

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN SEGMENTER KEMİK DEFEKTİ MODELİNDE TROMBOSİTTEN
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ PLAZMANIN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mustafa Kemal AKÇA

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Egemen TURHAN

ZONGULDAK

2012

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN SEGMENTER KEMİK DEFEKTİ MODELİNDE TROMBOSİTTEN
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ PLAZMANIN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mustafa Kemal AKÇA

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Egemen TURHAN

ZONGULDAK

2012

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Sıçan Segmenter Kemik Defekti Modelinde Trombositten Zenginleştirilmiş Plazmanın Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi

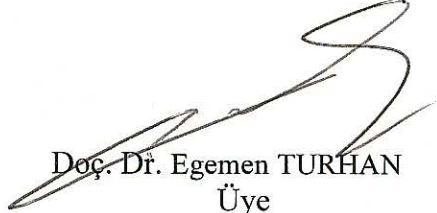
Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Mustafa Kemal AKÇA

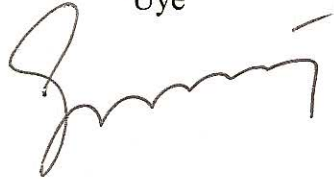
Tez Savunma Tarihi: 08/08/2012

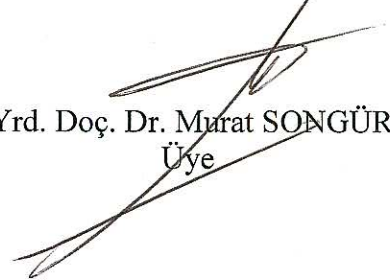
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Egemen TURHAN


Doç. Dr. Selçuk KESER
Jüri Başkanı

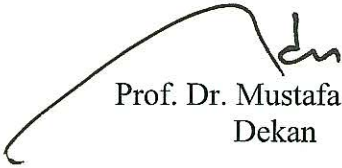

Doç. Dr. Ahmet BAYAR
Üye


Doç. Dr. Egemen TURHAN
Üye


Doç. Dr. Selda SARIKAYA
Üye


Yrd. Doç. Dr. Murat SONGÜR
Üye

UYGUNDUR
04/09/2012


Prof. Dr. Mustafa AYDN
Dekan

ÖNSÖZ

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim dalında asistanlığım süresince iyi bir uzman hekim olarak yetişmem için emeği geçen, maddi ve manevi her türlü yardımını esirgemeyen; bilgi ve klinik tecrübelerini benimle paylaşan ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocalarımdan sayın tez danışmanım Doç.Dr. Egemen Turhan'a, sayın Doç.Dr Selçuk Keser'e, sayın Doç. Dr. Ahmet Bayar'a, sayın Yrd. Doç.Dr. Murat Songür'e, eğitim süremi ilk 3.5 yılında beraber çalıştığımız hocam sayın Prof. Dr. Ahmet Ege'ye sonsuz minnet ve saygılarımı sunarım.

Asistan eğitimim boyunca üzerimde emeği yadsınamaz olan uzman abilerim başta Uzm. Dr. Bilal Koyuncu olmak üzere Uzm. Dr. Murat Altıntaş, Uzm. Dr. Güven Öztürk, Uzman Dr. Volkan Ünay' a ve asistanlığım boyunca gündüzlerimizde ve uzun icap gecelerimizde bazen gülerken bazen kızarak beraber çalıştığımız mesai arkadaşlarım asistan kardeşlerim Dr. Onur Kaymakçı, Dr. Ali Turan, Dr. M.Birol Ilgın ve Dr. Fatih Korbay'a;

Tez çalışmamdaki yardımlarından ötürü Patoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Doç.Dr. Sibel Bektaş'a, İstatistik Anabilim dalı'ndan Öğr. Gör. Füzün Köktürk'e;

Eğitim sürem boyunca gerek servis gerek poliklinik ve eğitim süremi çok büyük bir bölümünün geçtiği ameliyathanede birlikte çalıştığımız hemşire ve yardımcı sağlık personeli arkadaşlarıma;

Tez çalışmam sırasında benden her türlü desteklerini esirgemeyen ve tüm imkanlarını sunan Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlu veterineri ve personeline teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu günlere gelmemde en büyük emeği olan, sonsuz fedakârlıkla beni yetiştiren yaşamım boyunca benden her türlü desteğini esirgemeyen hep arkamda olan saygıdeğer fedakâr insanlar annem Hatice Akça, babam Doğan Akça'ya, kardeşlerim Hüseyin ve Emin'e ve hayatımın anlamı oğlum Oğuzhan Akça'ya şükranlarımı sunarım.

Dr. Mustafa Kemal AKÇA

Zonguldak , 2012

ÖZET

AKÇA Kemal M., Sıçan Segmenter Kemik Defekti Modelinde Trombositten Zenginleştirilmiş Plazmanın Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Tezi. Zonguldak, 2012

Giriş: Kırık iyileşmesinin gecikmesi ortopedi ve travmatoloji kliniğinin başlıca sorunlarından biridir ve özellikle defektif kemiklerde iyileşme gecikmesi veya kaynamama görülmektedir. Bu tez çalışmamızda defektif kemik dokunun iyileşmesinde ticari bir ürün olan ve klinik pratikte greft olarak sıkça kullanılan DKM ve otolog kandan da üretilebilen ve birçok büyüme faktörü içeren TZP'nın defektif kırık modelinde kırık iyileşmesi üzerine etkilerini inceleyeceğiz. Hipotezimiz; TZP defektif kırık iyileşmesinde olumlu etkisi olan yardımcı bir biyolojik ajandır.

Materyel-Metod:48 adet Albino-Wistar tipi rat önükili gruplar halinde dört gruba ayrıldı ve sağ önkollarında dorsal insizyon ile radiuslarına ulaşarak radiuslarında diafizden kemik çapının iki katı kadar defektif kemik modeli oluşturuldu. 4 adet rat ise işlem öncesi sakrifiye edilerek intrakardiyak kanları alındı ve uygun santrifüj işlemleri sonrasında TZP hazırlandı. İlk grup kontrol grubu olarak ayrıldı ve kostatom ile oluşturulan kemik defekti olduğu gibi bırakılarak primer kapatıldı. İkinci grupta defekt alanı TZP ile greftlendi ve primer kapatıldı. Üçüncü grupta defektif alan TZP+DKM kombinasyonu ile greftlenirken son grupta defekt alanı DKM ile greftlendi ve primer kapatıldı. İşlem sonrası onuncu haftada ratlar yüksek doz anestezi madde ile sakrifiye edilerek sağ önkolları diseke edildi, defekt alanı radyolojik ve histopatolojik parametreler ile incelendi.

Sonuçlar: Radyolojik olarak incelendiğinde TZP grubunda ve daha sonrada DKM grubunda kemikleşmenin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Histopatolojik inceleme sonucunda ise kaynama kalitesi açısından kontrol grubuna göre diğer grupların iyi olduğu fakat TZP grubunda kaynama kalitesinin diğer çalışma gruplarına göre daha iyi olduğu görülmüştür. Korteks gelişimi ve yeniden şekillenme açısından incelendiğinde TZP grubunda sonuçların daha iyi olduğu ve yeni kemik oluşumu açısından değerlendirildiğinde ise de TZP, TZP-DKM ve DKM gruplarının kontrol grubuna göre daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Tartışma: Bu bulgular eşliğinde değerlendirildiğinde defektif kemik iyileşmesinde TZP ve DKM'nin etkisinin aynı olduğu fakat birlikte kullanımında birbirlerinin etkilerini arttırmadığı kanaatine varılmıştır. TZP'nın otolog kandan ve ameliyathane şartlarında dahi üretebiliyor olması, ek bir maliyet ve ek morbiditeye neden olmaması nedeniyle ticari bir ürün olan DKM'nin bir alternatifi olabileceğini düşünmekteyiz.

Tez çalışmamız TZP'nın defektif kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkilerini gösteren in vitro şartlarda yapılmış bir hayvan deneyidir. TZP'nın klinik kullanıma girmesi için daha geniş klinik çalışmalar gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Kırık iyileşmesi, kemik defekti, TZP, DKM

ABSTRACT

AKÇA Kemal M., Effect of PRP on segmental bone defects: An experimental study. Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Tezi. Zonguldak, 2012

Introduction: Delayed union of the fractured bone is one of the main problems of the Orthopaedics and Traumatology practice. We hypothesized beneficial effects of allogeneic PRP would be valuable in treatment of segmental bone defects. In this study, we aimed to compare results of DBM and PRP on segmental bone defect model.

Materials- method: By the approval of local ethical committee, 48 Albino-Wistar type rats were separated into four consecutive groups. Segmental bone defect was created at right radius diaphysis by dorsal approach to all specimens. 4 additional rats were used as PRP source. Intracardiac blood withdrawal was made before the operation for allogeneic PRP preparation. Of 48 specimens, group I (n=12) as the control group, defect was left untreated. Group II (n=12), as the PRP group, was treated with grafting with PRP alone. Group III (n=12) as the PRP+DBM combination group, was treated with grafting with DBM and PRP mixture. Finally the last group, group IV (n=12) the defect area was grafted with DBM only. At the end of 10th week, specimens were sacrificed the forearms of the rats were dissected and the defect area was examined with radiological and histopathological parameters.

Results: Radiological evaluation revealed that the ossification was better in the PRP group followed by the DBM group. According to the result of the histopathological studies, union quality was better than control group in all treatment groups (group II, III and IV) but it was observed that union quality was best in PRP group among the others ($p<0,05$). When examined in the terms of cortex development and remodelling, it was also observed that the results were better in PRP group ($p<0,05$), however when examined in the terms of new osteogenesis, results were comparable in groups II, III and IV, but all better than the control group.

Conclusion: It was concluded that PRP and DBM have comparable effects on the recovery of the defective bones but there is no synergistic effect when used together. We believe that PRP can be a cost effective alternative to DBM with minimal morbidity and readily availability.

Keywords: Segmental Fracture Healing, Segmental Bone Defect, PRP, DBM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik Anatomisi	3
2.2. Kemik Zarları.....	3
2.3. Kemik Hücreleri	4
2.4. Kemik Gelişimi ve Büyüme	4
2.5. Kırık İyileşmesi.....	6
2.5.1. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler	10
2.5.2. Defektif Kemik İyileşmesi	13
2.6. Kemik Greftleri	13
2.6.1. Otolog Kemik Greftleri	15
2.6.2. Allogreftler	16
2.6.3. Demineralize Kemik Matriksi (DKM)	17
2.6.4. Seramik Matriksler	19
2.6.5. Kollajen	20
2.6.6. Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)(KMP)	21
2.6.7. Kemik Büyüme Faktörleri.....	22
2.6.8. Biyoaktif Camlar	24
2.6.9. Gen Tedavisi	24
2.6.10. Fibrin Yapıştırıcı	25
2.6.11. Trombosit Zengin Plazma (TZP)	26
2.7. Deneysel Hayvan Modelleri	34
2.7.1. Kemik Modelleri	35
2.7.2. Kırık İyileşmesi Modelleri	36

2.7.3. Tendon Modelleri	36
2.7.4. Enfeksiyon Modelleri.....	37
2.7.5. Osteoporoz Modelleri	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Trombositten Zengin Plazma Hazırlanması	40
3.2. Deney Modeli ve Cerrahi İşlemler.....	42
3.3. Radyolojik Değerlendirme.....	50
3.4. Histopatolojik İnceleme	51
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	52
4. BULGULAR	54
4.1. Radyolojik Değerlendirme Bulguları.....	54
4.2. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları	57
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ.....	68
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER	85
Ek 1: Etik Kurul Onayı	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: İntramembranöz Kemikleşme.	5
Şekil 2: Enkondral Kemikleşme.	6
Şekil 3: Kırık İyileşmesi Evreleri	7
Şekil 4: Kırık İyileşmesinin Fizyoloji	9
Şekil 5: İnsan Trombosit Elektron Mikroskopik Fotoğrafı	26
Şekil 6: Kullandığımız Ratlar.	39
Şekil 7: Ratlardan Elde Edilen ve TZP İçin Kullandığımız %3.2'lik Sodyum Citratlı Tüpteki Kanlar.	40
Şekil 8: Santifüj Aleti.	41
Şekil 9: İlk Santrifüj Sonrası Kanlar.....	41
Şekil 10: Ratlardan Elde Edilen TZP.	42
Şekil 11: DBM (DKM).....	43
Şekil 12: Anestezi Sonrası Ratın Cerrahiye Hazırlanması.	44
Şekil 13: Önkolun Tüylerden Arındırılmış Cerrahi İçin Hazır Hali.....	44
Şekil 14: Önkolun Batikon ile Cilt Antisepsisi Yapılması.	45
Şekil 15: Önkola Dorsal İnsizyon.....	45
Şekil 16: Önkola Dorsal İnsizyon Sonrası.....	46
Şekil 17: İnsizyon Sonrası Radiusun Diseksyonu.	46
Şekil 18: Radiusun Ortaya Konması.	47
Şekil 19: Radiusta Yapılan Defekt.	47
Şekil 20: Defekte TZP Uygulanması.	48
Şekil 21: Defektin DKM ile Greftlenmesi.....	48
Şekil 22: Cilt İnsizyonunun Kapatılması.....	49
Şekil 23: Cerrahi İşlem Sonrası Rat.	49
Şekil 24: Cerrahi İşlemler Sonrası Ratların Barındırılması.	50
Şekil 25: Kemik Defekti Yapmak İçin Kullandığımız Kostatom.....	50
Şekil 26: Kontrol grubu, önkol AP grafi	55
Şekil 27: TZP grubu, önkol AP grafi.....	55
Şekil 28: TZP+DKM grubu, önkol AP grafi	56
Şekil 29: DKM, önkol AP grafi.....	56
Şekil 30: Radyolojik Değerlendirme Sonuçlarının Grafikselsel Dökümü.	57
Şekil 31: Salkeld Sınıflamasına Göre Kaynama Kalitesi Skorlarının Grafikselsel Dökümü. .	58

Şekil 32: Salkeld Sınıflamasına Göre Korteks Gelişimi ve Yeniden Şekillenme Skorlarının Değerlendirme Sonuçları.	59
Şekil 33: Salkeld Sınıflamasına Göre Yeni Kemik Oluşumu Skorlarının Değerlendirme Sonuçlarının Grafiksel Dökümü.	60
Şekil 34: Kontrol Grubuna Ait Örnekte Defekt Bölgesi Fibröz Doku (ok) İle Dolmuştur, Korteks Oluşumu Yoktur.	60
Şekil 35: TZP Grubuna Ait Örnekler.	61
Şekil 36: TZP+DKM Grubuna Ait Örnekte Defekt Bölgesi Fibrokartilajinöz Doku (ok) ile Dolmuştur, Korteks Oluşumu Yoktur.	62
Şekil 37: DKM Grubuna Ait Örneklerde Defekt Bölgesi Kartilajinöz Doku (ok) ile Dolmuş, Çevresinde Minimal Yeni Kemik Oluşumu Gelişmiştir, Korteks Oluşumu Yoktur.	62

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Tespit Yöntemlerine Göre Kırık İyileşmesi Çeşitleri	8
Tablo 2: Kemik Greftlerinin Özellikleri.....	15
Tablo 3: Otolog Kemik Greftleri Özellikleri.....	16
Tablo 4: Kemik İyileşmesinde Büyüme Hormonlarının Ana Etkileri.....	22
Tablo 5: Trombosit Granül İçerikleri	27
Tablo 6: Deney Grupları.....	43
Tablo 7: Radyolojik Değerlendirme Cetveli	51
Tablo 8: Histolojik Değerlendirme Cetveli	52
Tablo 9: Çalışma Gruplarında Radyolojik Değerlendirme Skoruması Sonuçları.	56
Tablo 10: Salkeld Sınıflamasına Göre Kaynama Kalitesi Skorumasının Değerlendirme Sonuçları.	57
Tablo 11: Salkeld Sınıflamasına Göre Korteks Gelişimi ve Yeniden Şekillenme Skorumasının Değerlendirme Sonuçları.	58
Tablo 12: Salkeld Sınıflamasına Göre Yeni Kemik Oluşumu Skorumasının Değerlendirme Sonuçları.	59

1. GİRİŞ

Kırık, kemik ve ilgili yumuşak dokuların iç ve dış kuvvetlere bağlı olarak bütünlüğünün tam veya kısmen bozulması olarak tanımlanmaktadır (1).

Kırık tedavisi tarih boyunca genel bir sağlık sorunu olarak ele alınmış ve araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Hipokrat'ın eserlerinde de kırık ve yumuşak doku travmaları ve tedavileri ile ilgili bilgilere sıkça rastlanmaktadır. Günümüzde artan trafik ve iş kazalarının yanı sıra yaşlı nüfusun da artması nedeniyle kırık iyileşmesi önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Kemik iyileşmesi tıpta birçok disiplini ilgilendirdiği için literatürde en fazla çalışılmış konulardan biridir. Ortopedi ve Travmatoloji kliniğinin en sık karşılaşılan pratiği olan kırıklarda başlıca hedefler kırığın konservatif veya cerrahi olarak en kısa zamanda müdahale edilmesi, mümkün olan en kısa sürede iyileşmesinin sağlanması ve hastanın mobilizasyonunun sağlanıp sosyoekonomik olarak kendi hayatına devam ettirmek esas amaçtır (2). Kırık iyileşmesi birçok etkenin karmaşık bir sırayla, lokal ve sistematik etkisiyle oluşmaktadır.

Kırıkların tedavisinde günümüzde gelişen teknolojiler, yeni bilgiler ve cerrahi tekniklere rağmen hala %10 civarında kaynamama problemleri görülmektedir. Özellikle geniş yumuşak doku hasarlı, segmental, defektli veya periost hasarı eşlik eden kırıklarda kaynamama problemleri daha sık beklenmektedir. Kırık iyileşmesinin olmadığı veya gecikeceği tahmin edilen durumlarda kırık iyileşmesi için altın standart olarak otolog kemik greftleri kullanılmaktadır. Otolog kemik greftleri altın standart olmasına rağmen donör alan morbiditesi ve alınabilen miktarın sınırlı olması bu yöntemin olumsuz yönleridir (3). Otolog greftlerin bu dezavantajları nedeniyle kemik iyileşmesinde otolog greftlerin yanında allogreftler, ksenogreftler, altın, gümüş gibi sentetik metaller de kullanılmaktadır. Ancak bu greftlerin kullanımına bağlı olarak da enfeksiyon, rezorbisyon, doku reaksiyonu gibi yan etkiler görüldüğü gibi maliyetleri de yüksektir (4,5).

Greftlere bağlı gelişen bu yan etkilerden kurtulmak için geniş defekti bulunan kırıkların daha hızlı iyileşmesini sağlanması ve defektif alana konulan greftlerin dokuya entegrasyonun hızlandırılması amacıyla günümüzde lokal büyüme hormonlarının kırık iyileşmesi üzerine etkilerini ele alan çalışmalar yapılmaktadır. Rekombinant teknoloji ile üretilen hormonların kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkileri in vitro olarak ispatlanmış olmasına rağmen bu hormonların pahalı olması ve üretiminin zor olması nedeniyle günümüzde klinik pratik kullanım alanı bulamamıştır (6-8).

Trombositten Zengin Plazma (TZP); Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEBF), Transforming büyüme faktörü alfa ve beta (TGF α - β), Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Epidermal growth factor (EGF), İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve lokal büyüme faktörlerini içeren ve kanın iki defa farklı devirlerde santrifüjü ile elde edilen bir maddedir. Teorik olarak tüm büyüme faktörlerini içeren TZP'nın kırık iyileşmesi üzerinde olumlu yönde etkisi olmasını düşünmekteyiz. Son dönemlerde yapılan TZP'nin otolog kandan kolay elde edilebiliyor olması da klinik çalışmaların bu konu üzerine odaklanmasına neden olmuştur. Yapılan klinik çalışmalarda yara iyileşmesini hızlandırdığı, ödemi ve şişliği azalttığı, kanama kontrolünde yardımcı olduğu gösterilmiştir (9-15).

Bizim bu tezdeki hipotezimiz; TZP defektif kırık iyileşmesinde olumlu etkisi olan yardımcı bir biyolojik ajandır. Çalışmamızda her ratdan otojenik kan alınıp TZP hazırlamamız teknik olarak mümkün olmadığı için allojenik TZP kullanılmıştır. Otolog kandan da üretilen, ucuz ve kullanımı kolay olan ve içinde birçok büyüme faktörü içeren TZP'yı tek başına ve başka osteoindüktif ajanlarla kombine ederek defektif kırık iyileşmesine etkilerini radyolojik ve histolojik ölçütler doğrultusunda araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Anatomisi

Kemik embriyolojik olarak mezenşimal hücrelerden köken alan enkondral ya da membranöz kemikleşme yolu ile farklılaşan bir dokudur. Yapısı ve içeriği şahsın yaşına, bulunduğu yere ve mekanik özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. İnsan vücudunun en sert dokularından biridir. Kemiğin gerilim direnci nerdeyse demire eşit olmakla beraber demirden 3 kat daha hafif ve on kat daha esnektir. İskelet sisteminin asıl fonksiyonu kaslar ve yumuşak dokulara yapısal ve mekanik destek sağlamaktır. Torakal, abdominal organlara ve beyine koruma görevi görür, vücut elektrolit dengesinde önemli bir rolü vardır, kan yapımında ve rezervuarında görev alır (16-18).

Kemik; bir çatı içerisinde bütünleşmiş birçok hücreden oluşan, metabolik ve biyolojik yönden aktif bir dokudur. Bu özelliği dikkate alındığında büyümesi ve iyileşmesi birçok biyomekanik, biyokimyasal, hücresel, hormonal ve patolojik olayların zincirleme reaksiyonuna bağlı olarak gelişir.

2.2. Kemik Zarları

Periosteum eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği kaplayan vasküler konnektif bağ dokusu tabakasıdır. Kemiğin beslenmesi, tamiri, gelişimi ve desteğinde önemli bir rolü vardır. Yapısında temel olarak kollajen ve elastik lifler bulunur. Tendonlar Sharpey lifleri denen kollajen uzantılar ile kemiğe bağlanmaktadır. Periosteum bol damar içeren, iki tabakalı bir zardır. Kalın dış tabaka ‘fibröz tabaka’ olarak adlandırılır ve düzensiz yoğun konnektif dokudan oluşmaktadır. Daha ince ve zayıf iç tabaka ise ‘osteojenik tabaka-cambium’ olarak bilinen hücreden zengin, gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Tabakaların her birinin ayrı fonksiyonu vardır. Dış tabakası kemiğin metabolizmasında rol alan damarları ve lenfatikleri içerir. İç tabaka ise kemik hasarında osteoblastlar haline dönüşerek kemik tamirine katkı sağlamaktadır (16,19).

Endosteum tabakası kemik içindeki bütün kaviteleri kaplayan ince bir tabaka olup tek tabaka osteojenik hücrelerden oluşmaktadır. Bu tabakanın osteojenik özelliği olmasının yanı sıra hematopoetik hücre yapabilme özelliği de vardır.

2.3. Kemik Hücreleri

- Osteoprogenitör hücreler
- Osteoblastlar
- Osteoklastlar
- Hematopoetik hücreler, olmak üzere dört çeşit kemik hücresi tanımlanmıştır.

Osteoprogenitör hücreler, mitozla büyüeyebilen, mezenşimal kök hücrelerinden kaynaklanan, kemik yapıcı hücreler olup, osteoblastlara farklılaşabilen dokulardır. Kemik büyümesi ve kırık iyileşmesi durumlarda aktif hale gelerek bölünüp osteoblastlara farklılaşabilirler. Periostun derin tabakasında, havers kanallarında ve endotelyumda bulunurlar (16,19).

Osteoblastlar, matür, metabolik yönden aktif, uyarıldığında tip 1 kollajen ve kemik organik matriks yapımından sorumlu hücrelerdir. Ayrıca KMP(BMP-Bone Morphogenic Protein), TGF Beta, IGF-1, IGF2, IL 1, PDGF gibi sinyal proteinlerini salgırlar (16,19).

Osteositler, matrikste lakünalar içinde yerleşmiş olgun osteoblastlardır. Lokal faktörlerden etkilenecek şekilde siklik adenosin monofosfat (cAMP), osteokalsin ve IGF salgırlar. Ayrıca kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun düzenlenmesinde rolleri vardır (16,19).

