67
29. Grundnes O, Reikeras O: The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. Acta Orthop Scand (1993); 64 (1): 47-9
30. Hulth A: Current concepts of fracture healing. Clin Orthop Rel Res (1989); 249: 265-84
31. Brinker MR: Bone. In review of orthopaedics 3rd Ed. (Ed. Miller MD) (2000); 1-39
32. Zhang X, Naik A, Xie C, Reynolds D, Palmer J, Lin A et al: Periosteal stem cells are essential for bone revitalization and repair. J Musculoskelet Neuronal Interact (2005); 5(4): 360-2
33. Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. Clin Orthop Rel Res (1989); Nov ;248: 283-309
34. Cornell CN, Lane JM: Newest factors in fracture healing. Clin Orthop Relat Res. (1992); 277: 297-311
35. Bucholz RW, Heckman JD: Healing of the musculoskeletal system. In Rockwood CA, Green DP editors. Fractures in adults. Lippincott Williams & Wilkins (LWW), (1996); 267-304
36. McKibbin B: The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg (Br) (1978); 60(2): 150-62

37. Ege R : Travmatoloji. Kırıklar, Eklem ve Diğer Yaralanmalar 5.Baskı. Ankara: (2003); 55-94
38. 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
39. Yakar S, Rosen CJ : From mouse to man: redefining the role of insulin-like growth factor-I in the acquisition of bone mass. Proc Soc Exp Biol Med (2003); 228: 245-52
40. Brond AR, Rubin TC: Fracture Healing. Surgery of the Muskuloskeletal System New York: Churchill Livingstone, (1990); 1:93 -114
41. Gartner Leslie P, Hiatt James L: Color Textbook of Histology.(1997); 114–30
42. Kutsal YG (ed): Osteoporoz. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, (2005); 47
43. Giannoudis PV, MacDonald DA, Matthews SJ, Smith RM, Furlong AJ, De Boer P: Nonunion of femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. J Bone Joint Surg [Br] (2000); 82(5):655-60
44. Gerstenfeld LC, Al-Ghawas M, Alkhiary YM: Selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors and experimental fracture-healing. Reversibility of effects after short-term treatment. J Bone Joint Surg Am (2007); 89(1):114-25
45. Adam CI, Kenting JF, Court-Brown CM: Sigarette smoking and open tibial fractures. Injury (2001); 32:61-5
46. Khan SN: Bone growth factors: Orthop. Clin. North. Am.(2000); 31(3):375-88
47. Ozaki A: Role of fracture hematoma and periosteum during healing in rats. İnteraction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. J. Orthop. Sci (2000); 5(1): 64-70
48. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Early muscle-periosteal lesion inhibits fracture healing in rats. Acta Orthop Scand (1999); 70 (1): 62-66
49. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Effects of lesion between bone, periosteum and muscle on fracture healing in rats. Acta Orthop Scand (1998); 69 (2): 177-80

50. Grundnes O, Reikeras O: The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* (1993); 64 (1): 47-49
51. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* (1994); 65 (5): 559-63
52. Phieffer LS, Meyer RA, Gruber HE, Easley M, Wattenbarger JM: Effect of interposed periosteum in an animal physal fracture model. *Clin Orthop Relat Res.* (2000); 376: 15-25
53. Perren SM, Cordey J, Enzler M, Matter P, Rahn BA, Schläpfer F. [Mechanics of bone screw with internal fixation plates (author's transl)]. *Unfallheilkunde.* (1978); 81(4):201-18.
54. Satman İ, Yılmaz MT, Dinçdağ N: TURDEP Çalışması: Türkiye’ de Diyabet Prevalansı ve Diyabet Gelişmesine Etkili Faktörler; (2002)
55. Schloot NC, Hanifi-Moghaddam P, Goebel C, Shatavi SV, Flohe S, Kolb H, Rothe H: Serum IFN- γ and IL-10 levels are associated with disease progression in non-obese diabetic mice; *Diabetes Metab. Res. Rev.*, (2002); 18, 64-70
56. Dambro M.R: Griffith’s 5 Minute Clinical Consultant Williams&Wilkins, Rose Tree Corporate Center, USA.(1995)
57. Robbins SL, Kumar V: Basic Pathology, Fourth Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia PA 19105, (1987)
58. Funk JR, Hale JE, Carmines D, et al : Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *J Orthop Res* (2000); 18: 126-32
59. Herbsman H, Powers JC, Hirschnian A, Shaftan GW: Retardation of fracture healing in experimental diabetes. *J Surg Res* (1968); 8:424-31
60. Loder RT: The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res.* (1988); 210-6
61. Macey LR, Kana SM, Jingushi S, et al: Defects of early fracture healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am* (1989); 71: 721-33

62. Spanheimer RG: Correlation between decreased collagen production in diabetic animals and in cells exposed to diabetic serum: response to insulin. *Matrix* (1992); 12:101-7
63. Topping RE, Bolander ME, Balian G: Type X collagen in fracture callus and the effects of experimental diabetes. *Clin Orthop Relat Res.* (1994); 2:220-8
64. Canalis EM, Dietrich JW, Maim DM, Raisz LG: Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro. Effects of insulin and glucagon. *Endocrinology* (1977); 100: 668-74
65. Craig RG, Rowe DW, Petersen DN, Kream BE: Insulin increases the steady state level of alpha-1 (I) procollagen mRNA in the osteoblast-rich segment of fetal rat calvaria. *Endocrinology* (1989); 125: 1430-7
66. Hickman J, McElduff A: Insulin promotes growth of the cultured rat osteosarcoma cell line UMR- 106-01 : an osteoblast-like cell. *Endocrinology* (1989); 124:701-6
67. Kream BE, Smith MD, Canalis E, Raisz LG: Characterization of the effect of insulin on collagen synthesis in fetal rat bone. *Endocrinology* (1985); 116: 29&302
68. Levy JR, Murray E, Manolagas S, Olefsky JM: Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* (1986); 119:1786-92
69. Peck WA, Messinger K: Nucleoside and ribonucleic acid metabolism in isolated bone cells. Effects of insulin and cortisol in vitro. *J Biol Chem* (1970); 245: 2722-9
70. Weiss RE, Reddi AH: Influence of experimental diabetes and insulin on matrix-induced cartilage and bone differentiation. *Am J Physiol* (1980); 238:E200-7
71. Fiorelli G, Orlando C, Benvenuti S, et al: Characterization, regulation, and function of specific cell membrane receptors for insulin-like growth factor I on bone endothelial cells. *J Bone Miner Res* (1994); 9:329-37
72. Schneider LE and Schedl HP: Diabetes and intestinal calcium absorption in the rat. *Am J Physiol* (1972); 223:1319-23

73. Schneider LE, Schedl HP, McCain T and Haussler MR: Experimental diabetes reduces circulating 1,25-dihydroxy-vitamin D in the rat. *Science* (1977); 196:1452-4
74. Raskin P, Stevenson MR, Barilla DE and Pak CY: The hypercalciuria of diabetes mellitus: its amelioration with insulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* (1978) ; 9:329-35
75. Nyomba BL, Verhaeghe J, Thomasset M, Lissens W and Bouillon R: Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. 1. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. *Endocrinology* (1989); 124:565-72
76. Verhaeghe J, Bouillon R, Lissens W, Visser WJ and Van Assche FA: Diabetes and low Ca-P diet have opposite effects on adult and fetal bone mineral metabolism. *Am J Physiol* (1988); 254:496-504
77. Wood RJ, Alien LH and Bronner F: Regulation of calcium metabolism in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol* (1984); 247: 120-3
78. Canalis E: Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism* (1983); 32:14-20
79. Goodman WG and Hori MT: Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes* (1984); 33:825-31
80. Shires R, Teitelbaum SL, Bergfeld MA, Fallen MD, Slatopolsky E and Avioli LV: The effect of streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus on bone and mineral homeostasis in the rat. *J Lab Clin Med* (1981); 97:231-40
81. Hiramatsu K and Arimori S: Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* (1980); 29:251
82. Karten T, Colein-Osdoby P, Patel N: Potentiation of osteoclast bone resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994); 91:3569-73
83. Xu H, Watkins BA and Seifert MF: Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry. *Calcif Tissue Int* (1995); 57:293-300