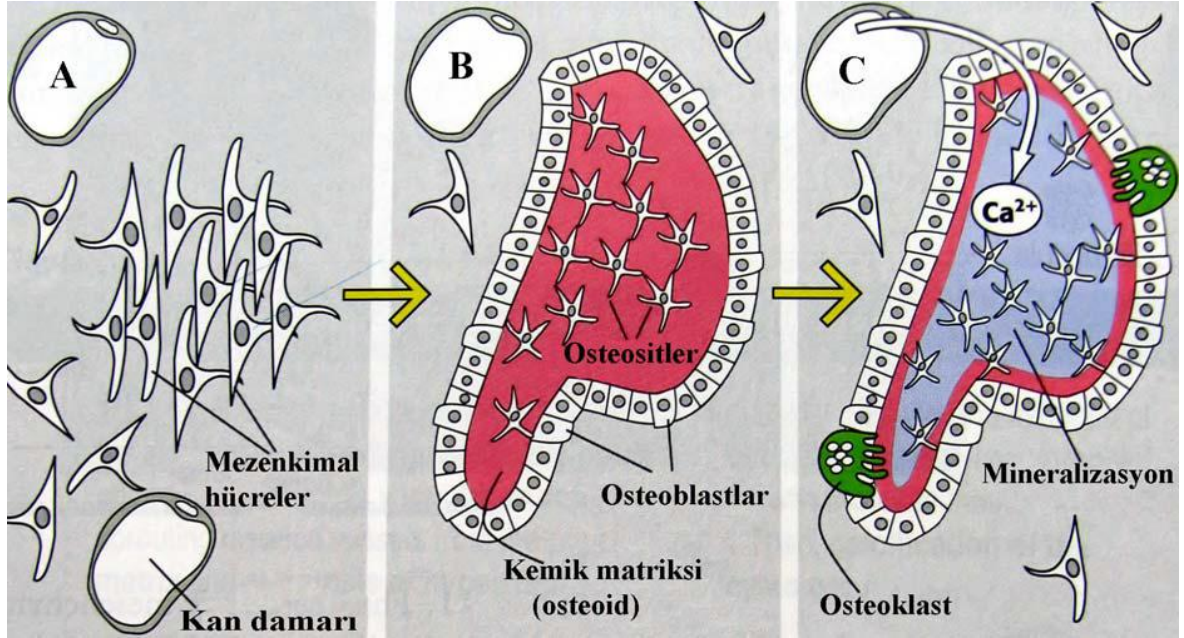
Osteoklastlar; hormonal ve hücrel mekanizmaların etkisinde, monosit öncülerinden oluşmuş dev hücrelerdir. Kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri içerirler. Kemik yapımı ve şekillenmesinde osteoblastlar ile birlikte aktif rol oynarlar (16,19).

2.4. Kemik Gelişimi ve Büyüme

Kemiklerde gelişim ve büyüme embriyolojik dönemde başlayıp erişkin hayata kadar devam etmektedir. Bağ dokudan kaynaklanan intramembranöz kemikleşme, kırık dokunun katılımıyla gerçekleşen endokondral kemikleşme ve osteoblastların direkt etkisiyle oluşan apozisyonel kemikleşme olarak üç tip büyüme paterni vardır.

Intramembranöz kemikleşme; direkt olarak mezenşimal bağ dokusundan yeni kemik gelişimidir. Vücudumuzda kafatası, sternum gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın process koronoideus ve simfizisi dışındaki bölgelerde ve kısa

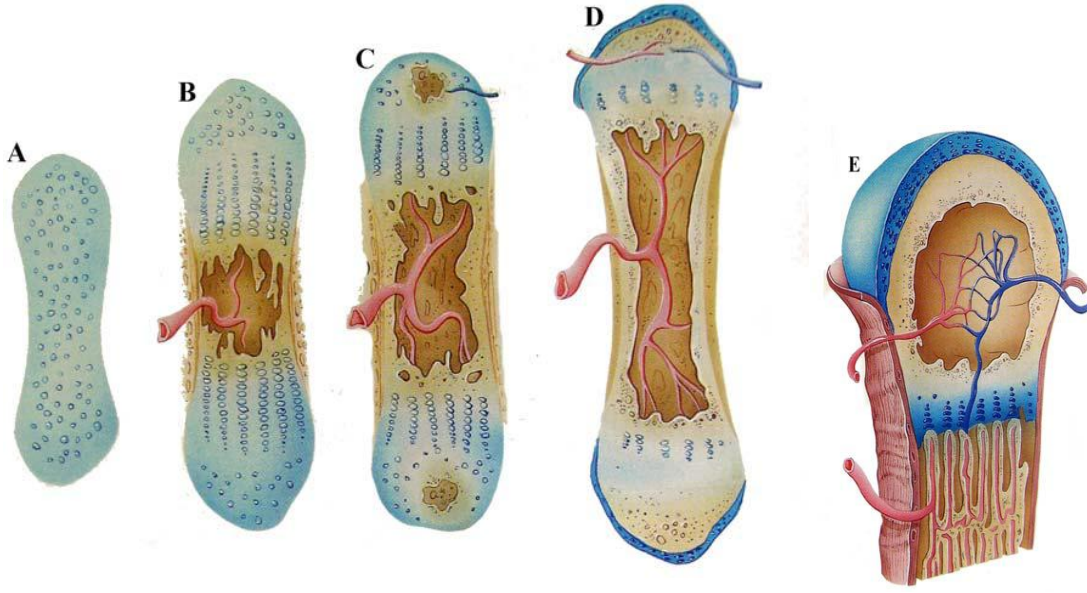
ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında bulunur. Kemiklerin enlemesine büyümesinde ve kırık iyileşmesinde de görülür. Mezenşim hücreleri uyarı ile önce hızlı bölünme gerçekleştirir ve osteoprogenitör hücrelere farklılaşır daha sonra da osteoblastlara dönüşerek matrisi oluştururlar (16,19,20)(Şekil 1).



A: Mezenkimal dokulardan direkt olarak kemik şekillenmesidir. B: Mezenşim hücreleri hızlı bölünme gösterir ve önce osteoprogenitör hücrelere daha sonrada osteoblastlara dönüşerek kemik matrisini şekillendirir. C: Kılcal damarlardan osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonları taşınıp, osteoblastların salgıladığı alkalin fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. Osteoklastlar kemikleri iç yüzlerinden rezorbe ederken osteoblastlar da yeni kemik lamelleri eklerler. Birincil kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar, geriye sadece ikincil kemik yapısındaki trabeküller kalır (21). (Kierszenbaum A.L. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 1st ed. Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 131, 2002'den alınmıştır).

Şekil 1: İntramembranöz Kemikleşme.

Enkondral kemikleşme, hiyalin kıkırdak bir modelden başlayıp kemik dokusuna dönüşen kemikleşme tipidir ve vücuttaki kemikleşmenin en önemli yöntemi olup kemik yapımında, uzunlamasına büyümede ve kırık iyileşmesinde rol oynar. Fizislerdeki büyüme ve kırık sonrası meydana gelen sekonder iyileşme örnekleridir. Fizisde depo tabakası, çoğalma (proliferatif) ve hipertrofik tabakalar olarak 3 tabakadan oluşur. Bu tabakalardan kalsifiye olmuş kemik modeli daha sonra zamanla süngerimsi ve sonra da lameller kemik yapısına dönüşüm gösterir (16,19,20,22)(Şekil 2).



(A) Hyalin kıkırdak model (B) Diyafiz kıkırdağını örten perikondriyumun iç katındaki mezenkim hücreleri osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar üst üste yerleşen kemik lamellerini yapar. Böylece yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında kemik dokusu oluşur. (C) Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesini bozarak, kondrositlerde atrofiye, ardından ölümlerine neden olur. Kıkırdak modelin ortasında kemik iliği kavitesi oluşur. (D) Kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar. (E) Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece epifiz plağı kalır (22)(Gartner LP, James LH: Color Atlas of Histology, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Chapter 4, page 73, 2000'den alınmıştır).

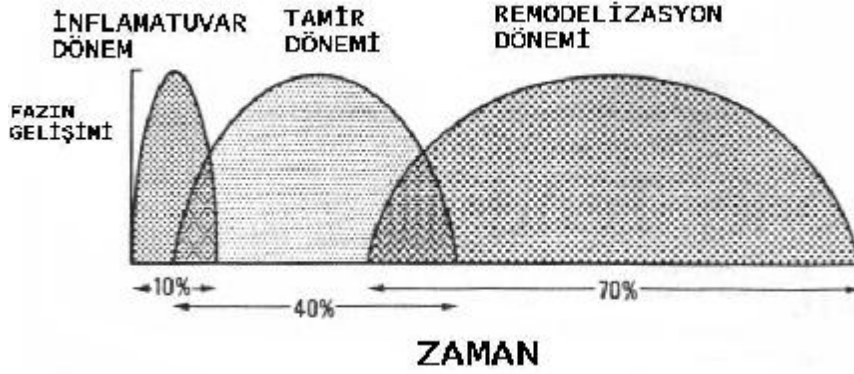
Şekil 2: Enkondral Kemikleşme.

Apozisyonel kemikleşme, kemiklerin enine büyümesinde ve kırık sonrası remodalizasyon sırasına görülür. Enkondral ve intramembranöz kemikleşmenin aksine periost kemik yüzeyinde bulunan osteoblastlar ile gerçekleşir. Bu hücreler ilerde kemik dokusuna dönüşecek olan bağ dokusu niteliğindeki osteoid dokuyu sentezler ve böylelikle tabakalar halinde lameller kemikler oluşur.

2.5. Kırık İyileşmesi

Organizmada hasar gören dokular esas olan fibröz bir doku ile iyileşir. Bunun vücuttaki istisnalarından biriside kemiklerdir. Kemiklerde skar dokusu bırakmadan şekil ve fonksiyon olarak orijinaline en yakın şekilde iyileşme olmaktadır. Bu tamir süreci karmaşık bir yapı içermektedir ve aynı zamanda oldukça düzenli basamaklardan meydana gelmektedir. Kırık iyileşmesi histolojik olarak değerlendirildiğinde hematoma oluşumu, inflamasyon, onarım, yeniden şekillenme olmak üzere ayrılmış sıralı ve birbirini takip eden fazları içerir (23)(şekil 3). Teknolojinin ilerlemesiyle hücresel ve moleküler inceleme

alanındaki gelişmeler ile birbirinin izleyen bu fazlar daha da iyi anlaşılmıştır. Bu sayede de kırık iyileşmesi, kaynamama veya gecikmiş kaynama tedavisinde yeni gelişmeler olmaktadır.



(Miller MD. Bone. In: Miller M (Ed) Review of Orthopaedics. Saunders, Philadelphia. 2004'den alınmıştır)

Şekil 3: Kırık İyileşmesi Evreleri (31).

Kırık iyileşmesinde kemiğin medüller kanal ve kırık uçları arasındaki mesafe, periost-dokusu ve çevre yumuşak dokular önemli yapılardır. Periost ve çevre yumuşak dokular intramembranöz kemikleşme ile sert kallusu oluştururken, medüller kanal ve interkortikal alan ise enkondral kemikleşme ile yumuşak kallusu oluşturur.

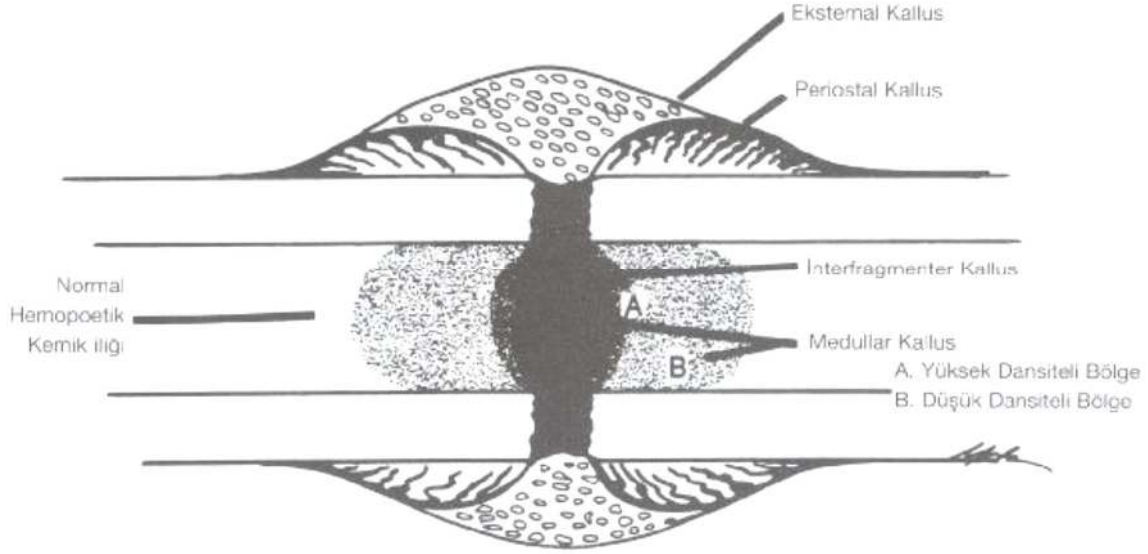
Kırık iyileşmesi klasik olarak 2 tipe ayrılmıştır. Bunlar, birincil (direkt) ve ikincil (indirekt) kırık iyileşmeleridir. Birincil kırık iyileşmesi anatomik redükte edilip uygun stabilizasyon sağlanmış durumlarda gerçekleşirken; ikincil tipte iyileşme anatomik olmayan tespitler ve rijit olmayan tespitler sonrasında mikro hareket ile beraber olur ve kaynamaların büyük bölümünü oluşturur. Birincil iyileşme daha çok AO grubunun belirttiği açık redüksiyon ve rijit tespit sonrası görülmektedir (24,32).

Tablo 1: Tespit Yöntemlerine Göre Kırık İyileşmesi Çeşitleri (31)

STABİLİZASYON TİPİ	BASKIN İYİLEŞME TİPİ
Alçı (kapalı tedavi)	Periosteal köprüleşen kallus ve interfragmanter enkondral kemikleşme
Kompresyon plağı	Birincil kortikal iyileşme
İntramedüller çivi	Erken: Periosteal köprüleşen kallus, enkondral ossifikasyon Geç: Medüller kallus
Eksternal fiksator	Rijiditenin uzunluğuna 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

(Miller MD. Bone. In: Miller M (Ed) Review of Orthopaedics. Saunders, Philadelphia. 2004'den alınmıştır).

Birincil kemik iyileşmesi, doğrudan kortikal remodilazasyon yoluyla dış kallus olmadan sadece iç kallus oluşumuyla gerçekleşir. Osteoklastlar kırık hattında tünel açarlar ve neoanjiogenez vasıtasıyla oluşan yeni kan damarları ve osteoblastlar bu tünelden ilerleyerek kortikal kemiği oluşturur (24,32).



(Miller MD. Bone. In: Miller M (Ed) Review of Orthopaedics. Saunders, Philadelphia. 2004' den alınmıştır.)

Şekil 4: Kırık İyileşmesinin Fizyoloji (31)

İkincil kemik iyileşmesi; 1.yangı (enflamasyon) 2.Onarım (reperasyon) ve 3. Yeniden yapılanma (remodelling) safhalarını içerir. Yangı evresinde kemik, kemik iliği, periost ve çevre yumuşak dokuların damarlarındaki hasarlara bağlı olarak hematom gelişir. Hematom oluşumu kırık iyileşmesinin ilk basamağıdır ve ikincil kırık iyileşmesinde önemli rol oynar. Hematom yumuşak dokular ile sınırlanır ve mevcut hematom basıncı kırık uçlarının bir arada tutulmasına katkıda bulunur. Açık kırıklarda veya açık cerrahi ile redüksiyon ve tespit yapılan kırıklarda kırık hematomunun dışarıya boşalması nedeniyle kırık iyileşmesi bozulabilir. Kırık hematomundan bir fibrin iskelet tabaka oluşur. Kırık hematomu içindeki trombositlerden büyüme faktörleri ve diğer proteinler salınır. Bu faktörlerin (trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve dönüştüren büyüme faktörü–beta (TGF- β)) damar yapımı, kemotaksi ve hücre düzenlenmesinde aktif rolleri vardır (24,32-34).

Kırık ile meydana gelen kemik ve periosttaki damarsal yaralanmalar nedeniyle kırık hattında kan akımı bozulur ve ortamda hipoksi gelişir. Buna bağlı olarak ortam pH'sı asidik hale gelir, oksijenizasyon düşer ve ortama kırık iyileşmesini de başlatan sitokinler salınır. Bu sitokinlerin çoğu damar yapımında uyarıcı etkisi vardır (31).

Yeniden damarlanma ve enflamatuvar olaylar ile mezenkimal hücreler uyarılır ve ortam kallus oluşumu için hazırlanır. Kırık hematomu 48 saat için organize olarak fibrin yumağı haline gelir.

Onarım evresi kırık oluştuktan hemen sonra başlar ve yapısal olarak tipik hale gelmesi 7-12 gün sürer. Bu evrede lokal medyatörler vasıtasıyla öncü hücreler, yeni damar oluşumu, fibroblast, destek maddeleri, hücreler arası maddelere farklılaşmaya ve oluşmaya başlar. Bu aşamada prostoglandinlerin etkisi ile yeni osteoklast oluşumu ve mevcut osteoklastların aktivasyonu ile fibroblastlar kollajen, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteosite dönüşür. Bu dönemde osteoid sekresyonu ve mineralizasyonu oluşur. Bu süreç yaklaşık 4-6 hafta sürer ve bu süreç zarfında kallusun harekete karşı direnci düşüktür. Bu nedenle bu dönemde tespitin önemi büyüktür. Kırık iyileşmesinin ilk fazında periosteal damarlar ile ileri dönemlerde besleyici damarlar aktif rol oynar. Zamanla kallus ossifiye olur ve kırık uçları arasında örgülü kemik oluşur. Bu dönemde uygun immobilizasyon ve tespit yapılmazsa kallusta uygun ossifikasyon olmaz ve fibröz instabil iyileşme olur (24,32,33,35).

Kemik iyileşmesi en son dönemi olan ve aylar yıllar süren yeniden yapılanma evresi ile sonlanır. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal ya da normale yakın güçteki daha düzenli olan lameller kemiğe dönüşmesi ile gerçekleşir.

1892’ de Wolf iskelet sistemi yapısının mekanik streslerine göre uyum gösterdiğini ve kendi adıyla anılan Wolf kanunu tanımlanmıştır. Wolf kanununa göre kemik taşıdığı yüklere göre kemik dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü negatif elektrikle yüklenir ve negatif elektrikle yüklenen konkav yüzde osteoblastik aktivite, pozitif yükle yüklenen konveks tarafta ise osteoklastik aktivite hakimdir. Yani kırığın konkav yüzünde kemikleşme konveks yüzünde ise kemik rezorbsiyonu olur (20,24,32).

2.5.1. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Uygun tedaviye rağmen bazı kırıklar yavaş iyileşmekte bazen de iyileşememektedir. Kırık iyileşmesinin süresini tahmin etmek ve önceden öngörmek oldukça güçtür. Beklenenden daha yavaş ilerleyen kırık iyileşmesine gecikmiş kaynama, iyileşmenin durmasına da kaynamama denir. Kaynamamanın radyolojik değerlendirmesinde kırık hattına kallus dokusunun görülmemesi durumunda atrofik kaynamama, çok miktarda kallus dokusu olmasına rağmen kaynamanın olmaması durumunda ise hipertrofik kaynamama olarak adlandırılır. Bazı kaynamama olgularında kırık hattı seviyesinde kırık dokusu oluşur ve kırık hattı kavite oluşturarak içine eklem sıvısına benzer bir sıvı ile dolar ve buna yalancı eklem veya psödoartroz denir. Kırık hattının fibröz veya fibrokartiloginoz doku ile

dolmasına da fibröz kaynamama denir ve bu durumda kırık uçları birleşmiştir fakat yeterli derecede stabilizasyon sağlanamaz.

Kaynamayı etkileyen faktörleri hastaya bağlı, travmaya bağlı, dokuya bağlı ve tedaviye bağlı faktörler olarak sınıflanabilir.

Travmaya bağlı faktörler;

Açık kırık; yumuşak doku hasarı, kırık deplasmanı, enfeksiyon ve ileri derecede kemik kaybı.

Eklem içi kırık; eklem hareketleri ve eklem yük taşıma kuvvetleri iyileşmede gecikmeye neden olabilir.

Travma şiddeti; kemik ve yumuşak doku hasarının şiddeti iyileşmeyi etkilemektedir. Segmenter kırık olması veya yumuşak doku interpozisyonu da iyileşmeyi geciktirmektedir.

Hastaya bağlı faktörler:

Yaş: Hasta yaşı kırık iyileşmesinde önemli bir etkindir. Çocuklarda kırık iyileşmesi en hızlı iken yaş ve iskelet olgunlaşması arttıkça kırık iyileşmesi yavaşlamaktadır (37).

Sistemik hormonlar: Özellikle kortikosteroid kullanımı kırık iyileşmesinde mezenkimal hücre düzeyinde osteositlere farklılaşmayı inhibe ederek iyileşmeyi engellemektedir. Kalsitonin, anabolik steroid ve insülinin kırık iyileşmesi üzerine etkileri gösterilmiştir. Hipervitaminoz D, rikets ve diyabetinde kırık iyileşmesi üzerine negatif etkileri olduğu gösterilmiştir. Genel olarak yapılan çalışmalarda endokrinolojik bozukluklar kırıkta kaynamama yapmadığı fakat kaynamayı geciktirdiği gösterilmiştir (17,31).

Beslenme: Kırık iyileşmesinin tüm fazlarında yüksek enerji gereksinimi olması nedeniyle hastanın metabolik durumunun kaynama üzerine etkisi vardır. Travma sonrası gerekli olan artmış beslenme ihtiyacının karşılanamaması durumunda enfeksiyon, cerrahi komplikasyonlarda artış, gecikmiş kemik iyileşmesi, kötü rehabilitasyon ve hatta mortalite meydana gelebilmektedir. Kalça kırığı geçiren 490 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada ise hastaların 87'sinde (%18) malnutrisyon tespit edilmiş ve bu hastaların hastanede yatış sürelerinin daha uzun olduğu izlenmiştir (34).

Nikotin ve diğer medikal ajanlar: Yapılan çalışmalarda sigara içenlerde kırık iyileşmesinin geciktiği veya olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca onkolojik ajanlarında kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir (34).

Tedaviye bağlı etmenler:

Yüklenme ve mikro hareket: Kırık iyileşmesinde yüklenme ve mikro hareketin önemli olduğu ve kaynamayı stimüle ettiği ve yüklenmenin azaldığı durumlarda da kaynamanın yavaşladığı gösterilmiştir (34).

Kırık tespiti:

Kırık fragmanlarının traksiyon, alçı, eksternal veya internal fiksatörler ile tespit edilmesi ile iyileşme dokusu dış etkenlerden izole edilir. Eğer stabilizasyon uygun ve yeterli olmazsa kırık hattında oluşabilecek aşırı hareket, tekrarlanan manüplasyonlar ve geç harekete başlanması nedeniyle gecikmiş kaynama veya kaynamama görülebilir.

Alçı veya traksiyon ile yapılan tespitte karşılık implantlar ile yapılan tespitlerde çok daha rijit bir tespit sağlanmaktadır. Eğer bir kırıkta sert bir implant ile rijit tespit yapılsa dahi rijit tespitin kırık kaynamasını hızlandırmak gibi bir etkisi yoktur. Bununla birlikte eklem içi kırıklarda, radius ve ulna shaft kırıklarında ve bazı metafizodiafiz kırıklarda rijit ve anatomik tespit gerekmektedir (24).

Kırıklarda rijit tespitin avantajları yanında bazı dezavantajları da görülmektedir. Rijit tespit ile kemiklerde yeniden şekillenme ve kemik yoğunluğu azalmaktadır sonrasında ve bu rijit implantların çıkarılması ile kemikte yeni kırık olma ihtimali olmaktadır.

Kırık uçlarının pozisyonu: Kırık uçlarının redüksiyonunun sağlanması ve aradaki mesafenin azaltılması iyileşme üzerine olumlu etkilidir. Yumuşak doku ve periostun sağlam kaldığı kırıklarda iyileşme daha hızlı olmaktadır.

Tedavinin iyileşmeye etkisi: Çoğu kırıkta özellikle çocuk kırıklarında optimal tedavi olmadan da kaynama potansiyeli yüksektir. Fakat cerrahi sırasında yumuşak dokulara ve periosta hasar vermemek ve uygun olmayan implantlar ile uygun olmayan veya yetersiz tespitler yapmak da kırık iyileşmesini geciktirmekte hatta kaynamamaya neden olmaktadır.

2.5.2. Defektif Kemiğin Biyolojik İyileşmesi

Kemik dokusu rejenerasyon özelliğine sahiptir. Yaralanan kemik dokusu şekil ve fonksiyonunu yeniden kazanabilmesine rağmen yaralanma boyutu büyük olduğu zaman iyileşme sınırlı kalmaktadır. Kritik boyutta kemik defekti; organizmanın hayatı boyunca kendiliğinden tam olarak kemiksel iyileşme ile onaramadığı defekt olarak tanımlanmaktadır (25). Kendiliğinden kapanması mümkün olmayan defektler için altın standart olarak otojen kemik grefti kullanılması önerilmektedir. Bu yöntem de morbiditeye yol açması ve stok yetersizliği nedeniyle her zaman kullanılamayabilir. Günümüzde yapılan çalışmalarda kritik boyuttaki kemik defektinin tedavisi büyüme ve farklılaşma faktörlerini içeren kemik yapıcı ajanlar kullanılmaya başlanmıştır.

Ortopedik cerrahide konjenital ve kazanılmış defektlerin tedavisi ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Travma, tümör, osteomyelit veya implant yetmezliği sonrası gelişebilecek büyük kemik defektleri için cerrahi tedaviler gerekmektedir (26-28). Defektlerin iyileşmelerini hızlandırmak için defektin % 30-90 arasında veya daha fazlasını dolduracak değişik osteoindüksiyon yöntemleri tanımlanmıştır (29).

Rekonstrüksiyonlar için otogreftler, allogreftler, kemik yerine kullanılan diğer biyomateriyaller ve kallus distraksiyonu kullanılmaktadır. Hematopoetik kök hücreler içeren taze otolog kansellöz greftler için bu iş için kullanılan en iyi materyaldir (30).

2.6. Kemik Greftleri

Travma, kemik enfeksiyonları, konjenital anomaliler, kas iskelet sistemi tümör cerrahisi, revizyon artroplasti cerrahisi veya spinal cerrahi gibi rekonstrüktif işlemler sırasında meydana gelecek kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla kemik greftleri veya kemik yerini alabilecek materyaller kullanılmaktadır (38,39).