84. Ima-Nirwana S, Kiftiah A, Sariza T, Gapor MTA and Khalid BAK: Palm vitamin E improves bone metabolism and survival rate in thyrotoxic rats. *General Pharmac* (1999); 32:621-26
85. Kayaalp O: Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler. 2. baskı. Ankara: Hacettepe TAŞ, (2001)
86. Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* (2001); 50:536-46
87. Ganda OP, Rossi AA, Like AA: Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes* (1976); 25:595-603
88. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G: Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* (1974); 23:889-95
89. Aughsteen AA: An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans in mice. *J Elect Micros* (2000); 49: 681 -90
90. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold A.E: Diabetogenic Action of Streptozotocin: Relationship of Dose to Metabolic Response. *The Journal of Clinical Investigation*. (1969); 48: 2129 -39
91. Akkuş İ: Serbest Radikaller ve Fizyo-patolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, (1995); Konya
92. Bulkley GB: Free radical mediated reperfusion injury: A selective review, *Br Jour Cancer*, (1987); 8: 66-73
93. Defraigne JO, Pincemail J, Franssen C, Meurisse M, Defechereux T, Philippart C, Serteyn D, Lamy D, Deby C and Limet R: In vivo free radical production after cross-clamping and reperfusion of the renal artery in the rabbit. *Cardiovasc. Surg.*, (1993); 1: 343-9
94. Kehrer JP: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, (1993); 23(1): 21-48
95. Serin E, Yılmaz E, Yılmaz S, Ünsaldı E ve Durmuş AS: İskemi-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri (ratlarda deneysel çalışma). *Artroplasti Artroskopik Cerrahi*, (1998); 9(1): 36-9

96. Seyama A: The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal ischemia/reperfusion injury. *Jpn. J. Surg.* (1993); 23: 1060
97. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ and Blake DR: Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bulletin*, (1993); 49(3): 506-22
98. Slater TF: Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* (1984); 222:1 – 15
99. Grisham MB, Hernandez LA and Granger DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol.*, (1986); 251: 567-74
100. McCord JM: Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc.* (1987); 46(7): 2402
101. Nylander G, Otamiri T, Lewis DH and Larsson J: Lipid peroxidation products in postischemic skeletal muscle and after treatment with hyperbaric oxygen. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, (1989); 23(2): 97-103
102. Michael L, Marks A, Smith C: Oxidative phosphorylation, mitochondrial function, and oxygen radicals. In Marks' *Essential Medical Biochemistry*, 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania, ABD: Lippincott Williams & Wilkins, (2007); 248 – 64
103. Olinescu R, Smith TL: Oxygen free radicals. In Boriotti S, Dennis D eds: *Free Radicals in Biology, and Medicine*. New York, ABD: Nova Science Publishers, (2002); 23 - 35
104. Olinescu R, Smith TL: Physiologic effects of oxygen stress. In Boriotti S, Dennis D eds: *Free Radicals in Biology, and Medicine*. New York, ABD: Nova Science Publishers, (2002); 119 – 28
105. Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG: Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* (1993); 52: 659 – 66
106. Davì G, Falco A, Patrono C: Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* (2005); 7(1-2): 256 - 68

107. De la Fuente M, Miquel J: An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflammaging. *Curr Pharm Des.* (2009); 15(26): 3003- 26
108. Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* (2002); 82(1): 47 - 95
109. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C: Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer.* (2007); 121(11): 2381- 6
110. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ: Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Card.* (2002); 86(1): 41 -59
111. Pincemail J: Free radicals and antioxidants in human diseases. In Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL eds. *Analysis of free radicals in biological systems*, Basel, Switzerland: Birkhäuser, (1995); 83 – 98
112. Simonian NA, Coyle JT: Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* (1996); 36: 83 – 106
113. Trougakos IP, Gonos ES: Chapter 9: Oxidative stress in malignant progression: The role of Clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals. *Adv Cancer Res.* (2009); 104: 171 - 210
114. Bulkley GB: The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery,* (1983); 94(3): 407-11
115. Freeman BA and Crapo JD: Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, (1982); 47(5): 412
116. Halliwell B and Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine.* Second Ed. Clarendon Press. Oxford. (1996); 237-45
117. Silverton SF, Mesaros S, Markham GD, Malinski T: Osteoclast radical interactions: NADPH causes pulsatile release of NO and stimulates superoxide production. *Endocrinology.* (1995); 136(11): 5244 - 7
118. Sontakke AN, Tare RS: A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta.* (2002); 318(1-2): 145 - 8