Otogreft, allogreft veya ksenogreftler haricinde greft yerine geçecek seramikler (doğal veya sentetik), demineralize kemik matriksi (DKM), BMP (KMP) (Kemik Morfolojik Protein), otolog kemik iliği, büyüme faktörleri ve kompozit greftler tercih edilebilir.

Kemik greftlerinin biyolojisini anlamak için çeşitli kavramların bilinmesi gerekir: (40,41).

Osteointegrasyon: Greftin arada fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde alıcı kemik üzerinde biyolojik olarak tutunmasıdır.

Osteokondüksiyon: Alıcı kemikten vasküler ve perivasküler yapıların grefte ilerlemesi için greftin çatı görevi görerek alıcı kemik üzerine biyolojik olarak tutunmasıdır.

Osteoindüksiyon: Çevre dokuda pluripotent kök hücrelerin osteoblastik hücrelere dönmesinin uyarılmasıdır.

Osteogenesis: Greft materyali içindeki hücresel elemanların cerrahi işlem sonrasında canlı olarak kalarak greft uygulanan alanda yeni kemik oluşumuna neden olabilmesidir.

Greft materyali olarak kullanılan malzemelerin bu özelliklerden en az bir veya birkaçını bulundurması gerekmektedir. Yeni teknolojiler ve doku mühendisliğinin gelişmesi ile bu özelliklerin kombine olduğu materyaller üretilmekte ve bu sayede greftlemenin daha etkili ve daha ucuz olması hedeflenmektedir.

Otolog kemik greftlerindeki donör alan morbiditesi, stok yetersizliği gibi çeşitli kısıtlamalar nedeniyle günümüzde allogreft kullanımı yaygınlaşmıştır. Allogreft kullanımının olumlu yanları olmasına rağmen hastalık bulaş riskleri, mekanik ve biyolojik özelliklerinin işlemler sırasında kaybolması, maliyetleri, inanç ve maddi sebeplerden dolayı her hastada kullanılmamaları nedeniyle sakıncaları vardır.

İdeal kemik greftleri şu özellikleri taşımalıdır:

- 1: Yeni kemik yapımının gerçekleşeceği osteokondüktif bir matriks veya iskeleye sahip olmalı.
2. Osteoindüktif faktörlere sahip olmalı.
3. Kırık iyileşmesinin çeşitli safhalarında etkili olabilecek osteojenik hücrelere sahip olmalı.
4. Yapısal destek sağlamalı (43).

Tablo 2: Kemik Greftlerinin Özellikleri (42).

Kemik grefti	Osteokondüksiyon	Osteoindüksiyon	Yapısal dayanıklılık	Osteogenesis
Kortikal otogreft	++	++	+++	++
Kansellöz otogreft	+++	+++	Yok	+++
Kansellöz donmuş allogreft	++	+	Yok	Yok
Kansellöz dondurulmuş kurutulmuş allogreft	++	+	Yok	Yok
Kortikal donmuş allogreft	+	Yok	+++	Yok
Kortikal dondurulmuş kurutulmuş allogreft		Yok		
Seramikler	+++	--	-	-
Demineralize kemik matriksi(DBM)	+	++	-	-
Osteoindüktif büyüme faktörleri	-	-	-	+++
Otojen kemik iliği	-	+	-	++
Mezenkimal kök hücreleri	-	-	-	+++
Otolog trombosit konsantrasyonu	-	++	-	
Gen tedavisi	-	+++	-	-

(Şimşek A, Çakmak G, Cila E, Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler, TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi, 2004 • Cilt: 3 Sayı: 3-4 ‘den alınmıştır).

2.6.1. Otolog Kemik Greftleri

Bütün greftler ile karşılaştırıldığında osteoindüktif, osteokondüktif hem de osteogenesis etkisi ile en üstün altın standart kemik greftidir. Spongioz, damarlı ve damarlı olmayan kortikal ve kemik iliği greftleri tipleri vardır.

Otolog greftlerin osteogenesis özelliği vardır, alındığı sırada hem osteoprogenitör mezenkimal hücreleri hem de osteoblastları içerir. Osteokondüktiftir yeni kemik oluşumu için uygun zemin hazırlar. Osteoindüktiftir KMP gibi ajanları barındırarak kemik yapımını stimüle eder (4,39).

Avantajları arasında doku uyumluluğu, daha ucuz olması, yüksek biyolojik iyileşme potansiyeli ve enfeksiyon riskinin olmaması sayılabilir. Dezavantajları arasında

ise zayıf mekanik destek sağlaması (kansellöz greft için), sınırlı miktarda alınabilmesi ve donör saha morbiditesi sayılabilir (44).

Tablo 3: Otolog Kemik Greftleri Özellikleri

Özellik	Spongios	Damarlı kortikal	Damarlı olmayan kortikal
Osteokondüksiyon	++++	+	+
Osteoindüksiyon	++	+/-	+/-
Ossteoprogenitör h.	+++	-	++
Erken kuvvet	-	+++	+++
6. ay kuvvet	++	++	+++
1.yıl kuvvet	+++	+++	+++

2.6.2. Allogreftler

Poroz yapıları içinde progenitör hücreler ve endotelyal hücrelerin bir arada bulunduğu aynı zamanda osteoklastlar tarafınca rezorbe edildiklerinde serbest kalan kemik matrikslerinde büyüme faktörleri içerir. İçerisinde osteoindüktif özelliği bulunan az miktarda morfojenik protein içerir. Osteokondüktif özellikleri vardır. Kortikal allogreftler ile mekanik destek sağlansa da bu kortikal otogreftlerle karşılaştırıldığında daha zayıftır. Allogreftlerde ise HIV, HBV, HCV gibi viral enfeksiyon bulaş riski mevcuttur (48).

Allogreftlerin klinikte kullanımı arasında kemiksel füzyonlar(vertebra ve ekstremitte artrodezleri), akut kırıklar, kaynama gecikmesi ve kaynamama gibi durumlara kırık stabilizasyonu için ve kaviter, segmenter, osteokondral ve artroplasti ile ilgili kemiksel defektler sayılabilir (49,50).

Allogreft uygulamalarında konak kemikte erozyon, skleroz, fragmentasyon ile birlikte greft ve konak kemik arasındaki radyolüsen görünüm kaynama yokluğunun radyografik bulgularıdır (51).

Kortikal allogreftler radyografi ve bilgisayarlı tomografide ana kortikal kemiğe benzer dansite gösterir. Ameliyat sonrası erken dönemde kortikal strut greftler korteks ve medüller kanal içinde tübüler bir yapı oluştururken cips ve morselize greftlerde bu

görünüm olmaz ve bunlar defekt içinde kitleye benzer opasiteler verir. Başlangıç döneminde greft ile kemik arasındaki sınırlar ayırt edilebilirken kaynama ile beraber bu sınırlar kaybolur (51).

Allogreft inkorporasyonu ve yetmezliği durumlarında manyetik rezonans görüntüleme (MRG) faydalıdır. Ameliyattan sonraki erken dönemlerde allogreftler tüm seanslarda hipotens sinyal verir iken inkorporasyonun ileri dönemlerde kırmızı kemik iliği sinyali verirler. T1 ve T2 ağırlıklı sinyal hipointensitesinin devam etmesi medüller fibröz replasmanı ve greft inkorporasyonundaki yetersizliği gösterir (51).

Allogreftlerin standart greftlere karşı avantajları arasında donör alan morbiditesi olmaması, istenilen miktarda greft bulunabilmesi ve jel, toz, fiber, macun gibi değişik formlarda kullanılabilir olması sayılabilir (4).

2.6.3. Demineralize Kemik Matrisi (DKM)

Osteokondüktif ve farklı derecelerde osteoindüktif özelliktedir, hızlı bir şekilde vaskülarize olur ve aynı zamanda otolog greftler içinde iyi bir çatı görevi görür. Kemiğe asit (0.5 N HCL) uygulanması ile inorganik komponenti uzaklaştırılır ve geriye kollajen ve nonkollajen proteinleri kalır, ayrıca içerisinde osteoindüktif olarak da BMP bulunur. Biyolojik aktivitesi ekstraselüler matriksinde bulunan proteinler ve büyüme faktörleri ile olur (52,53).

DKM, osteoindüktiftir, osteokondüktiftir fakat mekanik özelliği yoktur. Osteogenesis için otojen kemik iliği ile kullanılabilir. Ayrıca TZP 'de emdirilerek osteoindüktif etkisi güçlendirilebilir. DKM' nin osteoindüktif özelliği kemiğin işlenmesi, sterilizasyon yöntemi, saklanma ve donöre göre farklılık göstermektedir. Ürünün dondurulmuş, kurutulmuş toz, ezilmiş granüller, macun veya jel şeklinde ticari şekilleri vardır. Gliserol, hyalüronik asit, jelatin ve keratan sülfat ile karıştırılmış formları da bulunmaktadır (43).

Bostrom ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda gliserolle kombine edilmesi sonrası aşırı doz kullanılırsa nörotoksik ve nefrotoksik etkileri gösterilmiştir. Bu nedenle gliserolle kombine edilenlerde 2 cc/kg üzeri dozda kullanılmamalı ve böbrek fonksiyon bozukluğu olanlarda kullanılmamalıdır (54,55).

DKM' nin uzun kemik kaynamamaları veya travma sonucu oluşan defektler için otolog greftlere yakın bir iyileşme etkisi olduğu gösterilmiştir. Omurga ve diğer artrodezlerde de iyileşmeyi hızlandırmak için başarıyla kullanılmaktadır. En uygun karışım

dengeli tespit ile beraber otolog kemik iliği ve DKM kombinasyonudur. Perkütan greftlemede de tek başına veya otogreftler ile kombine kullanılabilir. Acil osteoprogenitör hücre ihtiyacı olan durumlarda DKM ve otolog kemik iliği ile birlikte osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerde bir matris karışımı ile kullanılması önerilmektedir ve bunların başarılı sonuçları ile ilgili çeşitli yayınlar vardır fakat bu çalışmalar henüz yetersizdir (43,56,57).

Ayrıca kemik defekti büyük olduğu durumlarda otolog kemik greftleri ile DKM nin kombine kullanılabilir. Ayrıca otolog greft alınamayan, donör alan morbiditesi istenmeyen veya otogreft için açık cerrahi yapılamayan hastalarda DKM kullanılabilir. DKM' nin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Allojen olması nedeniyle insan immün yetmezlik virüsü (HIV) bulaş riski olsa da dekalsifikasyon işlemi sonrasında bulaş riskinin ortadan kalktığı görülmektedir. Ayrıca DKM hazırlanırken farklı donörlerden hazırlandığı için her greftin kuvveti ve osteoindüktif etkisi farklıdır. Genç donörlerden alınan greftlerin osteoindüktif etkisi yaşlılardan alınanlara göre daha fazladır. Osteoindüktif etkisinin donöre göre farklılık göstermesi ve güvenlik nedeniyle Amerikan Doku Bankası Birliği ve FDA bir DKM paketinin tek bir donörden alınan greftten üretilmesi gerekliliğini şartını koşmuştur. Birçok araştırmacı otolog spongios kemik grefti ile benzer iyileşme sonuçlarını gösteren çalışma yayınlasa da randomize, prospektif ve kontrollü çalışmaların eksikliği nedeniyle iki greft arasında net bir karşılaştırma yapılamamaktadır (58).

2.6.3.1. Osteokondral ve Kortikal Allogreftler

Pelvis, kosta, femur, tibia ve fibuladan elde edilerek büyük kemik ve eklem defektlerinde kullanılırlar. Özellikle ekstremité koruyucu cerrahi sonrasında rekonstrüksiyon için ve periprostetik kırıklarda sık kullanılmaktadır. Osteokondüktif özellikleri olan bu greftler dondurularak veya dondurulup kurutularak saklanabilir. Kemik iyileşmesi ve kırıkta ve kemikte kalıcı yıkım olmadan önce revaskülarizasyona izin verir (51). Derin dondurulmuş allogreftler çözündürüldükten sonra hemen kullanılabilirler fakat çözündürüldükten sonra eğilme ve torsiyon kuvvetlerine karşı zayıftır.

Bu greftlerde de HIV bulaş riski mevcuttur ve ABD de HIV tanımlandıktan sonra yapılan yaklaşık üç milyon doku transplantasyonu sonrasında 2 adet HIV bulaşı rapor edilmiştir (43).

Taze allogreftlerde belirgin immün reaksiyon oluşma riski vardır ve bu risk de otogreftlerden daha az etkili olmasına neden olur. Taze allogreftler özellikle eklem rekonstrüksiyonu için kullanılmaktadır.

2.6.3.2. Morselize ve Kansellöz Allogreftler

Osteokondüktif etkileri vardır ve kompresyona karşı mekanik destek sağlarlar. Dondurulup kurutularak ve vakumlu paketlerde saklanırlar. Periartiküler metafiz kırıklarında eklem yüzeylerinin redüksiyonu sonrasında meydana gelebilecek boşluklara ve kist küretajı sonrasında gelişebilecek boşluklar için kullanılabilir. Ayrıca otojen greftler ile karıştırılıp greft miktarının arttırılması amacıyla da kullanılabilir.

2.6.4. Seramik Matriksler

Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi kalsiyum fosfat bileşikleri seramik matriksler olarak adlandırılırlar. Kalsiyum sülfat tuzları da bu gruba dahil edilebilir. Bu materyaller 3 gruba ayrılırlar:

- 1: Hızlı emilime uğrayanlar
- 2: Yavaş emilime uğrayanlar
- 3: Enjekte edilebilen seramikler (4).

Hızlı emilebilen seramikler ve kalsiyum tuzları

Poroz TCP implantları, TCP tozlarının naftalin gibi taşıyıcılar kullanılarak sıkıştırılmasıyla elde edilir. Granül formu kemik grefti olarak kullanışlıdır. Yüksek kalsiyum fosfat iyon konsantrasyonu içeren yüzeyler ve lokal mikro çevre TCP rezorbsiyonunu etkiler. TCP'nin bulunması ve kalsiyum fosfat kristallerinin lokal depolanması osteoklastları uyarır ve osteoklastik aktivitenin artması ile de osteoblastik aktivite artacaktır (4,39).

Yavaş Emilen Seramikler

Klasik yavaş emilen seramik örneği hidroksiapatittir. Yüksek derecede kristalize hidroksiapatit (mercan kaynaklı) in vivo stabildir ve yılda %5-10 arasında emilebilir. Hayvan ve insanlarda yapılan uygulamalarda hidroksiapatit poroz implantların fibrovasküler doku ile kaplandığı ve lameller kemiğe dönüştüğü gözlemlenmiştir. Oluşan

yeni kemik otojen greftlere benzemektedir. Hidroksiapatitin yavaş emilimi bir dezavantajdır bu nedenle emilimi arttırmak için kalsiyum karbonatın dış kabuğunun hidroksiapatite dönüştürülmesi, hidroksiapatitten üretilen bifazik kalsiyum fosfat seramikler ve hidroksiapatit TCP karışımı materyaller sayılabilir (4,59).

Enjekte Edilebilir Seramikler

Seramik çimentolar, dibazik kalsiyum fosfat, α TCP ve tetrakalsiyum monofosfat bileşiklerinden oluşur. Maddeler sıvı macun şeklinde karıştırılır ve ardından belirgin ısı olmadan kristalize olarak sertleşir. Bir miktar hidroksiapatit oluşsa da sertleşen çimentonun büyük kısmı saflaşmamış kolay emilebilen kalsiyum fosfat seramik kristalleri içerir ve bu sertleşen materyalin kompresif güçlere dayanıklılığı kansellöz kemiklere eşdeğerdir.

Klinik olarak açık veya kapalı kırıklarda ve kemik defekti olan bölgelerde uygulanabilir. Radius distal uç kırıklarında, humerus proksimal uç kırıklarında ve vertebra kompresyon kırıklarında enjekte edilebilir formlar uygulanabilir (4).

2.6.5. Kollajen

Çapraz bağlı fibriler yapısı nedeniyle tip 1 kollajen kemik ekstraselüler matriksi içinde en fazla bulunan proteindir ve kemik oluşumu ve mineral depolanmasında önemli görevleri vardır. Yüzeyinde minerallerin depolandığı ve kollajen olmayan matriks proteinlerinin bağlandığı alanlar mevcuttur.

Klinik pratikte saflaştırılmış sığır kaynaklı tip 1 kollajen matriks yapılarının (jel, toz veya poroz sünger şeklinde) kullanımı vardır (4). Allojenik veya ksenogreft kollajen kullanılmasının immünite açısından sakıncalar yaratacağı konusunda tartışmalar olmasına rağmen yapılan çalışmalarda sığır kollajeninin insana implantasyonu sonrasında herhangi bir immünolojik yanıt görülmemiştir.

Osteoblastik progenitör hücrelerin ve diğer osteoprogenitör materyallerin uygulanmasında taşıyıcı rolü vardır (39). Kollajenin seramik granüller, kemik morfojenik proteinler ve osteoblastik progenitör hücrelerin taşınmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Werntz ve arkadaşları fare femur diafiz defektlerinin iyileşmesi üzerine yaptıkları çalışmada tek başına kollajenin kırık kaynaması üzerine etkisi olmazken kemik iliği ile birlikte kullanıldığında otolog kansellöz greftlemeye göre daha üstün olduklarını göstermişlerdir (60). Kemik defekti modelinde Johnson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kollajen jel, bifazik seramik hidroksiapatit ve TCP den oluşan karışımın tek başına seramik kullanımına göre kemik oluşumunu belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir.

Zerwekh ve arkadaşları spinal füzyonda kollajen jel, bifazik seramik hidroksiapatit ve TCP den oluşan karışımın otogreft ile birlikte kullanılarak greft miktarının arttırılabileceğini göstermişlerdir (61). Bu çalışmalara karşın köpeklerde posterior spinal füzyon modeli çalışan Muschler ve arkadaşları otolog kemiğin etkisinin, kollajen jel, bifazik seramik hidroksiapatit ve TCP den oluşan karışım ile beraber kullanıldığında azaldığını göstermişlerdir (62).

2.6.6. Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)(KMP)

Kemik morfojenik proteinleri düşük molekül ağırlıklı, kollajen olmayan ve birçok büyüme ve farklılaşma faktörü içeren bir grup olan TGF β (transforme edici büyüme faktörü beta) grubunun bir üyesi olan glikoprotein yapısındadır. KMP olarak adlandırılan ve KMP-2' den KMP 8'e kadar yedi üyesi olan osteojenik proteinler, kıkırdak kaynaklı morfojenik proteinler ya da büyüme ve farklılaşma proteinleri gibi isimlerle anılan otuzdan fazla molekül bu aile içindedir ve hepsi TGF β grubu içinde yer almaktadır. BMP 7 osteojenik protein I, KMP 8 ise osteojenik protein II olarak bilinir.

Kemik morfojenik proteinleri ağırlık olarak tüm kemik proteinlerinin % 0.1 'ini oluşturur. İleri derecede osteoindüktif olan bu proteinler rekombinant yolla sınırsız üretilmektedir. Rekombinant insan KMP-2 ve osteojenik protein -1 (OP1) ile deneysel ve klinik çalışmalarda iyi sonuçlar elde edilmiş olsa da çok yüksek maliyeti, potansiyel doz etkileşimleri ve antikor oluşma ihtimali nedeniyle rutin kullanımda önemli bir engel olmuştur (63-66). Kemik morfojenik protein ekstrat ve rekombinant olarak iki şekilde üretilmektedir. Ekstratlar rekombinantlardan farklı olarak hem BMP, hem TGF, hem tip I kollajen hem de diğer büyüme faktörleri içerebilmektedir. Ayrıca ekstrat preparatlar kemik oluşumu için diğerinden daha fazla fizyolojik miktarlarda bulunabilir. Ancak ekstrat preparatlarda da içindeki KMP miktarını değişken olması, rekombinant preparatlara göre daha az KMP içermesi ayrıca kemikte normalde yer alan osteogenezi inhibe eden ajanları da içermesidir.

Rekombinant KMP'lerin etkilerinin doz bağımlı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Rat femurunda oluşturulan 5 mm'lik defektin sığır kaynaklı protein ekstratı yoluyla KMP uygulaması ile iyileşmenin araştırıldığı bir çalışmada 110 μ g BMP ile hem radyolojik, hem fizyolojik hem de biyomekanik olarak kaynamanın oluştuğu gözlenmiş fakat 1.4 μ g KMP ile kaynamanın uyarılmış olduğu fakat yeterli olmadığı gösterilmiştir (68).

İnsan kemiğinden pürifiye edilerek elde edilen kemik morfojenik proteininin kortikal greft taşıyıcı ile kullanıldığı bir çalışmada 30 femur kaynamama veya yanlış kaynama vakasında %80 sorunsuz kaynama elde edilmiştir (69).

2.6.7. Kemik Büyüme Faktörleri

Kemikteki osteojenik aktiviteler bazı hormonal ve lokal olarak salınan peptidler ile düzenlenmektedir. Kemik üzerine etki eden lokal büyüme faktörleri arasında Kemik morfojenik protein (KMP), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I-II), trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF), asidik ve bazik büyüme faktörleri sayılabilir. Büyüme faktörleri genellikle ekstrasellüler matriks içinde depolanmakta ve travma sonrasında hemen serbest kalmaktadır.

Tablo 4: Kemik İyileşmesinde Büyüme Hormonlarının Ana Etkileri (69).

Büyüme faktörü	Kaynağı	Biyolojik etkisi	Kemik üzerine etkisi
BMP	Osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, kondrositler ve endotel hücreler (BMP2)	Kondro-osteogenesis ,osteindükiyon (BMP2)	Osteoprogenitör hücre migrasyonu, proliferasyonun indüksiyonu, matriks sentezi ve farklılaşması
FGF	Makrofaj, monosit, kondrositler, osteoblastlar ve endotel hücreler	Anjiogenez, kan damarlarının düz kasları ve fibroblast proliferasyonu	Kondrosit maturasyonu (FGF-1),osteoblast proliferasyonu ve farklılaşması, immatür osteoblastların apoptozisinin inhibisyonu, matür ostosist apoptozunun aktivasyonu, kemik rezorbsiyonu (FGF2)
IGF	Osteoblast, kondrosit, hepatosit ve endotel hücresi	Büyüme hormonu etkilerinin regülasyonu	Osteoblast proliferasyonu ve kemik matriks sentezi, kemik rezorbsiyonu
PDGF	Platelet, osteoblast, endotel hücresi ,monosit, makrofaj	Bağ dokusu proliferasyonu, monosit-makrofaj ve düz kas hücresi kemotaksisi	Osteoprogenitör migrasyon, proliferasyon ve farklılaşma
TGF- β	Platelet, osteoblast, kondrosit, endotel hücresi, fibroblast, makrofaj	İmmünsupresyon, anjiogenez, büyüme hormonu regülasyonu, farklılaşma	Farklılaşmamış mezenşim hücre proliferasyonu, osteoblast ve kondrosit farklılaşması (terminal farklılaşmanın inhibisyonu), kemik matriks üretimi
VEBF	Osteoblast, platelet	Anjiogenez	Kıkırdakta kemikleşme, osteoblast proliferasyonu ve farklılaşması

Devescovi V, Ciapetti G and Cenni E;Growth factor in bone repair, Chir Organi Mov (2008) 92:161–168’ den alınmıştır).

Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü: Kıkırdak ve fibroblastlar için mitojenik aktivitesi vardır. Kıkırdak oluşumu aşamasında kallusu genişletir. Yüksek dozlarda kemik gerilimini artırıcı etkisi vardır. Kırık iyileşmesinin vaskülarizasyon fazında etkilidir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü: Fibroblast, kondrosit, osteoblast, keratinosit gibi pek çok hücrenin çoğalmasını sağlayarak büyümeyi uyarır. IGF 1 ve IGF II olmak üzere iki farklı peptidden oluşan bir ailedir. IGF I kemik hücresinin farklılaşması, proliferasyonu, DNA sentezi, kollajen ve nonkollajen dokuların protein sentezini artırır, epifiz plağında kondrositlerin çoğalma ve farklılaşmasını hızlandırarak kemiğin uzunlamasına büyümesinde etkilidir. Yapılan çalışmalarda IGF‘ün in vivo infüzyonu ile kortikal kemiklerde uzunlamasına büyüme meydana geldiği gösterilmiştir.

TGF- β : Kemik hücrelerinin çoğalma ve farklılaşması konusunda en çok çalışılan büyüme faktörlerinden biridir. Enflamasyon ve doku tamirinden sorumludur. Tüm hücreler moleküler formlarının birinde TGF- β oluştururlar ve tüm hücrelerde reseptörleri mevcuttur. En önemli kaynağı kemiğin ekstraselüler matriksi ve trombositlerdir. TGF- β osteoblastlar ve kondrositlerde sentezlenir ve encondral ossifikasyon sırasında hücre dışı matrikste depolanır ve kemik iyileşmesi safhasında trombositlerden salınır. Makrofajlardan salınan en güçlü kemotaktik ajan TGF- β ‘ dır. Hücre dışı matriks bileşenleri olan kollajen, fibronectin ve proteoglikanların oluşumunu arttırmak için hücrenin integrin reseptörlerini uyarır. Bağ dokusu hasarına neden olan proteolitik enzimleri yıkarak granülasyon dokusu oluşumu sağlar. Kemik iyileşmesinde kallus formasyonunu, hacmini ve matriks sentezini artırır.