119. Yang S, Ries WL, Key LL Jr: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the formation of superoxide in osteoclasts. *Calcif Tissue Int.* (1998); 63(4): 346 - 50
120. Durak K, Bilgen OF, Kaleli T, Tuncel P, Ozbek R and Turan K: Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture hematoma in rabbit. *J. Int. Med. Res.*, (1996); 24: 419-24
121. Göktürk E: Sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine etkisi. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.*, (1997); 31: 353-6
122. Gurley AM and Roth SI: Bone. In Sternberg S.S. (Ed.). *Histology for Pathologists.* New York: Raven Pres.(1992); 61-9
123. Keskin D, Karsan O, Ezirmik N ve Çiftçioğlu A: Tavşanlarda kırık iyileşmesi üzerine alfa-tokoferolün etkisi. *Artroplasti-Artroskopik Cerrahi*, (1999); 10(2): 207-10
124. Petrovich YA, Podorozhnaya RP, Kichenko SM, Kozlova MV: Effects of selenium-containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. *Bull Exp Biol Med.* (2004); 137(1): 74- 7
125. Prasad G, Dhillon MS, Khullar M, Nagi ON: Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study. *Acta Orthop Belg.* (2003); 69(6): 546 - 51
126. Turgut A, Göktürk E, Köse N, Kaçmaz M, Oztürk HS, Seber S, Acar S: Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* (1999); 70(5): 487- 90
127. Morton DJ, Barret-Connor EL and Schneider DL: Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.*, (2001); 16: 135-40
128. Sergeev IN, Arkhapchev IP and Spirichev VB: The role of vitamin E in metabolism and reception of vitamin D. *Biokhimia*, (1990); 55: 1989-95
129. Yee JK and Ima-Nirwana S: Palm vitamin E protects against ferricnitrilotriacetate-induced impairment of bone calcification. *Asia Pacific J Pharmacol.*, (1998); 13: 1-7

130. Anderson RA, Roussel AM, Zouari N, Mahjoub S, Matheu JM, Kerkeni A: Potential antioxidant effect of zinc and chromium supplementation in people with type II diabetes mellitus. *Journal of American Nutrition*, (2001); 20(3), 212-8
131. Gumieniczek A, Hopkala H, Wojtowicz Z, Nikolajuk J: Changes in antioxidant status of heart muscle tissue in experimental diabetes in rabbits. *Acta Biochimica Polonica*, (2002); 49(2), 529-35
132. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB; Diabetes, oxidative stress and antioxidants: review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, (2003); 17(1), 4-38
133. West IC: Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine*, (2000); 17, 171-80
134. Bonnefont Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J: Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes and Metabolism*, (2000); 26, 163-76
135. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H: Glucose toxicity in β -cell: type II diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, (2003); 52, 581-7
136. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM: Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β cell dysfunction. *Diabetes*, (2003); 52, 1-8
137. Ohly P, Dohle C, Abel J, Seissler J, Gleichman H: Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects against diabetes induced by multiple low doses of STZ. *Diabetologia*, (2000); 43(8), 1020-30
138. Quinn L: Mechanism in the development of type II diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Nursing*, (2002); 16(2), 1-16
139. Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O, Boccuzzi A: Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, (1999); 26(11/12), 1467-74
140. Ramanathan M, Jaiswal AK, Bhattacharya SK: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the brain of STZ induced diabetic rabbits. *Indian Journal of Experimental Biology*, (1999); 37(2), 182-3