VEGF: 1983’te ilk bulunduğu tümör hücrelerinden salınarak damar geçirgenliğini arttırdığı düşünülmüş ve ‘vascular permeability factor ‘ olarak adlandırılmış fakat daha sonra ‘vascular endotelyal growth factor’ olarak adlandırılmıştır. Bilinen en güçlü anjiogenez uyarıcıdır (70,71). Kendi salınımı sonrasında diğer proteoglikan bağımlı salınımı olan büyüme faktörlerini de uyarır. Yara iyileşmesinde önemli olan fibroblast, inflamatuvar hücreler ve endotelyal hücrelerin çoğalması ve migrasyonunda görevlidir, ayrıca vasküler geçirgenliği artırır.

2002’de Petersen ve arkadaşları tarafınca yapılmış bir çalışmada tendon anjiogenezinde ana uyarıcı olduğu gösterilmiştir (71). Kırık iyileşmesinde de osteoblastlar, osteoklastlar ve mezenkimal hücrelerden salınarak anjiogenezini artırır ve kırık iyileşmesini hızlandırır.

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): PDGF salınması ile iyileşmede görevli hücrelerin çoğalmasına, kollajen, fibronektin, hyaünorik asit üretilmesine, diğer büyüme faktörleri ve hücrelerin fonksiyonlarının artmasına neden olur (72-75). Bu sayede fibroblastik ve osteoblastik aktivite artar, hücreler farklılaşır. PDGF insan mezenkimal dokuları için birincil mitojen büyüme faktörüdür ve bu etki interferon- γ sayesinde daha da artar (76-78). Ayrıca yara iyileşmesinin ileri safhalarında kollajenaz aktivasyonu yaparak yeniden şekillenme dönemine de katkıda bulunur (10,11,72,76,79-82). TGF- β ile sinerjistik etki gösterir ve kemik, periodontin ve cilt iyileşmesini uyardığı ve yara kuvvetini arttırdığı gösterilmiştir (80,83,84).

Kemik iyileşmesinde ise temel olarak osteoblastlar ve inflamatuvar mediatörlerin kemotaksisi, osteosit proliferasyonu, kollajen sentezini ve döngüsünü hızlandırır, kemik matriks ve sentezini artırır.

2.6.8. Biyoaktif Camlar

Değişik şekillerde biyoaktif camlar, periyodontal cerrahide kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bu materyal; silikon dioksit (%45), kalsiyum oksit (%24,5), disodyum oksit (%24,5) ve pirofosfattan (%6) oluşur. Uygulandığı zaman kollajen, büyüme faktörleri ve fibrine bağlanarak osteojenik hücrelerin ilerlemesini sağlayan poroz matriks oluşturur. Granül, blok ve çubuk şeklinde formları mevcuttur. Emilebilen veya emilemeyen tipleri vardır. Antibiyotikler ile ve kemik yapımını arttıran maddeler ile karışım halinde kullanılamazlar ve hidroksiapatit implantlardan daha dayanıklıdırlar (40).

2.6.9. Gen Tedavisi

Gen tedavisi ile nükleik asit materyalleri olan DNA ve RNA invivo ve invitro olarak hücre içine konulabilmektedir. Gelişen teknolojiler ile konjenital ve kazanılmış hastalıkların tedavisi de gen tedavileri ile yapılmaya çalışılmaktadır. Eksojen kaynaklı kemik morfojenik proteinlerinin enjeksiyonu yerine gen tedavisi yapılması zamanlama ve konsantrasyon olarak daha fizyolojiktir. TGF- β 1, BMP 2 gibi kemik iyileşmesinde önemli faktörler vektörler yardımıyla transfer edilebilmektedir (85). Yapılan çalışmalar önümüzdeki yıllarda gen tedavisi ve doku mühendisliği ile beraber en uygun otojen olmayan greftler üretilecektir (86). Yapılan çalışmalar sonucunda gen tedavisinin lokal ve

sistemik etkileri ile kırık iyileşmesi ve spinal füzyonlarda kemik yapımı arttırılarak daha başarılı sonuçlar alınabilecektir (87).

2.6.10. Fibrin Yapıştırıcı

Cerrahide uygun yara iyileşmesi ve kapatılması açısından sütür materyalleri vazgeçilmez olmakla beraber bu materyallere bağlı gelişen yabancı cisim reaksiyonları, granüloma-fistül oluşumu gibi komplikasyonlar nedeniyle yeni arayışlar içine girilmiştir. Siyanoakrilatın klinik kullanıma girmesi bu konuda ümit vermiş fakat yine yabancı cisim reaksiyonları, granülasyon dokusu gibi komplikasyonlar nedeniyle çalışmalara devam edilmiştir (88). Zamanla fibrinin hemostatik etkisinin gösterilmesiyle, yara iyileşmesi ve pıhtılaşmada fibrinin önemi anlaşılmış ve dikkatler bunun üzerine yönelmiştir (79,83,89).

Fibrinojen yara iyileşmesinin ilk evrelerinde faktör XIII, trombin ve faktör XII ile etkileşerek hücre içinde bir iskelet oluşturur ve daha sonra bu yapıya kalsiyum ve trombin eklenmesiyle içerdiği fibrinojen miktarına bağlı olarak yaklaşık olarak 5-30 saniye içinde fibrin yapıştırıcı diğer adıyla trombositten fakir plazma oluşur (70,83,88).

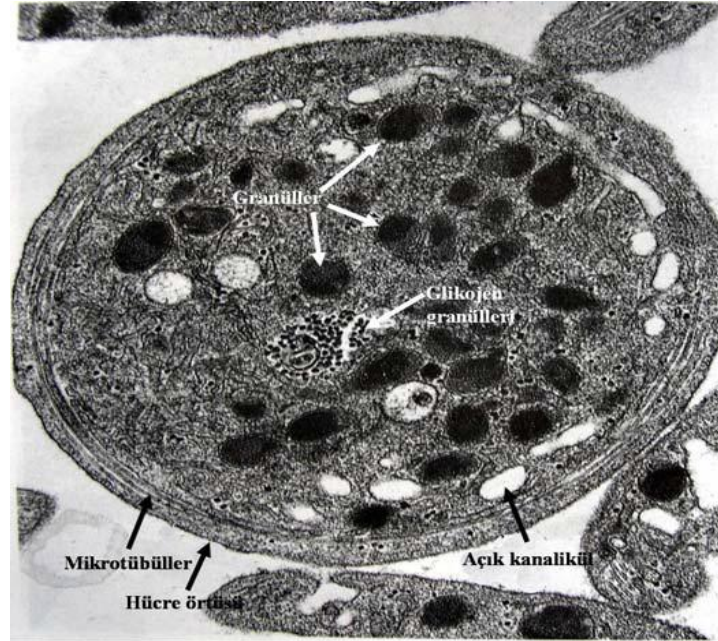
Fibrinojenin trombinle aktif hale gelmesinin bulunması sonrasında 1940'larda Tidrick deri grefti sabitletmesinde kullanmış fakat yeterli dozda uygulamadığı için başarısız olmuştur (70,90). Daha sonra 1970'lerin başında fibrinojen miktarı arttırılan fibrin yapıştırıcının sinir anastomozlarında kullanılması ve başarı elde edilmesi nedeniyle tekrar popüler hale gelmiştir. Daha sonra da Kulber sıçanlarda latissimus dorsi flebinde seroma çalışması yapmış ve fibrin yapıştırıcı sonrasında seroma miktarının azalmış olduğunu göstermiştir (91).

Fibrin yapıştırıcı klinik olarak sinir anastomozlarında, yumuşak doku defektlerinde, deri grefti tespitlerinde, kansellöz kemik grefti ile birlikte, kanama eğilimi olanlarda dış çekimi sonrası oluşan kaviteye, spontan pnömothoraks olgularında hava kaçağını önlemek için, vasküler anastomozlarda, peptik ülserlerde kanama durdurulması için, yüz ve boyun germe, meme büyültme-küçültme gibi estetik operasyonlar sonrasında şişlik, morluk oluşumunu azaltmak ve dren süresini kısaltmak amacıyla kullanılmaktadır (12,70,79,83,90,92-94). Allojenik fibrin yapıştırıcı 1970'li yıllarda tarif edilmiş ve fibrinojenin kalsiyum ve trombin ile polimerizasyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (89). 1990 'da Gibbel ve Ness hemostatik ve adeziv özellikleri olan bir biyomateriyal olarak fibrin jel (fibrin yapıştırıcıyı) tarif etmişlerdir (95). Trombositlerin eklenmesiyle biyoaktif faktörlerce zengin hale gelmesi ise daha sonra tarif edilmiştir (96,97).

Ticari olarak hazırlanan fibrin yapıştırıcılarda enfeksiyon bulaşma riski olması, otolog fibrin yapıştırıcılarda ise hastadan cerrahi öncesi kan alınması, üretiminin pahalı olması kullanımını kısıtlamaktadır. Klinikte daha çok frontal sinüs gibi yük taşımayan alanlarda ve kapama sırasında periost ile kemik arasında yapıştırma için kullanılmaktadır. Ayrıca fibrin yapıştırıcının osteoindüktif etkisi araştırılmış, bazı çalışmalarda osteoindüktif etkisi olmadığı gösterilmiş olmasına rağmen diğer çalışmalarda ise osteoindüktif etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu özelliğinden yararlanmak amacıyla da kemik greftleri veya benzeri diğer ürünler ile birlikte kullanılması önerilmektedir (98-103).

2.6.11. Trombosit Zengin Plazma (TZP)

Trombositler kemik iliğinde megakaryositler içinde üretilen 2-4 µm çapında mitokondri ve mRNA içermesine rağmen çekirdek içermeyen sitoplazma parçalarıdır. İstirahat halinde disk şeklinde olmalarına rağmen aktive olduklarında 5 µm'ye kadar ulaşabilen çaplara ulaşabilmektedir. İstirahat halinde vücutta dalakta depo edilen trombositler periferik dolaşıma salındıklarında 8-10 gün süreyle canlı kalmaktadırlar. Periferik yaymada yapılan incelemelerde kümeler halinde görülen trombositler tek tek incelendiğinde açık mavi boyanan periferik 'hyalomer', mor granüller ve mitokondriden oluşan santral 'granülomer' kısımlarından oluşur.



(Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter eight, page: 145-6 , 2003'den alınmıştır).

Şekil 5: İnsan Trombosit Elektron Mikroskopik Fotoğrafı (16).

Trombositten zengin plazma günümüzde kas ve iskelet sistemi hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlamış hastanın kendisinden hazırlanan bir kan ürünüdür. Trombositler yoğunluk ve içeriklerine göre alfa, delta ve lambda granülleri içermektedir ve bu içerikleri sayesinde alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaya itilmiştir (104). Trombositler kollajen veya trombin ve kalsiyuma maruz kaldıklarında granülleri içindeki bu büyüme faktörlerini salgırlar. Bu tedavi ile ilgili araştırmalar son birkaç yıl içinde katlanarak ilerlemektedir.

Tablo 5: Trombosit Granül İçerikleri (104).

Alfa Granül	Delta Granül (yoğun cisim)	Lambda granül (lizozomlar)
Glikoproteinler • Fibronektin, vWF, - Trombospondin,vb. Hemostaz Faktörleri • Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Protein S, - Plazminojen,vb. Hücresel Mitojenler • PDGF, TGF-β, EGF, - VEGF, FGF-II, vb. Proteoglikanlar • PF4, HRGP, PBP, vb. Proteaz İnhibitörleri Albumin-immünglobulinler	Nükleotidler • ATP,ADP • GTP,GDP Aminler • Serotonin • Histamin Çift değerlikli Katyonlar • Kalsiyum • Magnezyum	Asit Proteazlar • Katepsin D, E • Karboksiptidazlar • Kollajenaz • Asit Fosfataz • Arisülfataz Glikohidrolazlar • Heparinaz • Diğerleri

Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules constituents, secretion and functions. Platelets 12(5): 261-273, 2001' den alınmıştır.).

Trombositler içerdikleri bu büyüme faktörleri sayesinde kemik iyileşmesinde önemli etkileri bulunurken, diğer yandan salınan ADP ve Tromboksan A2 gibi moleküller ile adezyon sağlayarak pıhtılaşma mekanizmasında rol almaktadır (105,108).

Alfa Granüller: 200-400 nm çapında tek kat membranlı büyük organeller olup, sayısal olarak da trombositlerin majör granülleridir. Alfa granüllerin hemostaz, enflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein ve büyüme faktörünü içermesi; trombositlerin yoğunlaştırılarak klinikte yara, kemik iyileşmesi gibi alanlarda kullanımının gündeme gelmesine neden olmuştur.

Delta Granüller (Yoğun Cisimler): 250-300 nm çapında kalsiyum, pirofosfat, ADP, ATP gibi molekülleri içerir, serotonin deposu olarak görev yapar.

Lambda Granüller (Lizozomlar): 175-250 nm çapında olup içinde asit hidrolazlar gibi lizozomal enzimleri ve ayrıca bakterisidal etkisi olan glikozidaz, proteaz gibi proteinleri de içerirler.

1990' lardan beri anlaşılmıştır ki yara, yumuşak doku ve kemik iyileşmesindeki normal süreçte artan veya sentezi uyarıların kan komponentlerinin büyük etkisi vardır. (fibrin, fibronektin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü β (TGF β) gibi) Bu proteinler kemotaksi, çoğalma ve farklılaşma, debrislerin temizlenmesi ve anjiogenez gibi doku iyileşmesinin çeşitli aşamalarında görev almaktadır.

İyileşme süreci bir dizi hücre-hücre ve hücre-makromolekül arası etkileşimleri gerektirir. Normal bir yara iyileşmesinde pek çok büyüme faktörü bölgedeki ve komşu bölgelerdeki hücrelerin aktivasyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (106). Cerrahi sonrasında trombositler aktive olurlar ve yara bölgesinde stabil bir pıhtı meydana getirirler (107,108). Bunu takiben trombositler degranülasyona uğrayarak iyileşme ve formasyon sürecini hızlandırmak için ortama bir takım büyüme faktörleri salgırlar (109). Osteoblastların ve osteoklastların gelişimleri ve farklılaşmalarının, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini dengeleyen adhezyon molekülleri ile olduğu kadar, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından da düzenlendiği bilinmektedir.

Trombositten zengin plazmada trombositlerin aktive olmasıyla salınan Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF), Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF), Insulin Like Growth Factor (IGF) ve Epidermal Growth Factor (EGF) olarak adlandırılan büyüme faktörleri bulunmaktadır. Bu proteinlerin hepsi de ayrı ayrı histopromotif proteinlerdir. Bunlar hücre sel kemotaksi, çoğalma, farklılaşma, debrislerin uzaklaştırılması, anjiogenez ve ekstraselüler matriks oluşumu gibi hücre iyileşmesinin birçok basamağında görev almaktadırlar (96, 110).

Yapılan çalışmalara TZP'nin özellikle PDGF ve TGF- β 'dan zengin olduğu gösterilmiştir (109). PDGF' in en önemli aktiviteleri arasında mitogenez, anjiyogenez ve makrofaj aktivasyonu olduğu bildirilmiştir (109). Osteoblast öncülerinin kemotaksi ve mitogenez stimülasyonu, osteoblastlardan kollajen matrix salınımının stimülasyonu, kemik rezorpsiyonu ve osteoklastik formasyonun inhibisyonu ise TGF- β ' ların en önemli fonksiyonları olarak bildirilmiştir (109). TGF- β ve PDGF kadar olmasa da, IGF ve FGF'ler gibi büyüme faktörlerinin de osteoblast proliferasyonunu uyardıkları bilinmektedir (76,109,111). Ayrıca yapılan çalışmalarda PDGF, TGF ve IGF gibi büyüme faktörlerinin kombine uygulamalarda sinerjistik etkileşerek tek tek uygulamalarına kıyasla daha olumlu sonuçlara yol açtıkları görülmüştür (112,113). Kültüre edilmiş yetişkin insan osteoblastlarında maksimum proliferasyonun ise PDGF, IGF-1, TGF- β ve EGF'in kombinasyonlarında görüldüğü bildirilmiştir (114).

Trombositten zengin plazma bazal seviyenin üstünde trombosit içeren, lökositlerden arındırılmış otolog kan plazma bölümü olarak tanımlanabilir. (76,128) Trombositten zengin plazma yüksek miktarda trombosit içermesinin yanı sıra sekretuar proteinler ve tüm pıhtı faktörlerini de içerir. Normal trombosit sayısı 150,000/ μ l ve 350,000/ μ l arasındadır, ortalama da 200,000/ μ l'dir. Bazı araştırmacılar taban seviyeye göre üç ila beş katlık bir orandan bahsetmektedir (115). Kemik ve yumuşak doku iyileşmesinde 1,000,000 trombosit/ μ l'yi içeren 5ml volümündeki plazmadan oluşan TZP kullanıldığında gelişme bilimsel olarak kanıtlanmıştır (116,121). TZP uygulaması ile mezenkim hücrelerin göçü ve çoğalması sağlanırken, yüksek dozda uygulama ile hücrelerde sınırlı farklılaşmalara da sebep olabildiği iddia edilmiştir (117). Tsay ve arkadaşları, TZP içerisindeki büyüme faktörlerini ELISA yöntemi ile değerlendirdiklerinde, PDGF oranında 30 kat, TGF- β 'da ise 7 kat artış bulduklarını bildirmişlerdir (118).

TZP'nin büyüme faktörü içeriği ile venöz kandaki ya da TZP içeriğindeki trombosit sayımı arasında iyi bir korelasyon bulunamadığı bildirilmiştir (119). Weibrich ve arkadaşları 2003 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 21-62 yaşları arasındaki 115 sistemik sağlıklı vericilerden elde edilen periferik venöz kan örneklerini ve bu örneklerden 2 farklı yöntem ile elde edilen TZP preparasyonlarını trombosit, lökosit ve büyüme faktörleri açısından değerlendirmişlerdir (119). Araştırmacılar, ne venöz kan örneğindeki, ne de hazırlanan TZP'deki trombosit sayımlarının herhangi bir TZP preparasyonu içerisindeki final büyüme faktörü miktarını tahmin etmede kullanılamayacağını bildirmişlerdir (120). Kan verenlerin yaşı ya da cinsiyeti ile trombosit sayımları ya da

büyüme faktörü miktarları arasında da bir ilişki saptanamamıştır (119). Trombositler ve TZP içeriğindeki büyüme faktörü içeriğinin henüz tanımlanamamış başka faktörlere bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.

Trombositten zengin plazma hazırlamak için farklı santrifüj hızları tanımlanmıştır ki burada amaç lökosit bırakmamaktır. Yavaş santrifüj sonrasında en altta kırmızı kan hücreleri ve onun üstünde lökositlerin olduğu tabaka onunda üstünde ise “buffy coat” denen ve trombositten zengin plazma elde edilen tabaka bulunur (76). Smart PReP (Harvest Technologies, Norwell MA), Plasma Seal (Plasma Seal, San Francisco, CA), Platelet Concentrator (Implant Innovations, Inc. 3i, West Palm Beach, FL) ticari olarak kullanıma sunulmuş, santrifüj teknolojisini kullanarak TZP hazırlayabilen cihazlardır.

Büyüme faktörlerinin kullanımı 1990’lı yıllarda plastik cerrahide özellikle maksillofasyal cerrahide kullanıma girmiştir (121). Ortopedik cerrahide kullanımı ise son on yıl içinde özellikle kemik greftleri ile yapılan spinal füzyon cerrahilerinde ve kırık iyileşmesi üzerine olan çalışmalarla başlanmıştır (122). Kırık iyileşmesini hızlandırması konusundaki potansiyel faydaları üzerine tartışmalar halen devam etse de (123), kas ve tendon yaralanmaları ve dejenerasyonlarının tedavilerinde TZP enjeksiyonu kullanımı gün geçtikçe artan klinik ve laboratuvar kanıtları ile desteklenmektedir (122).

Operasyon öncesinde hastadan alınacak kan miktarı uygulamanın yapılacağı kemik defekti bölgesinin genişliğine göre ve TZP hazırlanmasında kullanılacak yöntemle göre farklılıklar gösterebilir (120). TZP hazırlanış süresi de kullanılan yöntemle bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama 20-30 dakika alan bir işlemdir.

TZP’nin PDGF ve TGF- β içeriğinin uzun saklama periyotlarında azaldığı ve kan alımı sonrasında 4 saat ile 3 gün arasında hücre büyümesini uyarıcı etkilerinin kademeli olarak azaldığı bildirilmiştir (124). Trombositlerin agregasyon cevaplarında da saklandıkları süreç içinde belirgin bir düşüş saptandığı rapor edilmiştir (125). Kişinin kendi kanından hazırlanan TZP materyalinin, hazırlandıktan sonra en kısa zaman içinde kullanılması gerektiği, özellikle ilk 6 saat içerisinde kullanımının materyal kontaminasyonu ve hastalık taşıyıcılığı risklerini düşük tutmada önemli olduğu bildirilmiştir (126).

TZP’nin etki süresini kesin olarak bildiren bir yayın literatür bilgilerimiz dahilinde mevcut değildir. Trombositlerin degranülasyonu ve büyüme faktörlerinin salınımının ilk 3-5 günde olduğu ve büyüme faktörlerinin aktivitesinin de bu yüzden 7-10 gün olduğu ileri sürülmüştür (127). Trombositlerin ve dolayısıyla trombosit degranülasyonu sırasında açığa çıkan büyüme faktörlerinin direkt etkilerinin ortalama olarak ilk 5-6 günden sonra yavaş

yavaş kaybolacağı, ancak aktif osteoblastların ömrünün yaklaşık 3 ay olduğu (111) göz önüne alındığında, kemik tamirinin fizyolojik mekanizmasının kemik rejenerasyonu yönünde hızlanmış bir şekilde devam edeceği öne sürülmüştür.

TZP'nin daha önce nasıl hazırlandığı 2007' de Nagae tarafından anlatılmıştır. 12 haftalık 3 adet rat TZP hazırlanmak üzere kurban edildi. Her bir ratdan 2.0 ml koagülasyonu engelleyici asit sitrat dekstroz içeren enjektörlere yirmi mililitre taze kan alındı. Toplam 60 mL tam kan 1500rpm (250g)'de 10 dakika santrifüj edildi. Takibinde plazma kısmı toplandı ve 3000 rpm(1000g)'de 10 dakika daha santrifüj edilerek trombositler çöktürüldü. Santrifüj tüpünün dibinde çökelmiş olan trombositler 300 mikrolitre supernatanı (trombositten fakir plazma) ile TZP elde etmek için toplandı. Trombosit sayısı tam kanda, TZP'de ve trombositten fakir plazma(PPP)'de ölçüldü(tüm ölçümler FALCO'da yapıldı, Japon). Elde edilen TZP, tendondaki yaralı bölgede kullanılacağı zamana kadar -80 santigrat derecede saklandı. TZP'deki büyüme faktörlerinin konsantrasyonunu doğrulamak için ayrıca TGF- β 1 ve PDGF konsantrasyonları periferik kan, TZP ve PPP'de ELISA yöntemi ile ölçüldü.

Bir başka yöntemde Per Aspenberg ve Olena Virchenko'nun 2004 yılında ratlar üzerinde yaptığı çalışmada tanımlanmıştır. Tüm kanlar dişi Sprague-Dawley sıçanlardan (200gr) kalplerinden toplandı. Alınan kanlar hızlıca antikoagülana eklendi, Daha sonra kan 220g de 20 dakika santrifüj edilir. Süpernatant, trombositten zengin plazmanın olduğu kısım, 480 g'de 20 dakika daha santrifüj edildi. Bu ikinci santrifüjün çöken kısmı toplandı ve trombosit konsantrasyonu Bürkner çemberinde litrede 1.5×10^{12} olana kadar süpernatant kısım ile dilüe edildi. Trombosit konsantrasyonu 20 U /L (200 ünite /mL) trombin eklenerek aktive edildi. Graft versus host reaksiyonunu engellemek için, trombosit konsantrasyonuna uluslararası kan toplama standartlarına göre beyaz küreleri inaktive edici 25 Gy ile irradasyon uygulandı. Cerrahi uygulanana kadar maksimum 24 saat +4 °C'de saklandı. Cerrahiden 6 saat sonra 50 μ L trombosit konsantrasyonu enjekte edildi. 2007'de Nisper H. Ö.' nün makalesinde de TZP hazırlanmasına değinilmiştir. Koagülasyonu önlemek için antikoagülan citrate dextrose phosphate (ACDA) veya Na sitrat ihtiva eden enjektöre hastanın kanı ilave edilerek düşük devirde 10-15 dakika santrifüje edilir. Böylece trombosit içeren plazma alyuvarlardan ayrılır. Elde edilen plazmaya antikoagülan (ACDA veya Na sitrat) eklenir ve yüksek devirde 10-15 dakika santrifüje edilerek trombositler ayrılarak üstte kalan plazma uzaklaştırılır ve böylece TZP hazır hale geldi.

Hangi antikoagülan kullanılacağını ise şöyle açıklanabilmektedir: klinikte kullanılan birçok antikoagülan mevcut olmasına rağmen sadece ikisi trombositlerin

metabolik ihtiyaçlarını karşılar ve hasar görmeden yaşamını devam ettirmesini destekler. Trombositlerin yaşamasını destekleyici en iyi antikoagülan sitrat dekstrozdur (128). Sitrat kalsiyumu baēlayarak antikoagülasyon saēlar. Dekstroz, tamponlar ve diēer içeriklerde trombosit metabolizmasını destekler. Sitrat dekstroz-A, kan bankalarında trombosit transfzyonlarında trombositleri canlı tutmak adına tercih edilen antikoagülandır. Sitrat Fosfat Dekstroz da TZP elde etmede oldukça kullanışlıdır (128). Sitrat dekstroz-A'ya benzer ancak destekleyici içerik daha azdır bu nedenle trombosit yaşamını korumada %10 daha az etkilidir (128).

Doku rejenerasyonu açısından TZP kullanımı klinisyenler ve araştırmacılar için gelişmekte olan bir alandır ve çeşitli cerrahi uygulamalarda da kullanılmaya başlamıştır. Her ne kadar içindeki büyüme faktörleri ve mekanizmaları tam olarak anlaşılmamış olsa da klinik uygulamalarda kolay kullanımı ve iyi sonuçlar elde edilmesi, kanama kontrolü saēlaması, doku iyileşmesini ve kemik rejenerasyonunu hızlandırması TZP için mit verici yönleridir (12). TZP' nin önemli bir zelliēi de hastanın kendi kanından hazırlanıyor olması nedeniyle immünojenik olmaması ve enfeksiyon bulaş riski olmamasıdır. Trombositten zengin plazmanın ortopedik cerrahiler, spor hekimliēi, spinal cerrahiler, kraniofasyal ve periodental cerrahiler gibi geniş bir alanlarda kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların biroēunda klinik kullanımı destekleyen güçlü kanıtlar bulunmuş olmasına raēmen bir bölümündeki sonuçlar yalnız anekdot olarak kalmış bazılarında ise sadece bira kontrol grubu ile çalışılmış zayıf çalışmalardır.

TZP'nin rejeneratif potansiyeli ve dental implantların osteointegrasyonu üzerindeki etkilerinin incelendiēi hayvan çalışmalarında otojen kemik ve TZP kullanımında anlamlı miktarda kemik yoēunluēu gzlediēini (129) ve dental implantların osteointegrasyonunun artabileceēi bildirilmektedir (130).

TZP'nin ksenojenik kemikle kullanımında kemik mineral yoēunluēunda anlamlı bir farklılıēın izlenmediēi, demineralize kurutulmuş kemik matriksi ile kullanımında ise implant kemik yüzeyindeki temasın arttıēı (130) bildirilmektedir. Zechner ve ark. domuzlarda TZP'nin implant kemik temasının 3, 6 ve 12. haftalardaki etkinliēini incelediēi çalışmasında; 3. ve 6. haftalarda implant kemik temasının arttıēı ve TZP'nin iyileşmenin erken dönemlerinden itibaren etkili olduēunu gözlemlemiştir (131). Yapılan başka bir çalışmada ise Aghaloo ve Butterfield ise kemik greftleriyle yaptıkları deneysel hayvan çalışmalarında TZP'nin stnlēn gösterememişlerdir (129,132). Marx tek başına kemik grefti uygulaması ile kemik grefti + TZP uygulamasını karřılařtırdıēında, ikili uygulamada

kemik dansitesinde, kemik biçimlenmesinin hız ve derecesinde artış saptamış ve bunun PDGF ve TGF- β sayesinde olduğunu belirtmiştir (109,128,133).

Thor ve arkadaşları otojen kemik grefti ve TZP kullandığı çalışmasında, TZP'li grupta 3. ayda anlamlı miktarda yeni kemik oluşumu gözlenirken 6. ayda ise herhangi bir farklılığın bulunmadığını rapor etmektedir (134).

Kemik ve yara iyileşmesine katkıları nedeniyle lumbar spinal füzyon hastalarında otogreft ve hidroksiapatitle birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar yanında olumsuz sonuçlar da yayınlanmıştır (76).

Siebrecht ve Aspenberg yaptıkları çalışmalarda TZP'nin poröz hidroksiapatit içine kemik ilerlemesini ve kemik oluşumunu arttırdığını gösteren, sıçan aşıl tendonunda yaptığı çalışmada da TZP uygulanan tendon defektinin tendon kopma kuvvetinde ve tendon kallusunda artış saptamıştır. Ligamanlar üzerinde de benzer etkileri saptanmış ve artroskopik cerrahide kullanımı önerilmiştir (136).

Oftalmolojik cerrahide maküler deliklerin kapatılmasında başarılı sonuçlar bildirilmiş (137) fakat TZP'nin maküler deliklerin tamirinde kullanıldığı başka bir araştırmada, Paques, uzun dönemde iyileşmiş olan deliklerin tekrar açıldığını rapor etmiştir (138), tavşanlarda retinal yaralanmalarda hücre sel cevabı arttırdığı gösterilmiştir (76).

Plastik cerrahide meme küçültme, karın ve yüz germe gibi işlemlerde kullanılmış ve postoperatif dönemde hematoma, ekimoz, seroma oluşumu, dren süresinde kısılma gibi olumlu sonuçları rapor edilmiştir (12,139). Son dönemde yapılan yayınlarda TZP'nin içerdiği birçok büyüme faktörü sayesinde in vivo tendon ve ligament iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (140). TGF- β 'nin tendon kılıfı üzerindeki fibroblastlarda tip I kollajen yapımını arttırdığı gösterilmiştir (141).

İnsanlar üzerinde yapılan in vivo çalışmalarda cerrahi yapılmaksızın tedavi edilen kronik dirsek tendinosisi hastalarda TZP'nin cerrahiye alternatif bir tedavi olduğu gösterilmiştir. Mishra'nın serilerinde on beş inatçı lateral epikondilit hastasında yapılan tek doz TZP enjeksiyonu ile komplikasyon olmaksızın iyileşme olduğu gösterilmiştir (142). Yapılan başka bir çalışmada ise altı aylık kortizon ve TZP'nin karşılaştırmalı sonuçlarında Mishra'nın sonuçlarıyla tutarlı olarak kronik tenisçi dirseğinde TZP ile iyi sonuçlar raporlanmıştır (142). Kon ve arkadaşlarının kronik patellar tendiniti olan yirmi erkek atlet üzerinde 15 günde yapılan üç ayrı TZP enjeksiyonu sonrasında olumlu sonuçlar alınmıştır (143). Sanches ve arkadaşlarının yaptığı bir prospektif bir çalışmada ise 20 profesyonel atletin yirmi iki kas yaralanmasına ultrason eşliğinde yapılan TZP enjeksiyonu sonucu fibrosis gelişmeden iyileşme olduğu bildirilmiştir (144).

Cerrahi işlemler sırasında da TZP kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Sanches ve arkadaşlarının on iki akut aşıl tendon tamiri yapılan hastadan altısında TZP enjeksiyonu yapılmış ve enjeksiyon yapılan hastalarda erken fonksiyonel restorasyon erken ROM dönüşü ve erken dönemde yürüyüşe başladığı ve kontrol grubuna göre daha az skar dokusu geliştiği bildirilmiştir (145).

Randelli ve arkadaşları TZP'nin güvenlik ve sonuçları üzerine TZP ile augmented edilmiş artroskopik rotator kaf tamiri sonuçlarını yayınlamışlar, komplikasyon gelişmemiş ve iki yılın sonunda hastalarda istatistiksel olarak olumlu sonuçlar bulmuşlardır (146).

Everts ve arkadaşlarının yaptığı randomize kontrollü bir çalışmada açık subakromial dekompresyon ve TZP enjeksiyonu yapılan çalışmalarını yayınlamışlar ve sonuç olarak da TZP ile tedavi edilen hastalarda istatistiksel olarak daha hızlı iyileşme, daha az medikal tedavi gereksinimi, daha fazla ROM ve daha hızlı günlük aktivitelere dönüş görüşmüştür (147).

Sanchez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da 2 cm den büyük artiküler kırıkta avülsiyonu olan hastalara K teli ile tespit ve TZP enjeksiyonu yapılmış ve hastalarda mükemmel sonuçlar elde edilmiştir. 18 ay sonunda yapılan MR görüntülemelerinde de kırıkdağın tamamen iyileştiği gösterilmiştir (145).

2.7. Deneyisel Hayvan Modelleri

Günümüzde ortopedi ve travmatolojide kullanılan tedavi yöntemlerinin bir kısmı, ampirik bulguların birikmesi ile oluşan tecrübelerden ibarettir. Örneğin artroplasti cerrahilerinde bugünkü teknolojiye, yıllar boyu insanlar üzerinde yapılan ve etik olmayan yanlış denemeler sayesinde ulaşılmıştır. Ayrıca osteoporoz, romatoid artrit, osteoartrit vb gibi klinik tabloların halen ideal çözümleri yoktur. Çözüm bekleyen medikal problemleri araştırmak için yapılan klinik çalışmaların genel sorunları olarak; (149)

1. Etik unsurlar (Hastalardan aydınlatılmış onam alınması yetmez. Mutlaka etik kurul izni alınmalıdır),
2. Uygun ve homojen kontrol grubu oluşturamamak,
3. Hasta popülasyonunun homojen olmaması, çok sayıda değişkenin varlığı,
4. Belli hastalıklarda hasta sayısının istatistiksel anlam oluşturmayacak kadar az olması,
5. Randomize, çift kör çalışma yapmakta karşılaşılan sıkıntılar (örneğin farklı cerrahi girişimlerin sonuçlarını karşılaştıracak bir çalışmada cerrahin kör bırakılmaması gibi)

Sonuç olarak araştırma çalışmalarında uygun model arayışları, ortopedistleri deneysel hayvan modellerine yönlendirmiştir.

Kemiğin temel biyolojisi ve kırık iyileşmesi ile ilgili temel bilgiler deney hayvanları ile yapılan deneylere dayanmaktadır. Fare, rat gibi kemirgenlerin iskelet sistemlerinde haversiyan sistemleri olmaması ve anatomik olarak da daha küçük olmaları onlar ile yapılan deneyler için bir dezavantajdır. Tavşan, kedi gibi daha üst filo genetik sınıflara yükseldikçe haversiyan sistemi ortaya çıkmaktadır. Ayrıca her tür için kullanılan ilaçlar ve dozlarda farklıdır. Örneğin; köpeklerde gastrointestinal sistem yan etkileri nedeniyle antiinflamatuvar ilaçlar düşük dozlarda kullanılmalıdır. Kedilerde glukoronil transferaz enzim eksikliği nedeniyle aspirin gibi ilaçlar kullanılamaz. Ayrıca aspirin ve indometazinin ratlarda kırık iyileşmesini uzattığı gösterilmiştir. Kemoterapi, radyoterapi gibi tedaviler kırık iyileşmesini olumsuz etkileyecektir. Ratlar ile yapılan deneylerde internal fiksasyon şansı zordur, ayrıca kemiklerin dayanırlık ve sertliğini de değerlendirmek in vivo olarak zordur. Kemiklerin küçük olması nedeniyle aynı kemikten biyoloji, histoloji ve mekanik değerlendirme gibi farklı çalışmalar için örnek almak her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle deneye başlamadan önce pilot çalışma yapılmalı ve buna göre de deney hayvan sayısı belirlenmelidir (150,151).

2.7.1. Kemik Modelleri

Fare, sıçan, tavşan, köpek ve koyunda tibia, femur, radius ve mandibula kemikleri için kullanılmaktadır.

Kırık İyileşmesi Modelleri: En çok kullanılan denekler rat, tavşan ve köpektir. Sprague- Dawley tipi ratların femurlarının, insan femurlarına göre farklı morfolojik özellikleri vardır (yüksek baş boyun ve anteverسیون açısı, ince korteks ve ince medulla çapı). Wistar tipi ratların femurları ise insaninkine daha yakın morfolojiye sahiptir(152). Bu yüzden kırık iyileşmesi çalışmalarında Wistar tipi ratlar tercih edilmelidir. Fakat bilinmelidir ki kemirgenlerin iskelet sisteminde haversiyan kanalları yoktur ve bu yüzden kırık hattında remodelasyon işlemi farklıdır. Haversiyan sistem remodelasyonunu araştırmak için tavşan ve köpekler daha uygun hayvanlardır (151).

Geç Kaynama ve Kaynamama: Geç kaynama modeli olarak ratlarda Lu C ve arkadaşlarının tanımladığı femoral arter rezeksiyonu ile oluşturulan iskemi zemininde tibia kırığı modeli kullanılabilir (153). Deney hayvanlarında kaynamama sağlamak zordur. Genelde kırık hattından rezeksiyon yapılarak modeller oluşturularak bonvaks ile kırık

uçlarının kapatılması kaynamama modeli olarak sunulmuştur (154). Kemik rezeksiyonu sonrası internal-eksternal tespit de uygulanabilir (155). Kırık hattından proksimal ve distale doğru periostu 2 mm koterize etmek veya sıyırmak da “kaynamama” oluşturan modellerdir.

Eklemler Modelleri: Rat, tavşan, koyun, köpek ve keçiler özellikle diz eklemleri ile kullanılmaktadır.

2.7.2. Kıkırdak İyileşmesi Modelleri

Kıkırdak iyileşmesini araştırmak için yıllardır kullanılan modeller, genellikle hayvanların femur medial kondil ya da tibia plato kıkırdağında tam kat (1-5 mm çaplı) defekt yapmak şeklindedir (156,157). Bu defektler artrotomi ile ya da artroskopik olarak biyopsi punçları yardımıyla yapılabilir. Bu modellerin en büyük sıkıntısı kaybın derinliğini ayarlamak için standart cihazlar oluşturmamaktır. Çünkü kıkırdak iyileşmesini etkileyen faktörler hem kaybın büyüklüğü hem de derinliğidir. Oluşturulan defektin (büyüklüğü genellikle 2x2 mm) derinliği tavşanlarda 0.5 mm den az, köpeklerde ise 1 mm kadar olabilmektedir (158). Ayrıca hayvanların diz biyomekaniği insan dizinden çok farklıdır. Fakat yine de bu deneylerden elde edilen sonuçlar insan eklem kıkırdağı tamiri için yol gösterici olmuştur. Tam kat olmayan parsiyel kıkırdak kaybı olan çalışmaları için Lu Y ve arkadaşlarının koyunlarda oluşturdıkları artroskopik, parsiyel (200 microm) defekt (1.5x1.5cm²) modeli kullanılabilir (159). Kıkırdakta künt travma oluşturmak için Milentijevic D ve arkadaşlarının kullandığı Rabbit Impact Test System (RITS) ideal bir modeldir. Bu modelde tavşan bir frame içinde sabitlenerek femoral kondil cerrahi olarak ekspozite edilir ve impaktör bu noktaya hedeflenerek travma gerçekleştirilir (160).

2.7.3. Tendon Modelleri

Rat (Aşil ve kuyruk tendonu), tavşan (Aşil tendonu), köpek (Aşil, peroneal ve ayak derin fleksörleri) ve tavuk (Aşil, Ayak fleksör tendonları) kullanılmaktadır.

A) Tendon İyileşmesi Modelleri: Tendon iyileşmesini ve yapışıklık gelişip gelişmediğini inceleyen çalışmalar için komplet ya da parsiyel tenotomi, greft alınması, defekt yaratılması gibi modeller tanımlanmıştır (161,162). Cerrahi girişim sonrası deneklerin ekstremitelerini alçı vb. metotlar ile tespit etme gereksinim yoktur. En sık kullanılan model tavşan aşil tendonu modelidir. Tavşan aşil tendonu ile insan aşil tendonu

benzerliğini USG, MRG ile araştıran bir çalışmada tavşanda soleus kası olmadığı ve tavşandaki flexor digitorum superficialis tendonunun aşıl tendonu kadar geniş olduğu ortaya konmuştur. Deney sonuçları genellikle makroskopik, histolojik ve biyomekanik(yüklenme-deformasyon; siklik yüklenme-deformasyon testleri) olarak değerlendirilir (163).

B) Tendinozis modelleri: Ekstrinsik bası (impingement) ile oluşturulan tendinozis modeli olarak ratlarda rotator kaf tendinozis modeli tanımlanmıştır. Akromiyona fasya-tendon allogrefti sararak subakromial mesafeyi daraltmak şeklinde uygulanır (164). Aşırı kullanıma bağlı oluşan tendinozis araştırmaları için ratların 1 saat/gün, 5 gün/hafta sıklıkta özel koşu bantlarında koşturulması modeli tanımlanmıştır (165). Bu tekniklerden farklı olarak tendinozis oluşturmak için tendon içine kollajen liflerinde hasar yapan maddeler (Steroid , kollajenaz) enjekte edilebilir (166,167).

2.7.4. Enfeksiyon Modelleri

Rat, fare, tavşan ve köpekler bu modeller için kullanılmaktadır.

Klinik olgularda, enfeksiyonun ne zaman başladığını bilmek ve değişkenlere (bağışıklık sistemi, bakteri virölansı vb.) müdahale edebilmek şansı olmadığı için kontrollü çalışmalar yapmak olası değildir. Bu durumda hayvan deneyleri, enfeksiyon patogenezi ve tedavi seçeneklerinin incelenebildiği en güvenilir yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Sonuçlar histolojik, elektron mikroskopik ve mikrobiyolojik (kantitatif kültürler) olarak değerlendirilir. Kemik ve eklem enfeksiyonu modellerini ayrı incelemek daha doğru olacaktır.

A) Osteomyelit Modelleri: Deney hayvanlarında osteomyelit oluşturmak için lokal kemik hasarı yapmak şarttır (168). Bu amaçla kemik içine sklerozan madde enjekte etmek, yüksek devirli burr gibi yöntemler kullanılabilir. Kemik hasarı sonrasında bakterinin sistemik veilmesi, lokal uygulanması veya önceden kolonize edilmiş implant - yabancı cisim gibi yöntemlerle ve genellikle staf. aureus kullanılarak osteomyelit modeli oluşturulur.

B) Septik Artit Modeli: Bu model için en sık fareler kullanılır. Klinikte genelde sistemik bulaş nedeniyle enfeksiyon gelişmesi nedeniyle farelerde kuyruk veninden Staf. Aerus suşu verilerek model oluşturulur (169).

2.7.5. Osteoporoz Modelleri

Bu model için en çok rat, koyun ve köpek kullanılmaktadır. Ratların kemik kitlesi, vücut kitlelerine oranla zaten çok azdır. Ayrıca kansellöz/kortikal oranı insandakinden çok daha az olması nedeniyle senil osteoporoz deneyleri için ideal değildirler. Köpek ve koyunların haversian kanalları ise insaninkine benzer yapıda olduğu için daha uygun hayvanlardır (170).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Bülent Ecevit Üniveristesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı'nın 27.05.2011 tarih ve 1564-2599 sayılı izni ile Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezin'nde gerçekleştirildi.

Çalışmada iskelet sistemi gelişimini tamamlamış Wistar albino tipi ratlar kullanılmıştır. Denekler arası genetik farklılıkları azaltmak için ratların tamamı aynı hayvan laboratuvarından temin edilmiştir.

Çalışmada 350-400 gr olan 52 adet Wistar tip erkek rat kullanıldı. Deney grubundaki tüm hayvanlar standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslendi. Ratlar uygun kafeslerde 22 $\pm$ 2 derece sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Cerrahi sonrasında tüm hayvanlara kendilerine ayrılmış olan odaya alınıp, ikili gruplar halinde kafeslere konularak uzman veteriner kontrolünde izlenmiştir. Çalışmanın ilk haftasında kontrol grubundan 1 adet rat ölmesi nedeniyle deneyden çıkartıldı.



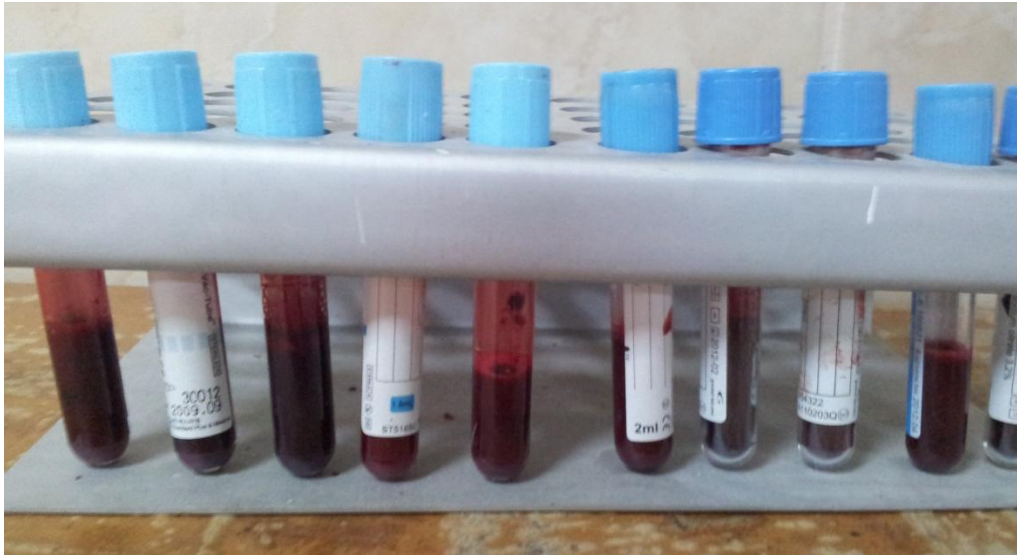
Şekil 6: Kullandığımız Ratlar.

Cerrahi işlemler, anestezi altında (rat başına 75 mg/kg intraperitoneal %10'luk ketamin enjeksiyonu), aynı cerrah tarafınca uygulandı.

Trombositten Zengin Plazma (TZP) hazırlamak için gereken kan 75 mg/kg intraperitoneal %10 ketamin (Ketalar - Pfizer) ile anestezi uygulanmış dört adet rattan alınan intrakardiak alınan toplam 30 cc kadar kandan elde edildi.

3.1. Trombositten Zengin Plazma Hazırlanması

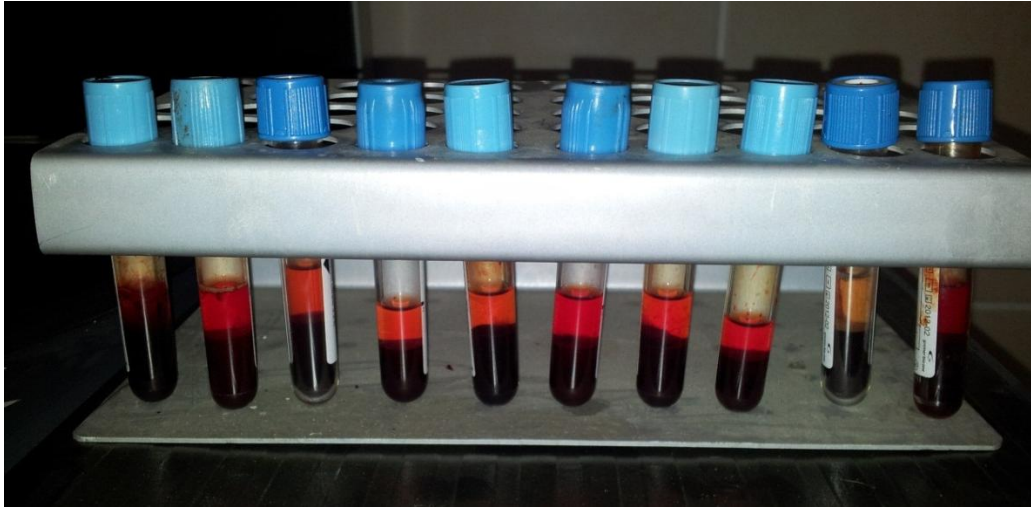
Trombositten Zengin Plazma hazırlamak için gereken kan 75 mg/kg intraperitoneal %10 ketamin uygulanması sonrasında ratlardan sternotomi sonrasında intrakardiak toplam 30 cc kadar kan alındı. Kanlar pıhtılaşmasını önlemek için % 3.2'lik sodyum citratlı tüpe alındı. Alınan kanlar önce 3000 devirde 7 dakika santrifüj edilerek eritrositler tüpün alt kısmında toplanıp plazma, trombositler vb. kan elemanlarının ayrıldığı görüldü. Üstte toplanan açık sarı renkli plazma ile alt tabakada kalan eritrositler arasında kalmış olan trombositler ve beyaz küreler tarafınca oluşturulmuş 'buffy coat ' izlendi. Üzerindeki plazma ile beraber bu tabakada pipetler yardımıyla alındı ve başka tüplere konuldu. Ardından bu sefer 4000 devirde 7 dakikalık ikinci santrifüj yapıldı. Bu işlem sonunda önceki santrifüj sayesinde ayrıştırılan trombosit ve plazmaya karışan eritrositlerin dibe çöktüğü, trombositlerin eritrositlerin üzerinde yine beyaz ince bir tabaka oluşturduğu görüldü. Oluşan trombosit zengin plazma konsantresi ve trombosit fakir plazma ayrıştırılıp farklı tüplere alındı.



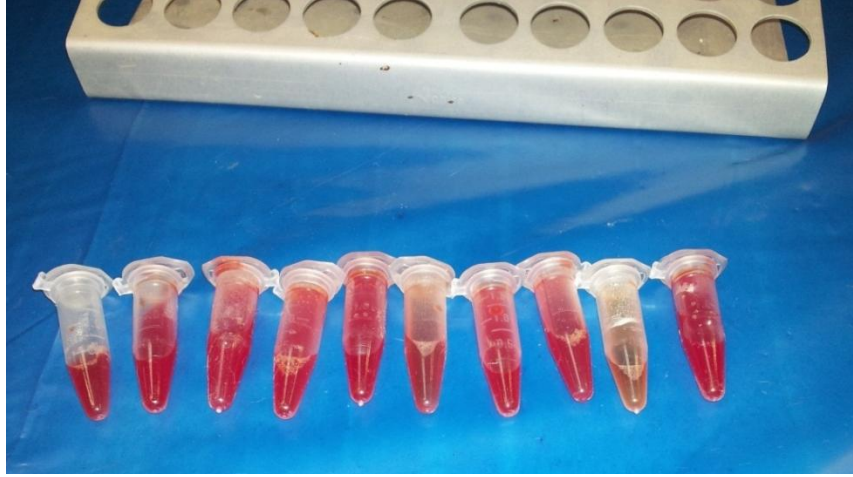
Şekil 7: Ratlardan Elde Edilen ve TZP İçin Kullandığımız %3.2'lik Sodyum Citratlı Tüpteki Kanlar.