141. Cengiz M, Cengiz S: The effects of vitamin C administration on erythrocyte glutathione and HbA1c levels of type 2 diabetic patients. *Cerrahpasa J Med.*, (2000); 31, 211-5
142. Ulusu NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, Bali M, Stefek M, Stolc S, Gajdosik A, Karasu Ç: Pentose phosphate pathway, glutathione dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stres in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochemical research*, (2003); 28(6), 815-23
143. Sies H: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol.* (1997); 82: 291-5
144. Basaga HS: Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol.* (1990); 68 (7-8): 989- 98
145. Şimşek F: Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *T Klin J Pediatr.* (1999); 8: 42 – 7
146. Cao G, Chen J: Effects of dietary zinc on free radical generation, lipid peroxidation and superoxide dismutase in trained mice. *Arch Biochem Biophys*, (1991); 291. 15: 147-55
147. Gutteridge, JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* (1995); 41:1819-928
148. Kuyvenhoven JP, Meinders E: Oxidative stress and diabetes mellitus. Pathogenesis of long term complications. *Eur J Intern Med.* (1999); 10: 9-19
149. Petkau A: Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutase. *Cancer Treatment Rev.* (1986); 13: 17-44
150. Landis GN: Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Ech ageing dev.*, (2005); 126, 365-79
151. Armstrong DA: *Methods in molecular biology.*, Volume 108, Toronto, Humana pres., (1998); 29:235-89

152. McIntyre M, Bohr DF and Dominiczak AF: Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*, (1999); 34: 539-45
153. Fırat S: Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon , glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm.Tezi, Ankara, (1997); 95
154. Brigelius – Flohe R: Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, (1999); 27(9-10), 951-65
155. Halliwell B: Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc. Feb*; (1987); 46 (1): 13-26
156. Goldfarb A.H: Antioxidants: role of supplementation to prevent exerciseinduced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* (1993); 25: 232-336
157. Tiidus PM, Houston ME: Vitamin E status and response to exercise training. *Sports Med.*, (1995); 20: 12-23
158. Burton GW: Vitamin E. Molecular and biological function. *Proceeding of the Nutrition Society*, (1994); 53(2): 251-62
159. Mendez JA, Aguilar MR, Abraham GA, Vazquez B, Dalby M, Di Silvio L and San Roman J: New acrylic bone cements conjugated to vitamin E: curing parameters, properties, and biocompatibility. *J Biomed Mater Res*, (2002); 62: 299-307
160. Sies H, Stahl W and Sundquist AR: Antioksidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta carotene, and other carotenoids. *Ann. New York Acad Sci.*, (1992); 669: 7-20
161. Büyükakyüz N, Altuğ T, Yaltırık M: Kanser proflaksisinde antioksidan maddelerden E vitamini ve selenyumun önemi. *Dişhekimliğinde Klinik Derg.* (2000); 12: 136-9
162. Foster LH, Sumar S: Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev Food Sci.*, (1997); 37: 211-28
163. Gebre-Medhin M, Ewald U, Platin L: Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta Pediatr Scand.*, (1984); 73: 109-14

164. Vernie LN: Selenium in carsinogenesis. *Biochim Biophys Acta.*, (1984); 738: 203-17
165. Kohrle J, Jakob F, Contempre B and Dumont JE : Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev.* (2005); 26: 944–84
166. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ: Selenium in the immune system. *J Nutr*, (2003); 133: 1457–9
167. Hoffmann PR and Berry MJ: The influence of selenium on immune responses. *Mol Nutr Food Res*, (2008); 52: 1273–80
168. Spallholz JE, Boylan LM, and Larsen HS: Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*, (1990); 587: 123–39
169. Reid ME, Duffield-Lillico AJ, Sunga A, Fakhri M, Alberts DS, and Marshall JR: Selenium supplementation and colorectal adenomas: an analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *Int J Cancer*, (2006); 118: 1777–81
170. Kiremidjian-Schumacher L and Roy M: Selenium and immune function. *Z Ernährungswiss*, (1998); 37 Suppl 1: 50–6
171. Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, Hurst R. Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* (2011); Apr 1;14(7):1337-83
172. Yang G-Q: Research on selenium-related problems in human health in China. In *Selenium in Biology and Medicine Part B, 3rd Int. Symp.* Beijing, People's Republic of China, edited by Combs GF Jr., Spallholz JE, et al. New York: Van Nostrand Reinhold, (1987); 9–32
173. Turan B, Bayarı S, Balçık C, Severcan F and Akkaş N: Biomechanical and spectroscopic study of bone from rats with selenium deficiency and toxicity. *Biometals*, (2000); 13:113-21
174. MacFarquhar JK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson R, Wolkin A, Martin C, Burk RF, Dunn JR, Green AL, Hammond R, Schaffner W and Jones TF: Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Arch Intern Med*, (2010); 170: 256–61