Şekil 8: Santifüj Aleti.



Şekil 9: İlk Santrifüj Sonrası Kanlar.



Şekil 10: Ratlardan Elde Edilen TZP.

3.2. Deney Modeli ve Cerrahi İşlemler

Çalışmamızda ratlara 75 mg/kg ketamin intraperitoneal infüzyonu sonrasında uygun anestezi derinliği sonrasında ratların sağ önkolları tüylerden arındırıldı, batikon ile cilt temizliği yapıldıktan sonra temiz örtü ile örtüldü ve önkol dorsalinden uzunlamasına insizyon ile girildi. Cilt cilt altı, fasya ve kas tabakası geçilerek radiusa ulaşıldı. Radius kemik çapının iki katı kadar uzunlukta (5 mm kadar) segment çıkarıldı ve cerrahi işlemler sonrasında cilt primer kapatılarak ratlar serbest bırakıldı. İnterosseoz membran ve ulna sağlam bırakıldığı için herhangi bir tespit yöntemi kullanılması gerekmemiştir. Böylece hem cerrahi işlem basitleştirilmiş hem de cerrahi işlemler sonrasında ratların bakım ve beslenme ihtiyaçları azalmıştır (171-175). On haftalık bekleme - iyileşme süreci sonunda yüksek doz ketamin ile yapılan anestezi sonrasında intrakardiak yoldan kanları alınarak ratlar kurban edildi ve ardından önkolları diseke edilerek dirsek ve el bileği eklemleri dezartiküle edildi ve radius periostuna zarar vermeden ulna ile beraber eksize edildi. Eksize edilen ön kollar %10 luk formole konularak bekletildi ve ardından dekalsifikasyon işlemi sonrasında histolojik ve histomorfometrik inceleme yapıldı.

Çalışmamızda deney grupları şu şekilde hazırlanmıştır;

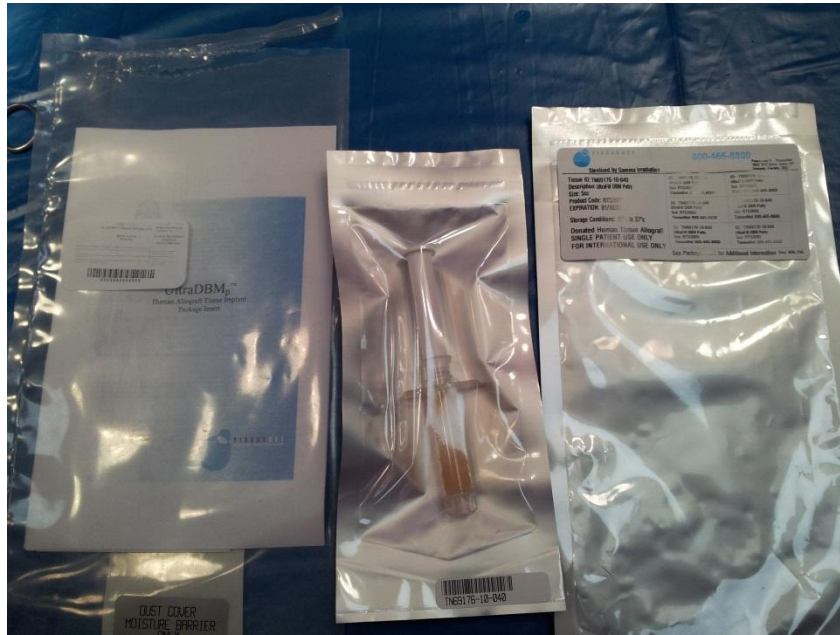
1. Grup: Ratların önkolunda radiuslarından segment çıkarılmış ve defektif alan boş bırakılmıştır.(Kontrol grubu)
2. Grup: Ratların önkolunda radiuslarından segment çıkarılmış ve defektif alana allojenik kandan hazırlanan Trombositten Zengin Plazma ile greftlenmiştir.(TZP grubu)

3. Grup: Ratların önkolunda radiuslarından segment çıkarılmış ve defektif alan Trombositten Zengin Plazma ve Demineralize Bone Matriks(DKM) (Ultra DBM-Tissuenet-USA) İle greftlenmiştir. (TZP-DKM kombinasyon grubu)
4. Grup: Ratların önkolunda Radiuslarından segment çıkarılmış ve defektif alan Demineralize Bone Matriks (DKM) ile greftlenmiştir. (DKM grubu)

Her grup on iki adet rattan oluşmuştur. On haftalık iyileşme periyodu beklenmiş ve bu periyot sonunda ratlar yüksek doz ketamin anestezisi altından intrakardiyak yoldan kanları alınarak sakrifiye edilmiştir (176).

Tablo 6: Deney Grupları.

GRUP	DEFEKT
1	Kontrol (Boş)
2	TZP
3	TZP+ DKM (DBM)
4	DKM (DBM)



Şekil 11: DBM (DKM).



Şekil 12: Anestezi Sonrası Ratın Cerrahiye Hazırlanması.



Şekil 13: Önkolun Tüylerden Arındırılmış Cerrahi İçin Hazır Hali.



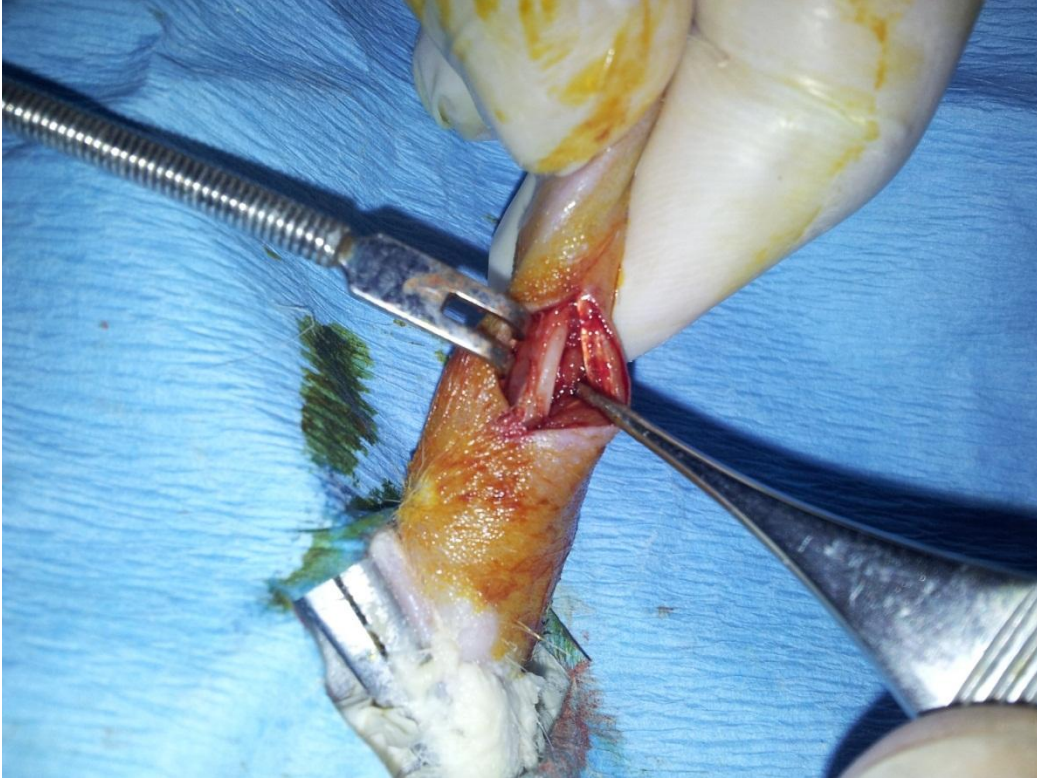
Şekil 14: Önkolun Batikon ile Cilt Antisepsisi Yapılması.



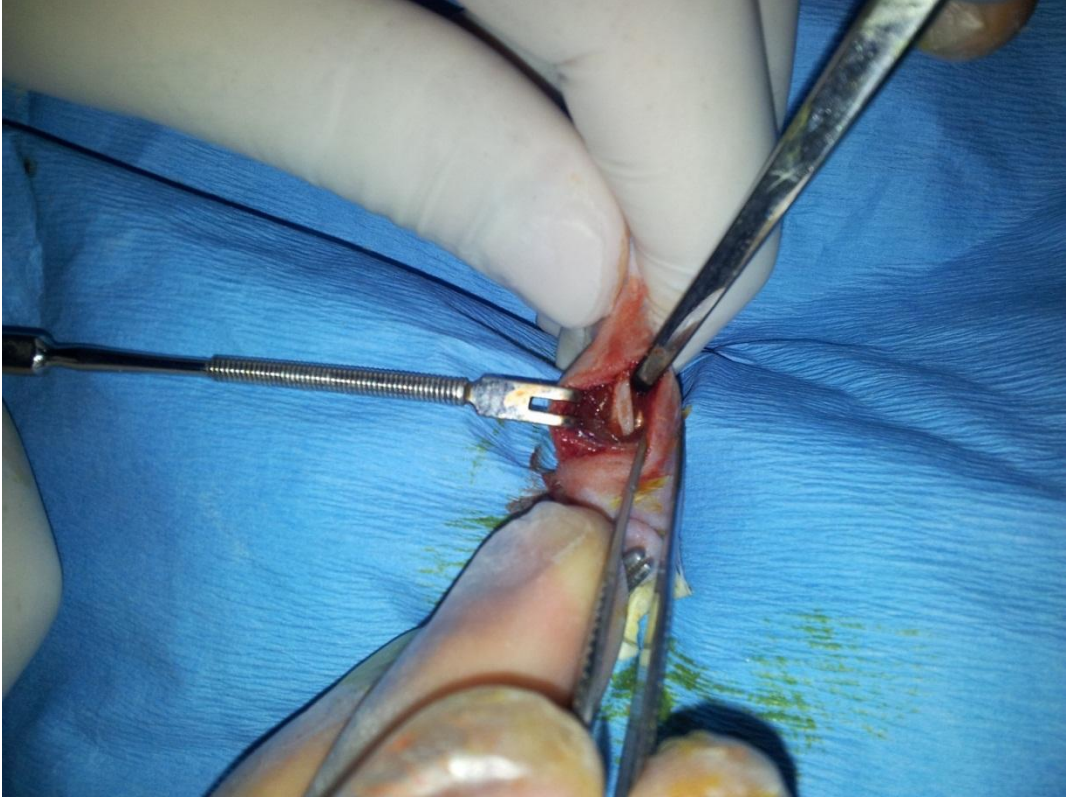
Şekil 15: Önkola Dorsal İnsizyon.



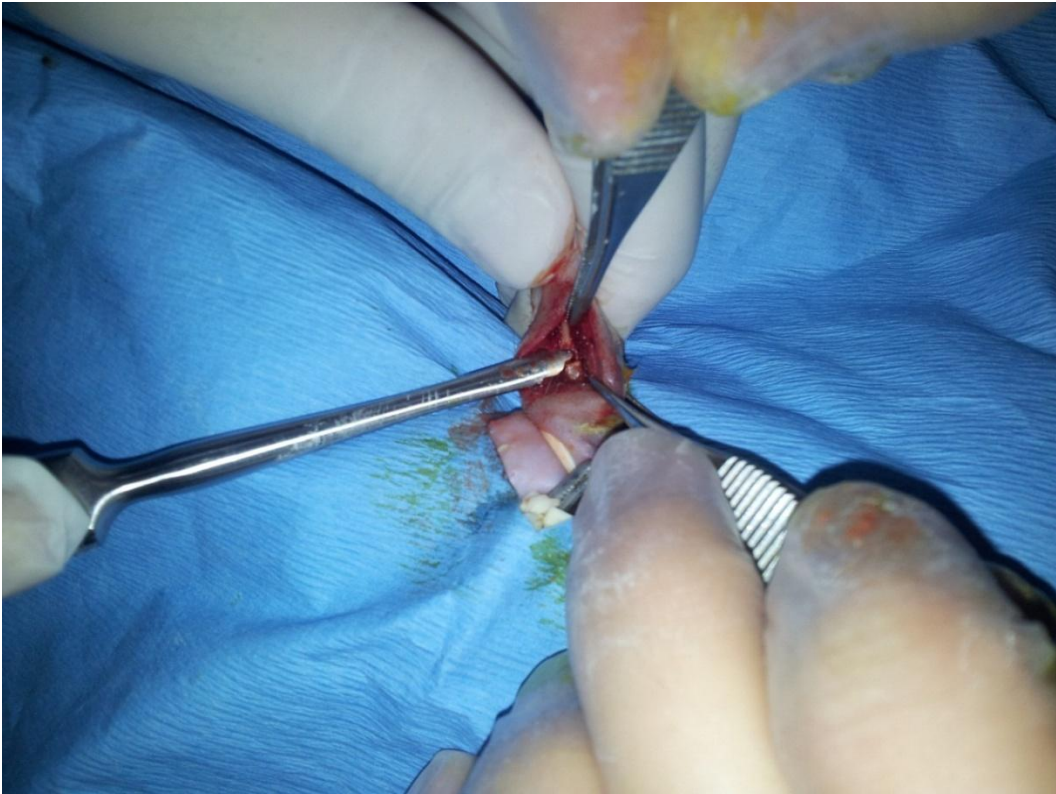
Şekil 16: Önkola Dorsal İnsizyon Sonrası.



Şekil 17: İnsizyon Sonrası Radiusun Diseksionu.



Şekil 18: Radiusun Ortaya Konması.



Şekil 19: Radiusta Yapılan Defekt.



Şekil 20: Defekte TZP Uygulanması.



Şekil 21: Defektin DKM ile Greftlenmesi.



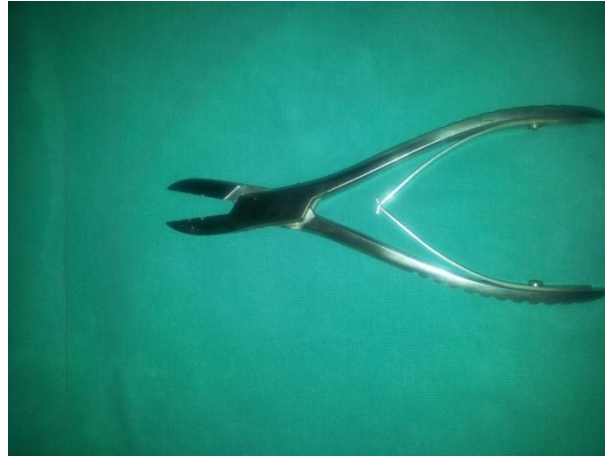
Şekil 22: Cilt İnsizyonunun Kapatılması.



Şekil 23: Cerrahi İşlem Sonrası Rat.



Şekil 24: Cerrahi İşlemler Sonrası Ratların Barındırılması.



Şekil 25: Kemik Defekti Yapmak İçin Kullandığımız Kostatom.

3.3. Radyolojik Değerlendirme

On haftalık iyileşme periyodu sonrasında feda edilen deneklerin her iki dirsekleri dezartiküle edildikten sonra ait oldukları gruplara göre ayrılmıştır ve her grubun karşılaştırmalı anteroposterior ve lateral grafileri çekilmiştir.

Radyolojik değerlendirme; daha önce Cook (171) ve arkadaşları tarafınca anlatılmış olan radyolojik değerlendirme tablosu kullanılarak yapılmıştır (Tablo 7). Bu değerlendirme tekniğinin, daha önce yapılan çalışmalarda, deneyimli gözlemcilerin sonuçları ile uyumlu

olduğu gösterilmiş olduğundan, radyodansite ölçümü için özel bir araç kullanılmamıştır (5,172,177,178).

Tablo 7: Radyolojik Değerlendirme Cetveli (179).

Radyoloji derecelendirme	Puanı
Defekt içerisinde radyodens değişiklik izleri yok	0
Defekt içerisinde radyodens değişiklik izleri	1
Yer yer kalsifikasyon gösteriyor, defektte köprüleşme yok	2
En az bir noktada köprüleşme var	3
Uniform kalsifikasyon ile medial ve lateral kenarda köprü var	4
3. derece ile aynı, ancak en az bir kortekste yeni kemik var	5
Defekt düzgün kemik ile kaynamış, defekt görülüyor	6

Salkeld S.L, Patron L.P, Barrack R.L, Cook S.D, The Effect of Osteogenic Protein-1 on the Healing of Segmental Bone Defects Treated with Autograft or Allograft Bone, The Journal Of Bone & Joint Surgery .Jbjs.Org Volume 83-A · Number 6 · June 2001’ den alınmıştır.

3.4. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik değerlendirme Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Değerlendirmeyi yapan patoloğa örneklerin ait olduğu gruplar hakkında bilgi verilmemiştir. Materyaller üç gün %10 luk formaldehit solüsyonunda fikse edildikten sonra % 10 formik asit içeren dekalsifikasyon solüsyonunda 10 gün süre ile bekletilmiştir. Yeterli dekalsifikasyonun sağlandığı görüldükten sonra örnekler parafin bloklara gömülerek 5µm kalınlığında kesitler alınmış ve hematoksilin-eozin ile boyanmıştır. Salkeld ve arkadaşları tarafından kullanılan histopatolojik değerlendirme kriterleri kullanılarak deney hayvanlarında oluşturulan kemik defekti hatlarında gelişen iyileşme yanıtı değerlendirilmiştir (179) (Tablo 8).

Tablo 8: Histolojik Değerlendirme Cetveli (179).

Kaynama kalitesi			
	Hiç kaynama belirtisi yok		0
	Fibröz kaynama		1
	Fibrokartilaj veya kartilaj kaynama		2
	Mineralize kırık ve kemik kaynaması		3
	Tam kemik kaynaması		4
Korteks Gelişimi ve Remodelling			
	Korteks oluşumu yok		0
	Dış kenarlarda yeni korteks yoğunlaşması		1
	Belirgin dış korteks ve medulla oluşumu		2
	Korteks oluşmuş ancak köprüleşme yok		3
	Defektin tam köprüleşmesi ve korteks oluşumu		4
Yeni Kemik oluşumu			
	Yeni kemik oluşumu yok	Yeni kemik yok	0
		Az miktarda yeni kemik ile inkorporasyon var	1
		Orta miktarda yeni kemik ve inkorporasyon var	2
	Artmış yeni kemik oluşu	Yeni kemik var, erken remodelizasyon var	3
		Belirgin yeni kemik	4
		İyi kemik inkorporasyonu ve yeni, kemik	5
	Yaygın yeni kemik	Mükemmel kemik inkorporasyonu, ileri derecede remodelling	6

(Salkeld S.L, Patron L.P, Barrack R.L, Cook S.D, The Effect of Osteogenic Protein-1 on the Healing of Segmental Bone Defects Treated with Autograft or Allograft Bone, The Journal Of Bone & Joint Surgery Jbjs.Org Volume 83-A · Number 6 · June 2001’ den alınmıştır. Salkeld çalışmasında oto ve allogreftler kullanmış ve histopatolojik değerlendirme kriterleri arasında greft inkorporasyonu da eklemiştir fakat çalışmamızda greft kullanmadığımız için Salkeld’in kriterlerini modifiye ederek kullanılmıştır.)

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme bilgisayar ortamında ve SPSS 18.0 (Customer number: 114094, 2012, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak B.E.Ü Tıp Fakültesi Biyoistatistik A.D’ da yapıldı. Değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortanca (min-max)

olarak ifade edildi. Radyolojik ve patolojik sonuçlar bakımından grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis varyans analizi sonucunda grupların ikişerli karşılaştırılması Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon testi ile yapıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirilmiş ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tez çalışmamızda toplam 52 adet rat kullanılmış olup bunlardan dört tanesi deney yapım aşamasında sakrifiye edilerek intrakardiak kanları alınarak TZP hazırlanmıştır. Kalan 48 adet deneğimize tek önkollarında radiusta kemik defekti oluşturulmuş ve deney gerçekleştirilmiştir. Sağ önkolda interosseöz membranın intakt olması ve ulnanın sağlam olması nedeniyle herhangi bir tespitte gerek duyulmamış olup diğer önkolları sağlam olduğu için de ratlarda beslenme gibi konularda bir kısıtlanma olmamıştır. Deney süresince kontrol grubumuzdan 1 adet rat ölmüş olup diğer gruplarda herhangi bir kaybımız olmamıştır ve ratlarda yara yeri enfeksiyonu veya başka bir komplikasyon gelişmemiştir. Onuncu haftanın sonunda ratlar yüksek doz anestezi verilerak sakrifiye edilmiş ve önkolları diseke edilerek patolojik incelemeye geçmiştir.

4.1. Radyolojik Değerlendirme Bulguları

İyileşmenin radyolojik olarak değerlendirilmesinde kontrol grubu ile TZP grubu ve TZP grubu ile TZP-DKM kombine grubu arasında TZP lehine anlamlı derecede fark bulunmuştur ($p=0.007$). Kontrol grubu ile TZP-DKM kombinasyon grubu arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır. Kontrol grubu ile DKM grubu arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır. DKM grubu ile TZP-DKM kombinasyonu olan grup arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır. Radyolojik inceleme sonrasında TZP grubunun en iyi skorlara sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 26: Kontrol grubu, önkol AP grafi



Şekil 27: TZP grubu, önkol AP grafi



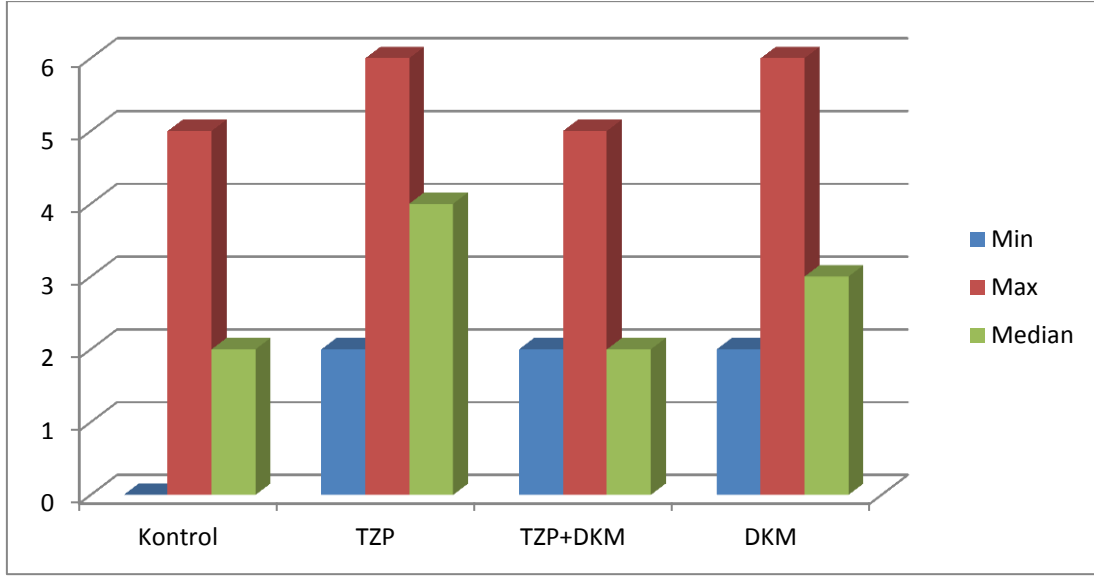
Şekil 28: TZP+DKM grubu, önkol AP grafi



Şekil 29: DKM, önkol AP grafi

Tablo 9: Çalışma Gruplarında Radyolojik Değerlendirme Skorlaması Sonuçları.

Radyolojik değerlendirme bulguları	Kontrol (n:11)	TZP (n:12)	TZP+DKM (n:12)	DKM (n:12)
Min	0	2	2	2
Max	5	6	5	6
Median	2	4	2	3



Şekil 30: Radyolojik Değerlendirme Sonuçlarının Grafiksel Dökümü.

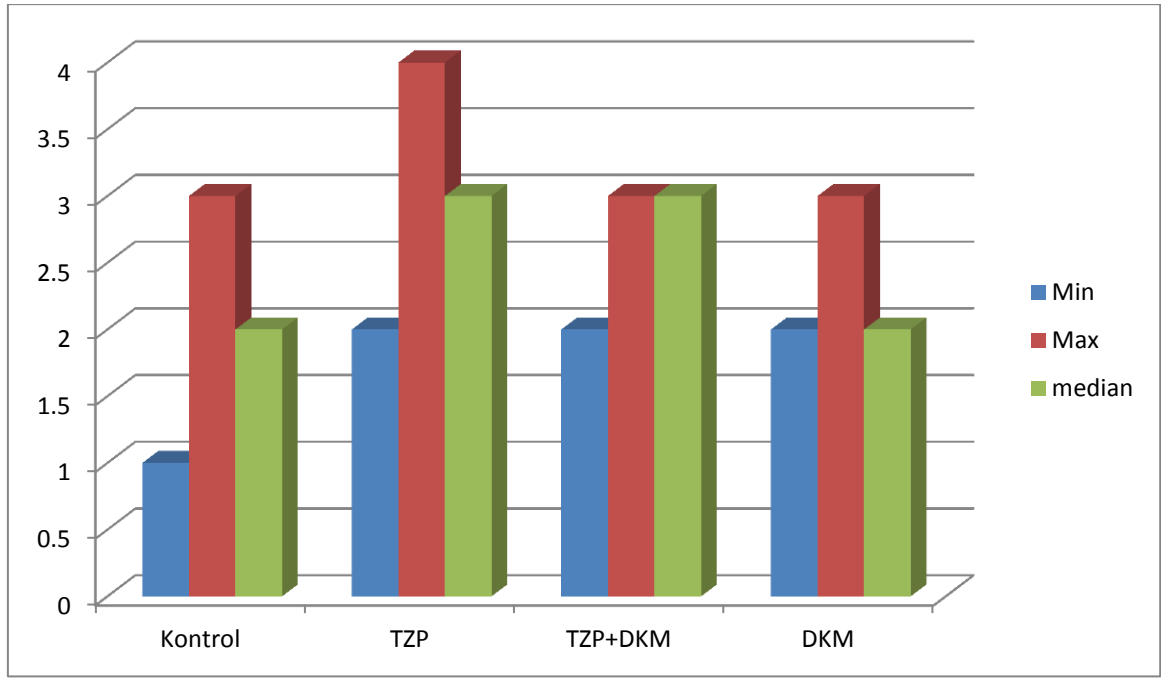
4.2. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Işık mikroskobu ile yapılan histopatolojik inceleme sonucunda elde edilen veriler istatikselsel olarak değerlendirilmiştir. Histopatolojik değerlendirme 1-Kaynama kalitesi, 2-Korteks gelişimi ve remodeling (yeniden şekillenme) 3-Yeni kemik oluşumu parametrelerine göre yapılmıştır.

Kaynama kalitesi açısından gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur ($p<0.001$). Kaynama kalitesi açısından kontrol grubu ile TZP grubu arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur. Kontrol grubu ile TZP- DKM kombine grubu arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur. TZP grubu ile DKM grubu arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur. Kontrol grubu ile DKM grubu arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır. TZP grubu ile TZP-DKM grubu arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır. TZP –DKM kombine grubu ile DKM grubu arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır.

Tablo 10: Salkeld Sınıflamasına Göre Kaynama Kalitesi Skorlarının Değerlendirme Sonuçları.

Kaynama kalitesi	Kontrol (n:11)	TZP (n:12)	TZP +DKM (n:12)	DKM (n:12)
Min	1	2	2	2
Max	3	4	3	3
Median	2	3	3	2

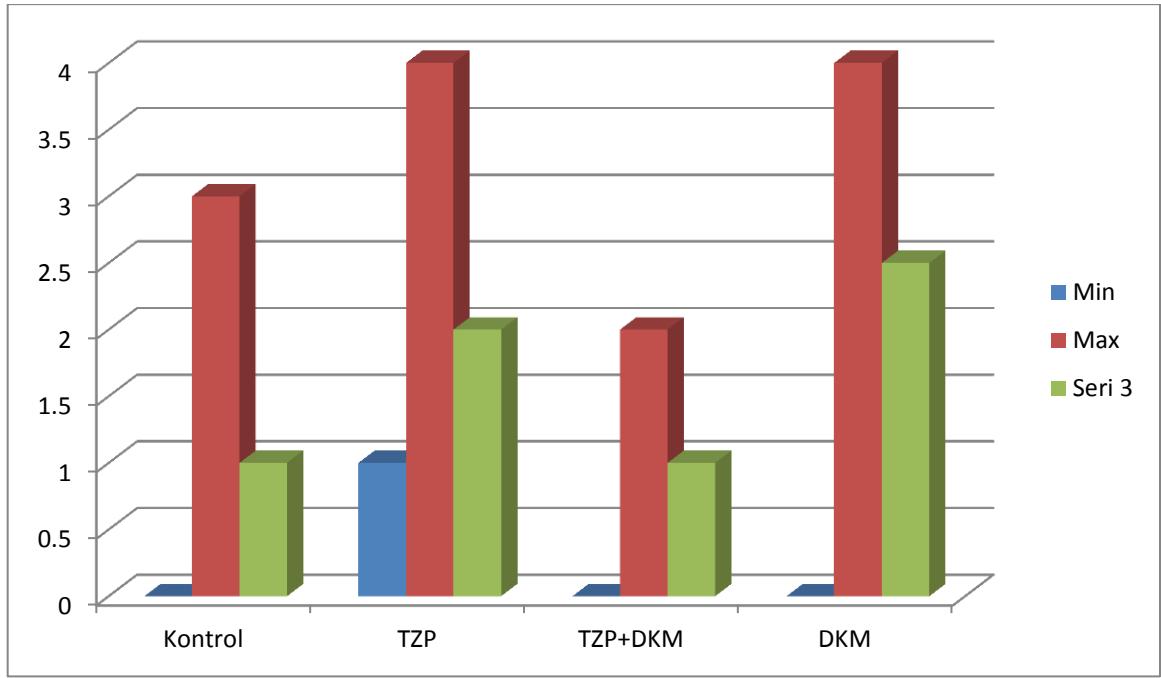


Şekil 31: Salkeld Sınıflamasına Göre Kaynama Kalitesi Skorlarının Grafikseldökümü.

Korteks gelişimi ve remodeling (yeniden şekillenme) açısından değerlendirildiğinde TZP grubu ile TZP-DKM kombine grubu arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur. TZP-DKM kombine grubu ile DKM grubu arasında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.010$). Kontrol grubu ile TZP grubu arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır. Kontrol grubu ile TZP-DKM kombine grubu arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır. Kontrol grubu ile DKM grubu arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır. TZP grubu ile DKM grubu arasında korteks gelişimi ve remodeling açısından anlamlı derecede fark bulunamamıştır.

Tablo 11: Salkeld Sınıflamasına Göre Korteks Gelişimi ve Yeniden Şekillenme Skorlarının Değerlendirme Sonuçları.

Korteks gelişimi ve remodeling	Kontrol (n:11)	TZP (n:12)	TZP+DKM (n:12)	DKM (n:12)
Min	0	1	0	0
Max	3	4	2	4
Median	1	2	1	2,50

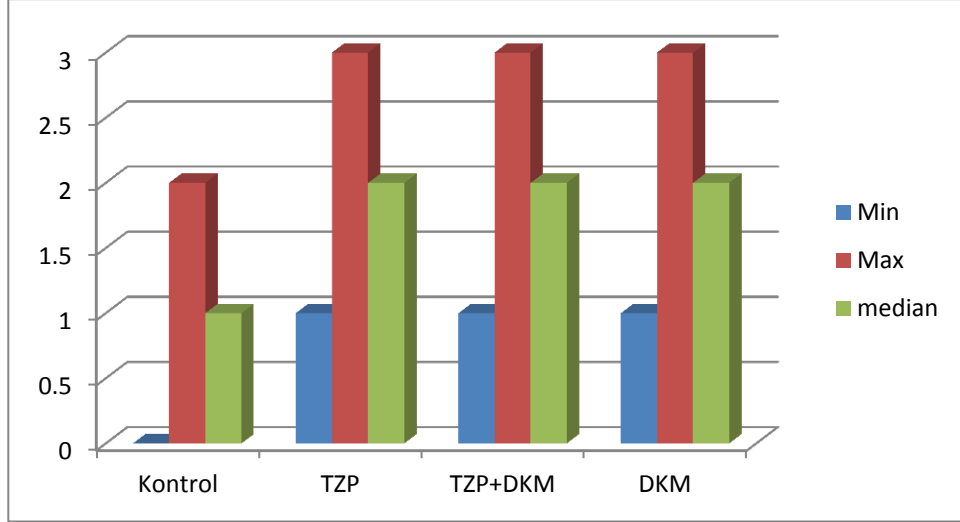


Şekil 32: Salkeld Sınıflamasına Göre Korteks Gelişimi ve Yeniden Şekillenme Skorlarının Değerlendirme Sonuçları.

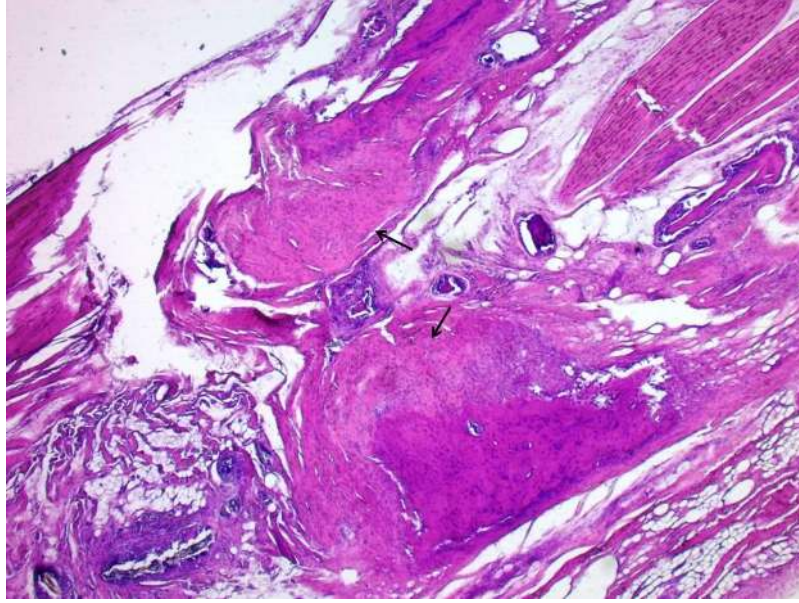
Yeni kemik oluşumu bakımından kontrol grubu TZP grubu, TZP-DKM kombine grubu ve DKM grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuş olup diğer gruplar arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır ($p=0.003$).

Tablo 12: Salkeld Sınıflamasına Göre Yeni Kemik Oluşumu Skorlarının Değerlendirme Sonuçları.

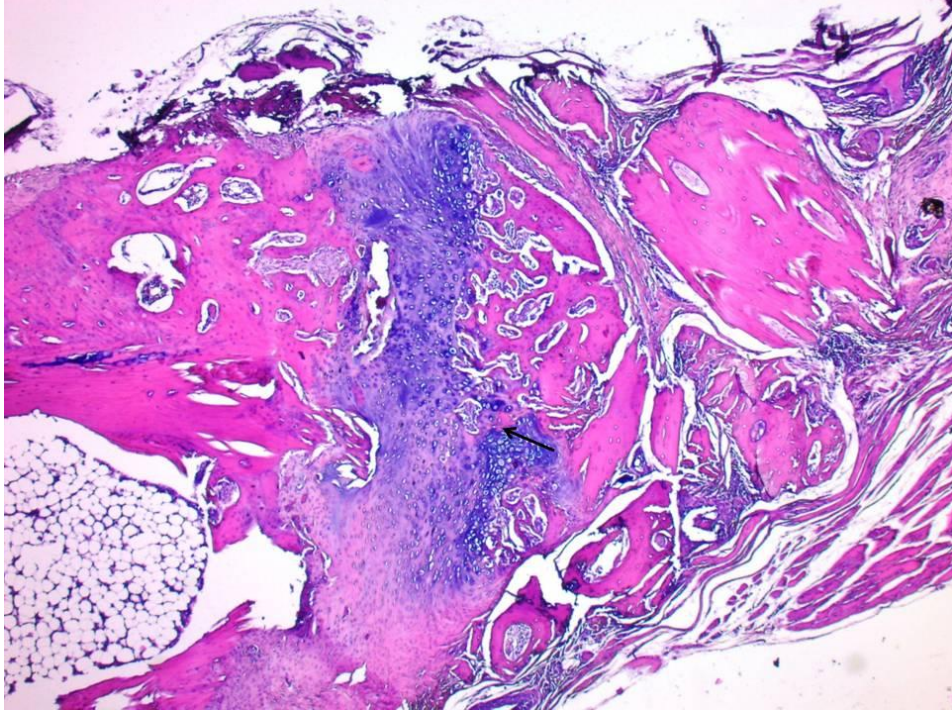
Yeni kemik oluşumu	Kontrol (n:11)	TZP (n:12)	TZP+DKM (n:12)	DKM (n:12)
Min	0	1	1	1
Max	2	3	3	3
Median	1	2	2	2



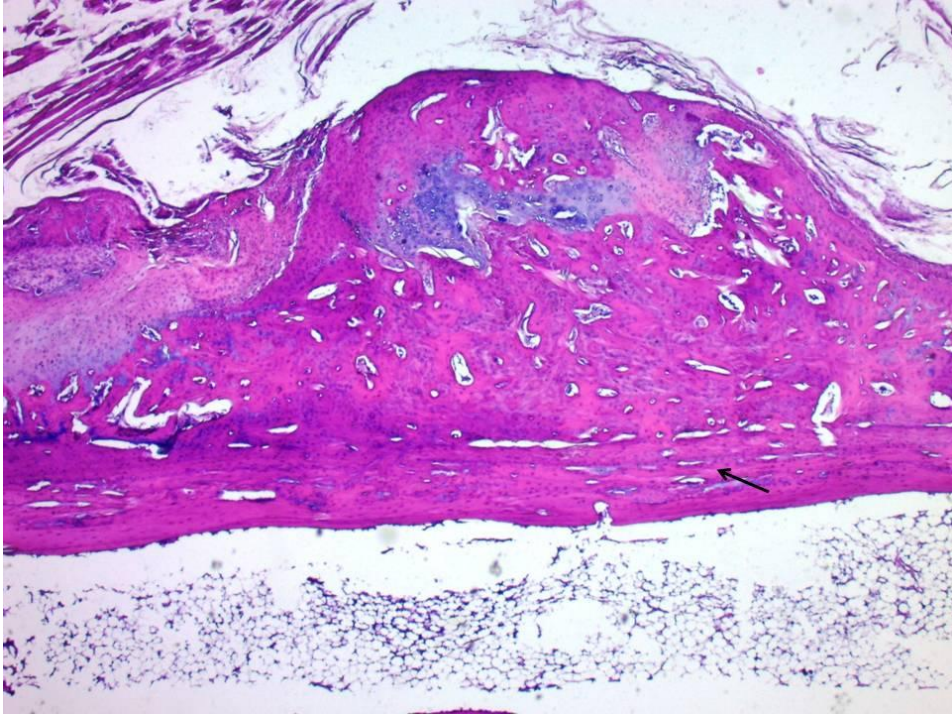
Şekil 33: Salkeld Sınıflamasına Göre Yeni Kemik Oluşumu Skorlarının Değerlendirme Sonuçlarının Grafikseldökümü.



Şekil 34: Kontrol Grubuna Ait Örnekte Defekt Bölgesi Fibröz Doku (ok) İle Dolmuştur, Korteks Oluşumu Yoktur.

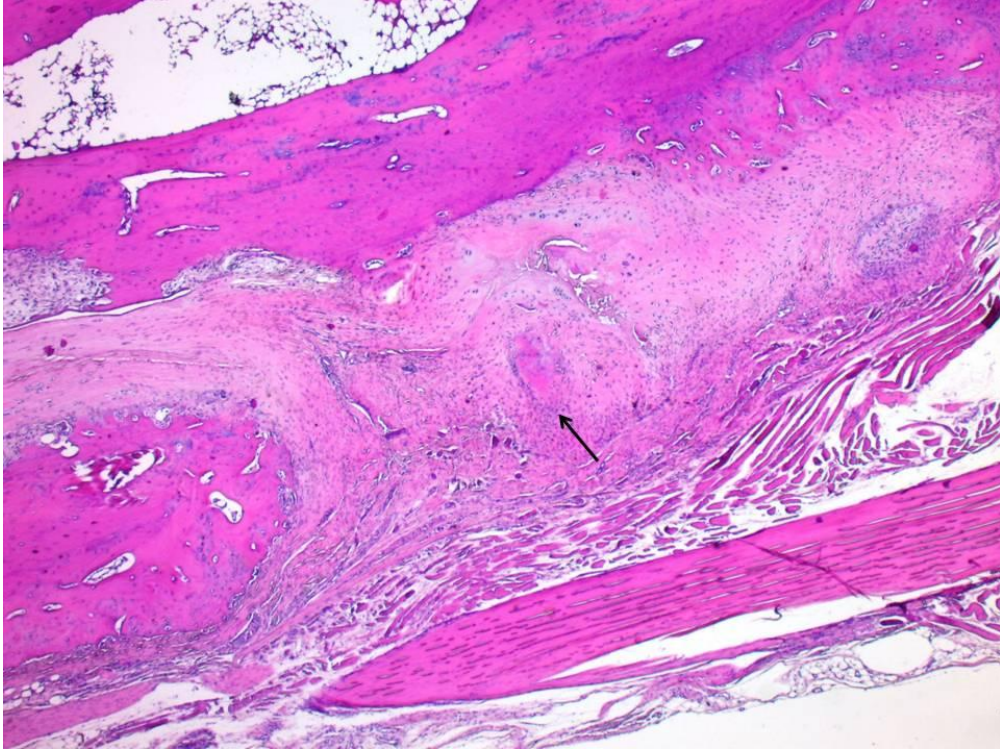


A) Defekt bölgesi kartilajinöz doku ile dolarak çevresinde yeni kemik oluşumları (ok) gelişmiştir,

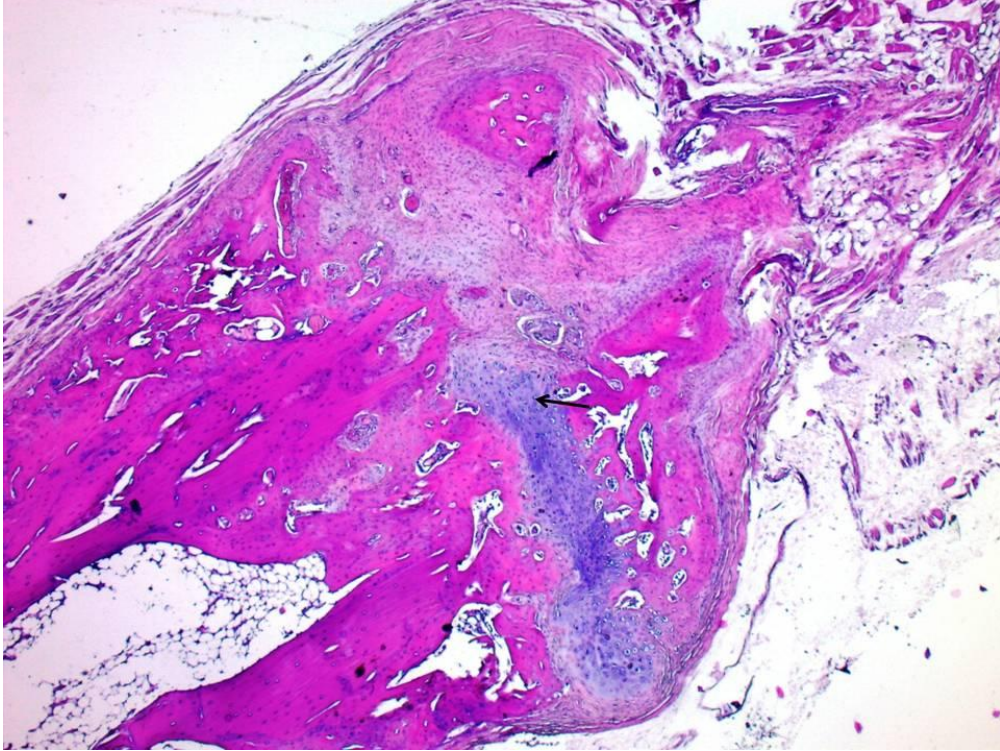


B) Korteks oluşumu (ok) görülmektedir.

Şekil 35: TZP Grubuna Ait Örnekler.



Şekil 36: TZP+DKM Grubuna Ait Örnekte Defekt Bölgesi Fibrokartilajinöz Doku (ok) ile Dolmuştur, Korteks Oluşumu Yoktur.



Şekil 37: DKM Grubuna Ait Örneklerde Defekt Bölgesi Kartilajinöz Doku (ok) ile Dolmuş, Çevresinde Minimal Yeni Kemik Oluşumu Gelişmiştir, Korteks Oluşumu Yoktur.

5. TARTIŞMA

Ortopedi ve travmatoloji pratiğinde segmenter kemik defektleri halen en büyük sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde bu soruna yönelikhalen evrensel olarak kabul görmüş bir tedavi standardı da bulunmamaktadır. Bu duruma yönelik olarak uygulanan günceltedaviler hem morbidite hemde maliyet/yarar oranı bakımından tartışmaya açıktır ve yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulduğu aşıkardır. Bizde bu çalışmamızda segmenter kemik defekti tedavisinde yeni bir yaklaşım olduğunu düşündüğümüz TZP'nın segmenter kemik defekti iyileşmesi üzerine olan etkilerini inceledik.

Tez çalışmamızın sonucunda radyolojik ve histopatolojik olarak segmenter kemik defektinin iyileştirilmesinde kontrol grubuna göre TZP'nın DKM kadar etkili olduğu fakat birlikte kullanımında aynı etkinin gözlemlenemediği görülmüştür.

Kemik dokusu ile ilgilenen araştırmacılar uzun yıllardır kırık iyileşmesini hızlandıracak, defektif kemik dokusunun hızlıca kendiliğinden kapanmasını sağlayacak veya daha büyük defektlerde rekonstrüksiyon için kullanılmak üzere kemik grefti veya greft yerine kullanılabilecek ve daha hızlı ve daha az komplikasyon ile kaynamaya ve defektin dolmasına yardımcı olacak yöntemler üzerinde çalışmaktadırlar. Bu çalışmalar ile başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen bu yöntemlerin hala pratikte klinik kullanımları yaygın değildir.

Kemik metabolizmasının bazı kimyasal ve metabolik etkenler yoluyla düzenlendiği ve kırık kaynaması sürecinde trombosit, makrofaj ve fibroblastlardan bazı peptidlerin (büyüme faktörleri) salgılandığı belirlenmiştir. Bu proteinlerin de kırık iyileşmesi sırasında meydana gelen proliferasyon, diferansiasyon, migrasyon ve rezorbsiyon gibi hassas dengeleri yönettiği bilinmektedir. Son yıllarda gelişen rekombinant teknoloji ile birlikte bu büyüme faktörlerinin üretimi ve bunlar üzerine yapılan çalışmalarda artmıştır. Bu çalışmalarda en çok TGF (Transforming Growth Faktör) ailesinden olan BMP'ler (KMP-Kemik Morfojenik Protein) üzerine yoğunlaşmış olmakla birlikte TGF- β , PDGF, VEGF, FGF ve IGF kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Bunların deneysel olarak kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkileri gösterilmiş fakat henüz rutin klinik kullanıma girmemiştir ki bunda da en büyük sebeplerden biri rekombinant teknolojinin oldukça pahalı olmasıdır (6-8).

Dolaşımdaki trombositlerin granüllerinde PDGF, VEGF, TGF β 1 - 2, FGF gibi birçok büyüme faktörü depolanmış olup çeşitli uyarılar vasıtasıyla bunlar salınıp aktive olmaktadır. Elimizdeki bu bilgilerin ışığında rekombinant teknoloji ile üretilmesi oldukça

maliyetli olan ve bu yüzden klinik kullanıma girememiş olan büyüme faktörlerinin kişinin kendi venöz kanından alınıp santrifüj edilerek ayrıştırılması ve kullanılması ile maliyetin düşürülmesi amaçlanmıştır. Venöz kandan santrifüj yöntemi ile elde edilen ve fibrinojende içeren az miktarda plazma içerisinde süspansiyon halindeki trombositler zenginleştirilmiş plazma ile birçok büyüme faktörünü lokal olarak kırık bölgesine uygulanması ve bu sayede birçok büyüme faktörünün aynı anda etki göstermesi hedeflenmiştir. Teorik olarak birçok büyüme faktörü içeren TZP Smart PReP (Harvest Technologies, Norwell MA), Plasma Seal (Plasma Seal, San Francisco, CA), Platelet Concentrator (Implant Innovations, Inc. 3i, West Palm Beach, FL) gibi birçok firmanın ürettiği ticari cihazlar vasıtasıyla üretilmesi de kolaylaşmıştır. Bu hızlı gelişme, beklentilerin yüksek olması, otolog üretilmesi ve dolayısıyla otolog olmayan ürünlerden meydana gelebilecek komplikasyonların yaşanmaması ve uygulama kolaylığı nedeniyle klinik uygulamalara girmesi kolay olmuştur.

Yeterli deneysel çalışma yapılmadan önce TZP' nin klinik kullanıma girmesi ve genelde kontrol gruplarının olmaması veya yetersiz olması nedeniyle TZP ile ilgili deneysel çalışmalara ihtiyacı söz konusudur. Yapılan sınırlı çalışmalarda Marx tek başına otolog kemik grefti ve otolog kemik grefti + TZP uygulamasını karşılaştırmış ve kombine kullanımda kemik dansitesinde ve biçimlenmesinde hız ve kalite olarak daha çok artış saptamış ve bunu PDGF ve TGF- β ya bağlamıştır (88,109,119,128). Anitua diş çekimi sonrası oluşan boşluğa TZP enjekte etmiş hem epitelizeasyonda hem de kemik dansitesinde artış gördüğünü raporlamıştır. Aghaloo ve Butterfield gibi araştırmacılar kemik greftleri ile TZP kullanımını çalışmışlar fakat TZP' nin üstünlüğünü gösterememişlerdir (129,132), fakat diş hekimliğinde osteointegrasyon için kullanılan greftler ile beraber kullanıldığında kemik doku ilerlemesini hızlandırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur ve maksiller artroplastide kemik greftleri ile birlikte kullanıldığında başarılı sonuçlar gösterilmiştir. Başka çalışmalarda lomber spinal füzyon yapılan hastalarda otogreft ve hidroksiapatit ile birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçların yanında başarısız sonuçlarda bildirilmiştir (76, 135). Aspenberg ve Siebrecht yaptıkları çalışmalarda TZP' nin poroz hidroksiapatit içinde kemik ilerlemesi ve kemikleşmeyi arttırdığını göstermişler sonrasında da sıçan aşıl tendonlarında TZP uygulanan tendonun kopma kuvvetinde ve kallusunda artış göstermişlerdir (180). Trombositler Zengin Plazmanın ligamanlar üzerindeki olumlu etkilerinin gösterilmesi üzerine artroskopik cerrahide de kullanımı önerilmiştir (136).