175. Lech T: Suicide by sodium tetroxoselenate(VI) poisoning. *Forensic Sci Int*, (2002); 130: 44–8
176. Ghosh R, Mukherjee B and Chatterjee M: A novel effect of selenium on streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes Research*, (1994); 25 165–71
177. Ghose A, Fleming J and Harrison PR: Selenium and signal transduction: roads to cell death and anti-tumour activity. *Biofactors*, (2001); 14 127–33
178. Becker DJ, Reul B, Ozcelikay AT, Buchet JP, Henquin JC and Brichard SM: Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia*, (1996); 39 3–11
179. Battell ML, Delgatty HL and McNeill JH: Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, (1998); 179 27–34
180. Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, Ghosh R and Chatterjee M: Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (1998); 52 89–95
181. Karl JP, Alemany JA, Koenig C, Kraemer WJ, Frystyk J, Flyvbjerg A, et al.: Diet, body composition, and physical fitness influences on IGF-I bioactivity in women. *Growth Horm IGF Res* (2009); 19(6): 491
182. Marcello M, Gian PC, Fulvio L, Stefania B: Association of plasma selenium concentrations with total IGF-1 among older community-dwelling adults: The InCHIANTI study. *Clinical Nutrition*. (2010); 29: 674-7
183. Douillet C, Tabib A, Bost M, Accominotti M, Borson-Chazot F and Ciavatti M: Selenium in Diabetes: Effects of selenium on nephropathy in type I streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Elements in Exper Medic*, (1999); 12:379-92
184. Reddi AS and Bollineni JS: Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF- β 1 in normal and diabetic rats. *Kidney International* (2001); 59:1342-53
185. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, et al.: Bone grafting: Role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res*, (1985); 3: 389–404

186. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE: The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res.* (1991); 9:383-90
187. Einhorn TA: Current concepts review: Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg* (1995); 77A:940-56 (Inst.course lect.1996.vol 45:401-16)
188. Claes L, Willie B: The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Prog in Biophysics and Mol Bio.* (2006); 1-15
189. 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
190. Hannouche D, Petite H, Sedel L: Current trends in the enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg* (2001); 83B:157-64
191. Hatice O, Hanefi O: Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Derg.* (2007); 17(4):231-6
192. Ward DT, Yau KS, Mee AP, Mawer EB, Miller AC, Garland HO, Riccardi D: Functional, Molecular, and Biochemical Characterization of Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Am Soc Nephro.* (2001); 12: 779–90
193. Bassett CAL, Mitchell SN, Gaston SR: Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg* (1981); 63A:511-23
194. O’Sullivan ME, Bronk JT, Chao EYS et al: Experimental study of the effect of weight bearing on fracture healing in the canine tibia. *Clin Orthop Relat Res.* (1994); 302: 273-83
195. Kenwright J, Goodship AE: Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res.* (1989); 241:36-47
196. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* (1998); 355: 56-65
197. 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

198. Eckardt H, Christensen KS, Lind M, Hansen ES: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of nonunion. *Injury*. (2005); 36: 489-94
199. Schmidmaier G, Wildeman B, Ostapowicz D, Kandziora F: Long term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing: A safety study for using growth factors. *J Orthop Res*. (2004); 22: 504-19
200. 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
201. Bulut O, Eroglu M, Ozturk H, Tezeren G, Bulut S, Koptagel E: Extracorporeal shock wave treatment for defective nonunion of the radius: a rabbit model. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. (2006); Aug;14(2):133-7
202. Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, Günel İ: Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*.(1995); 66(5):473-5
203. Asman B, Wijkander P, Hjerpe A: Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium. *J Clin Periodontol*. (1994); Jan; 21(1): 45 -7
204. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR: Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. (1990); 85: 629-32