Markopoulou C. E ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada agresif periodontiti olan hastalara cerrahi sonrası TZP enjeksiyonu yapılmış ve TZP uygulanan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre çoğalmasının olduğu gösterilmiştir (181). Nagata ve arkadaşlarının tavşanlarda calvariumda yaptıkları kritik boyutta kemik defekti sonrasında otogreft ile otogreft-TZP kombinasyonlarını karşılaştırmışlar ve dördüncü haftada otogreft-TZP uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde kemikleşme görülmüş fakat on ikinci haftada sonuçların birbirine yakın olduğunu göstermişlerdir (182). Cheng ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TZP, otogreft ve TZP- kemik iliği kaynaklı stromal hücre karışımının kritik boyuttaki tavşan kalvarial defektinde sonuçlarını incelemişler ve tek başına TZP grubunda tamirin en alt seviyede olmasına rağmen kemik iliği stromal hücre – TZP karışımında anlamlı derecede yeni kemik oluştuğunu göstermişlerdir (183). Gumieiro ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da ışınlanmış rat tibiaları üzerinde yapılan monokortikal defekte TZP ve kontrol grubunu çalışmışlar ve kemikleşmede istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde etmişlerdir (183).

Ranly M.D ve arkadaşlarının immünitesi baskılanmış ratlarda yaptıkları bir çalışmada ratların baldır kaslarının içine DKM ve farklı dozlarda TZP ile hazırlanmış implantları yerleştirmiş ve 14-28 ve 56 günlerde dokuları diseke ederek TZP nin kas içine implante edilmiş DKM nin osteoindüksiyonunda modülatör olup olmadığını değerlendirmişler, osteoindüksiyon, kırık ve yeni kemik oluşumuna bakmışlar. Yaptıkları çalışmada 14. Gündeki incelemelerinde TZP dozu arttıkça oluşan kırık miktarının azaldığını göstermişler, ayrıca 28 ve 56. Günlerdeki yaptıkları diseksionlarda da TZP ‘nin doz bağımlı olarak yeni kemik oluşumu ve greftin emilimini geciktirdiği gösterilmişler. Bizim çalışmamızda da TZP ve DKM’nin ayrı ayrı kırık iyileşmesinde etkil olduğu fakat birlikte kullanılmasının izole kullanıma göre ek bir katkısının olmadığını gördük. Bu çalışmada kas dokusu içinde yeni kemik oluşumu incelenmiş olup kırık hattında yeni kemik oluşumu ve iyileşmeye bakılmamıştır ve TZP kullanılan her modelde farklılık göstermektedir ve kırık hattına uygulanacak eksojen TZP diğer osteojenik proteinler ile birlikte kırık iyileşmesini hızlandırabilir. Bu çalışmada uygulanan TZP yumuşak doku içinde osteoindüksiyonun erken inflamatuvar fazında implantlardan salınmış olup kırık bölgesinde ise uygulanan TZP ile osteoblastlar parakrin bir faktörmüş gibi TZP üretmeye devam ederler. Çalışmamızda teknik sebeplerden dolayı TZP doz ayarlanmasına gidilmemiş olup hazırladığımız TZP’ ler defekt içerisine uygulanmış ve segmenter defekt iyileşmesine verilen cevap değerlendirilmiştir (184).

Ranly DM ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada da immünitesi baskılanmış farelerin gastrokinemius kasları içine insanlardan elde edilmiş TZP ile iki farklı DKM örneği implante edilerek osteoindüksiyon ve yeni kemik oluşumu açısından incelenmiştir. Ellialtıncı günün sonunda denekler sakrifiye edilerek histopatolojik inceleme yapılmış ve TZP'nin kas doku içinde osteoindüksiyon ve yeni kemik oluşumu için DKM'yi indüklediği hatta bir miktar inhibe ettiği gösterilmiştir. Bizim tez çalışmamızda da buna benzer sonuçlar alınmış ve TZP ve DKM'nin ayrı ayrı kullanıldığında kırık iyileşmesinde etkili olduğu fakat kombine kullanımında ek fayda görülmediğini gördük. Bu çalışmada bir gruba kas içine sadece TZP verilmiş ve osteoindüksiyon ve yeni kemik oluşuna bakılmış fakat deney sonunda bu grupta osteoindüksiyon ve yeni kemik oluşu gözlemlenmemiştir. Literatüre bakıldığında TZP'nin osteoindüktif bir ajan değil içerdiği büyüme faktörleri ile osteoindüksiyon yaptığını ve ektopik alanlarda osteoindüksiyona neden olmadığını görmekteyiz ve bu da bize tek başına TZP verilen grupta kas içinde yeni kemik oluşumu görülmemesini açıklamaktadır. Bu çalışmada kas içine DKM ile kombine verilerek yeni kemik oluşumu incelenmiş olup tez çalışmamızda TZP'yi kemik doku içine uygulayıp yeterli progenitor maddeler varlığında TZP'nin segmenter defekt iyileşmesinde etkili otolog bir ajan olduğunu söyleyebiliriz (185).

Han ve arkadaşlarının atimik ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada da gastrokinemius kasları içine demineralize kemik matriksini trombin ile aktive edilmiş ve edilmemiş iki farklı trombosit zengin plazma ile kombine etmiş ve daha sonra ondört, yirmisekiz ve elliatıncı günlerde yaptıkları diseksionları invitro olarak değerlendirmişlerdir. TZP ve DKM kombinasyonunun ondördüncü günde kondrojeniz üzerinde tek başına DKM' nin etkisine göre önemli bir değişiklik görememişler fakat yirmisekiz ve ellialtıncı günlerde ise osteogenez indüklediğini ve daha fazla kemik adacığı ve yeni kemik oluşumu olduğunu göstermişler. Bununla beraber trombin ile aktive edilen TZP'nin DKM üzerinde inhibitör etkili olduğunu ve kondrojeniz ve osteogenezini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise TZP hazırlandıktan sonra sitratlı tüpler içinde muhafaza edilerek sitrat ile aktive edilmiştir. Han ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yine kas dokusu içine DKM ile TZP kombinasyonu uygulanarak yapılmış ve bağ dokuda ektopik kemik dokusu gelişimi yönünden incelenmiş olup TZP'nin her dokuda verdiği cevap farklı olmakta ve çalışmamızda kemik doku içinde TZP'nin tek başına ve DKM ile kombine kullanılarak kırık iyileşmesi üzerine verdiği cevap araştırılmıştır (186).

Tez çalışmamızın zayıf yönlerinden biri TZP ve DKM' nin dozlarının standartizasyonu teknik nedenler ile yapılamamış olması ve standart doz kullanılamamasıdır. Tez çalışmamızda başlangıç ve sonuç olarak iki dönem ele alınmış ve ara dönemler incelenememiştir. Ayrıca kırık iyileşmesinin değerlendirilmesinde altın standart çalışma olarak kabul edilen biyomekanik çalışmalar ratlarda yapılması uygun olmadığı için yapılamamıştır. Tez çalışmamızda her ratdan intrakardiyak kan alıp ondan otolog TZP hazırlamamız mümkün olamayacağı için çalışma başlangıcında dört adet ratdan intrakardiyak alınan kandan TZP hazırlanmış ve dolayısıyla allojenik TZP kullanılmıştır. Literatüre bakıldığında da ratlarda bilinen kan grupları olmamasına rağmen farklı subgruplar vardır fakat bu subgrupların birbirlerine karşı immünojeniteleri olmaması nedeniyle dikkate alınmamıştır (187-189).

6. SONUÇ

Tez çalışmamızda radyolojik olarak TZP veya DKM'nin kaynama için benzer sonuçlar alınmıştır, her ikisinin kombine kullanılması ile ek fayda görülmemiştir. TZP'nin otolog bir ürün olmasının avantajları olan enfeksiyon geçiş riski olmaması, alerjik reaksiyonlara neden olmaması, ameliyathane şartlarında hazırlanabilmesi ve ayrıca ekstra bir masrafı olmaması ile ticari bir ürün olan DKM 'ye üstünlükleri olarak sayılabilir.

Çalışmamız sadece bir hayvan deneyi olup literatürü taradığımızda TZP ve DKM kombinasyonu kullanılarak kemik doku üzerinde yapılmış ilk çalışmadır. Kas-tendon yaralanmalarında günlük hayatta kullanılmakta olan TZP'nin segmenter kemik defekti iyileşmesini hızlandırmak için de kullanılabileceği yönünde benzer çalışmalara yol gösterici olabilir.

Gelecek: Çalışmamızda TZP' nın da segmenter kırık defekti tedavisinde DKM kadar etkili olduğu gösterilmiş olup gelecekte invivo testler ve biyomekanik çalışmalar ile de benzer sonuçların bulunması durumunda TZP'nin segmenter kemik defektlerinin iyileşmesi için klinik kullanıma girmesi düşünülebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Ege R. Kırıkların Etyopatolojisi. Travmatoloji, 4. Cilt, Kadioğlu Matbaacılık, Ankara, 2-61, 1989
2. Wood G. General principles of fracture treatment. In: Canale (Ed) Campbell's Operative Orthopaedics, Mosby, Philadelphia, 2669-70, 2003
3. Younger EM, Chapman MP. Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma 1989; 3: 192-5
4. Fleming JE Jr, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. Orthop Clin North Am 2000; 31 (3): 357-74
5. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. Clin Orthop (367 Suppl) 1999: 107-17
6. Boden SD: Bioactive factors for the bone tissue engineering. Clin Orthop. 367: 84-94, 1999
7. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM: Bone growth factors. Orthop Clin North Am. 31: 375-388, 2000
8. Mathes SJ: Repair and grafting of bone. In: Plastic surgery. 2nd ed. Saunders Elsevier Inc, Philadelphia, 639-718, 2006
9. Croveti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A: Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. Transfus Apher Sci 30:145-151, 2004
10. Knighton DR, Fiegel VD, Austin LL, Ciresi KF, Butler EL: Classification and treatment of chronic nonhealing wounds: Successful treatment with autologous Platelet-derived wound healing factors(PDWHF). Ann Surg 204(3): 322-330, 1986
11. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Schumerth S, Butler EL, Cerra F: Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. Surg Gynecol Obstet 170: 56-60, 1990
12. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE: The use of autologous platelet-rich plasma (Platelet Gel) and autologous platelet-poor plasma (Fibrin Glue) in cosmetic surgery. Plast Reconstr Surg 107(1): 229-239, 2001

13. Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA: Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 24: 483- 488, 2001
14. Mazzucco L, Medici D, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, Libener R, Cattana E, Levis A, Beta PG, Borzini P: The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion* 44: 1013-1018, 2004
15. Valbonesi M, Giannini G, Migliori F, Dalla Costa R, Gali A: The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: A preliminary report. *Int J Artif Organs* 25: 334-338, 2002
16. Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter 8, page: 144-146, 2003
17. Junqueira Carlos L, Carneiro J, Kelley O. Bone In: *Basic Histology*. Appleton and Lange, New Jersey, 132-151, 1995
18. Schenk RK. Biology of fracture. In: Browner B, Jupiter J, Levine A, Trafton P (Eds) *Skeletal Trauma*. Saunders, Philadelphia, Vol 1: 29-74, 2003
19. Bancroft JD, Stevens A: *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th ed. Churchill Livingstone, New York, Chapter 15, page 309-339, 1996
20. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: *Robbin's pathologic basis of disease*. 6th ed. WB Saunders Co, London, 1999
21. Kierszenbaum A.L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*, 1st ed. Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 131, 2002
22. Gartner LP, James LH: *Color Atlas of Histology*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Chapter 4, page 73, 2000
23. Brinker MR. Bone. In: *Fundamentals of Orthopaedics*, Saunders, Philadelphia, 1-7, 1999
24. Brond AR, Rubin TC: *Fracture Healing. Surgery of the Musculoskeletal System*. 2nd ed. Churchill Livingstone, New York, page 93-114, 1990.

25. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res 1986; 205: 299-308. Cruess RL. Healing of bone,tendon and ligament : Fractures. 2nd ed. Lippincott Co, Philadelphia, page 147-167, 1984
26. Chin KR, Nagarkatti DG, Miranda MA, Santoro VM, Baumgaertner MR, Jupiter JB. Salvage of distal tibia metaphyseal nonunions with the 90 degrees cannulated blade plate. Clin Orthop Relat Res. 2003;409:241–249
27. Fattah HA, Halaa EE, Shary THA. Nonunion of the humeral shaft: a report on 25 cases. Injury. 1982;14: 225–262
28. Wang J, Wenig L. Treatment of distal femoral nonunion with internal fixation, cortical allograft struts, and autogenous bone grafting. J Bone Joint Surg Am. 2003; 85:436–440)
29. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Clin Orthop Relat Res. 2002;395:4–10
30. Kruyt MC. Dhert WJ. Yuan H. Wilson CE. van Blitterswijk CA. Verbout AJ. de Bruijn JD. Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. J Orthop Res. 2004;22: 544–451
31. Miller MD. Bone. In: Miller M (Ed) Review of Orthopaedics. Saunders, Philadelphia. 2004
32. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament : Fractures. 2nd ed. Lippincott Co, Philadelphia, page 147-167, 1984
33. Gartner Leslie P, Hiatt James L. Color Textbook of Histology. 114-130;1997
34. Buckwalter AJ. Bone and Joint Healing. In: Bucholz R, Heckman J, Court- Brown C (Eds) Rockwood and Green's Fractures in Adults, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Vol 1: 297-307, 2006
35. Miller Mark D. Review of Orthopaedics. 2nd edition. 1996: 1-22
36. Gartner Leslie P, Hiatt James L. Cartilage and bone. Color Textbook of Histology. Saunders, Saint Louis, 114–130, 1997; Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament In: Fractures. Philadelphia, Lippincott Company, 1:147–167, 1984
37. Tachdjian OM. Fractures and Dislocations. In: Pediatric Orthopedics. Saunders, Philadelphia, Vol 2: 1532-44, 1972

38. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN: Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. J Bone Joint Surg Am 2001, 83-A(Suppl 2, Pt 2):98-103
39. Szpalski M, Gunzburg R: Applications of calcium phosphatebased cancellous bone void fillers in trauma surgery. Orthopedics 2002, 25(5 Suppl):601-9
40. Moore WR, Graves SE, Bain GI: Synthetic bone graft substitutes. ANZ J Surg 2001, 71(6):354-61
41. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop 2000, 371:10-27
42. Şimşek A, Çakmak G, Cila E, Kemik Graftleri ve Kemik Graftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler, TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi, 2004, Cilt: 3 Sayı: 3-4
43. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am 2002;84:454–64
44. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA: Complications of iliac crest bone graft harvesting. Clin Orthop 1996, 329:300-9
45. Ulukan İnan, Erol Göktürk, Allogreftler; TOTBİD Dergisi 2011;10(2):168-173
46. Tomin E, Beksaç B Lane J.M; Amerika Birleşik Devletlerinde Ortopedik Girişimlerde Otogreftlerin Yerine Kullanılan Materyallere Toplu Bakış; Journal Of Arthroplasty & Arthroscopic Surgery; Vol. 13, No. 2, (114-129), 2002
47. Öztürk A, H. Yetkin, L. Memis, E. Cila, S. Bolukbasi. C. Gemalmaz Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats, International Orthopaedics (SICOT) (2006) 30: 147–152
48. Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. J Bone Joint Surg [Br] 2007;89:574-9
49. Suarez LS, Richmond JC. Overview of procurement, processing, and sterilization of soft tissue allografts for sports medicine. Sports Med Arthrosc 2007;15:106-13
50. Gardiner A, Weitzel PP. Bone graft substitutes in sports medicine. Sports Med Arthrosc 2007;15:158-66

51. Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone graft materials and synthetic substitutes. *Radiol Clin North Am* 2006;44:451-61
52. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM: The bone induction principle. *Clin Orthop* 1967, 53:243-83. 21
53. Urist MR, Dawson E: Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogenic (AAA) bone. *Clin Orthop* 1981, 154:97-113.
54. Bostrom MP, Yang X, Kennan M, Sandhu H, Dicarlo E, Lane JM: An unexpected outcome during testing of commercially available demineralized bone graft materials: how safe are the nonallograft components? *Spine* 2001, 26(13): 1425-8
55. Wang JC, Kanim LE, Nagakawa IS, Yamane BH, Vinters HV, Dawson EG: Dose-dependent toxicity of a commercially available demineralized bone matrix material. *Spine* 2001, 26(13): 1429-35
56. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF: The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics* 1995,18(12): 1153-8
57. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA: Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. Treatment with implants of a composite of human bone morphogenetic protein (BMP) and autolyzed, antigenextracted, allogenic (AAA) bone. *Clin Orthop* 1992,277:229-37
58. Prewett AB; Moyer MP,O'Leary RK, Mellonig JT,Decalcification inactivates HIV in spiked and infected bone *Trans Orthop Res Soc.* 1992;17;436
59. Chiroff R, Weber J, White E: Tissue ingrowth of replamineform implants. *J Biomed Mater Res* 1975, 6:29
60. Werntz JR, Lane JM, Piez C: The repair of segmental bone defects with collagen and marrow. *Orthop Trans* 1986, 10:262
61. Zerwekh JE, Kourosch S, Scheinberg R, Kitano T, et al: Fibrillar collagen-biphasic calcium phosphate composite as a bone graft substitute for spinal fusion. *J Orthop Res* 1992, 10(4):562-72
62. Muschler GF, Nitto H, Boehm Ca, et al: Evaluation of collagen ceramic composite graft materials in a spinal fusion model. *Clin Orthop* 1996, 328:250-60

63. Boden SD, Kang J, Sandhu H, et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002;27:2662–73
64. Boden SD, Martin GJ Jr, Morone MA, et al. Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine* 1999;24:1179–85
65. Johnsson R, Stromqvist B, Aspenberg P. Randomized radiostereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002;27:2654–61
66. Suh DY, Boden SD, Louis-Ugbo J et al. Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate. *Spine*. 2002; 27:353–60
67. Jui-Sheng Sun, Pei-Yu Chen, Yang-Hwei Tsuang, Ming-Hong Chen, Po-Quang Chen; Vitamin-D Binding Protein Does Not Enhance Healing in Rat Bone Defects; *Clin Orthop Relat Res* (2009) 467:3156–3164
68. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am*. 1992;74(5):659-70
69. Johnson EE, Urist MR. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion *Clin Orthop*. 2000;371:61-74
69. Devescovi V, Ciapetti G and Cenni E; Growth factor in bone repair, *Chir Organi Mov* (2008) 92:161–168
70. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R: The use of fibrin glue in skin grafts and tissueengineered skin replacements: A Review. *Plast Reconstr Surg* 108(6): 1713-1726, 2001
71. Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Mentlein R: Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenic peptide Vascular Endothelial Growth Factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg* 123: 485-488, 2003

72. Pierce GF, Mustoe TA, Altmann BW, Deuel TF, Thomason A: Role of Platelet- Derived Growth Factor in wound healing. *J Cell Biochem* 45: 319-326, 1991
73. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T: Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 362-369, 2005
74. Colville-Nash PR, Willoughby DA: Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Mol Med Today* 3:14-23, 1997
75. Carroll C, Carroll SM, Schuschke DA, Barker JH: Augmentation of skeletal muscle flap survival using Platelet Derived Growth Factor. *Plast Reconstr Surg* 102(2): 407- 415, 1998
76. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT: Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 91: 4-15, 2004
77. Becker JC, Beckbauer M, Domschke W, Herbst H, Pohle T: Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointest Endosc* 61(4): 560-566, 2005
78. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE: A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 403-412, 2006
79. Brissett AE, Hom DB: The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11: 245-250, 2003
80. Green DM, Klink B: Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg* 101(4): 1161-1162, 1998
81. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK: Stimulation of granulation tissue formation by Platelet-derived Growth Factor in normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 76: 2323-2329, 1985
82. Hsu C, Alto P, Chang J: Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg* 29A(4): 551-563, 2004
83. Altmppen J, Hansen E, Bonnländer GL, Horch RE, Jeschke MG: Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *J Surg Res* 117: 202-207, 2004

84. Ksander GA, Sawamura SJ, Ogawa Y, Sundsmo J, McPherson JM: The effect of platelet releasate on wound healing in animal models. *J Am Acad Dermatol* 22(5): 781-791, 1990
85. Betz RR: Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics* 2002, 25(5 Suppl):s561-70
86. Parikh SN: Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* 2002,48(2):142-8
87. Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG, Patel T, et al: North American Spine Society for Contemporary Concepts in Spine Care. Bone grafting alternatives in spinal surgery. *Spine J* 2002, 2(3):206-15
88. Gosain AK, Lyon VB: The current status of tissue glues: Part II. For adhesion of soft tissues. *Plast Reconstr Surg* 110(6): 1581-1584, 2002
89. Matras H: Fibrin seal: the state of the art. *J Oral Maxillofac Surg* 43:605-611,1985
90. Buckley RC, Breazeale EE, Edmond JA, Brzezienski: A simple preparation of autologous fibrin glue for skin-graft fixation. *Plast Reconstr Surg* 103(1): 202-206, 1999
91. Kulber AD, Bacilious N, Peters E, Gayle LB, Hoffman L: The use of fibrin sealant in the prevention of seromas. *last Reconstr Surg* 99(3): 842-851, 1997
92. Becker JC, Domschke W, Pohle T: Biological in vitro effects of fibrin glue: fibroblast proliferation, expression and binding of growth factors. *Scand J Gastroenterol* 10: 927-932, 2004
93. Fezza JP, Cartwright M, Mack W, Flaharty P: The use of aerosolized fibrin glue in face-lift surgery. *Plast Reconstr Surg* 110(2): 658-664, 2002
94. Giannini G, Mauro V, Agostino T, Gianfranco B: Use of autologous fibrin-platelet glue and bone fragments in maxillofacial surgery. *Transfus Apher Sci* 30: 139-144, 2004
95. Gibble J, Ness P. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 1990;30:741-7
96. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor?: a current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:93-103
97. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-9.

98. Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A: Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials*. 23: 3023-3031, 2001
99. Greco F, de Palma L, Specchia N, Lisai P: Experimental investigation into reparative osteogenesis with fibrin adhesive. *Arch Orthop Trauma Surg*. 107: 99-104, 1988
100. Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP: Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg*. 105: 953-963, 2000
101. Nakamura K, Koshino T, Saito T: Osteogenic response of the rabbit femur to a hydroxyapatite thermal decomposition product-fibrin glue mixture. *Biomaterials*. 19: 1901-7, 1998
102. Schwarz N, Redl H, Schlag G, Schiesser A, Lintner F, Dinges HP, Thurnher M: The influence of fibrin sealant on demineralized bone matrix-dependent osteoinduction. A quantitative and qualitative study in rats. *Clin Orthop Relat Res*. 238: 282-7, 1989
103. Schwarz N, Redl H, Zeng L, Schlag G, Dinges HP, Eschberger J: Early osteoinduction in rats is not altered by fibrin sealant. *Clin Orthop Relat Res*. 293: 353-359, 1993
104. Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules constituents, secretion and functions. *Platelets* 12(5): 261-273, 2001
105. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J: Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood* 96(10): 3334-3342, 2000
106. Martinez-Gonzales, J.M., Sanchez, J.C., La Fuente, J.C.G., Trapero, J.C., Gomez, G.C.E., Leston, J.M.S.: Do Ambulatory-Use Platelet-Rich Plasma (Prp) concentrates present risks? *Medicina Oral*. 7, 375-90. 2002
107. Aichelmann-Reidy, M.E., Yukna, R.A.: Bone Replacement Grafts (Bone Substitutes), *Advances In Periodontics, Part II. Dental Clinics Of North America*, 42(3), 491-503. 1998
108. Gruber, R., Karreth, F., Frommlet, F., Fischer, M.B., Watzek, G.: Platelets Are Mitogenic For Periosteum-Derived Cells. *J Orthop Res.*, 21(5), 941-8. 2003
109. Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., Georgeff, K.R.: Platelet-Rich Plasma: Growth Factor Enhancement For Bone Grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 85, 638-46. 1998

110. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19(Suppl):4-6.
111. Manolagas, Sc.: Birth And Death Of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms And Implications For The Pathogenesis And Treatment Of Osteoporosis. *Endocr Rev.* 21(2), 115-37. 2000
112. Lynch, S.E. Nixon, J.C., Colvin, R.B., Antoniades, H.N.: Role Of Platelet Derived Growth Factor In Wound Healing: Synergistic Effects With Other Growth Factors. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 84; 7696-7700 1987
113. Stiles, C.D. Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Dyke, J.J., Pledger, W.J. Dual Control Of Cell Growth By Somatomedins And Platelet Derived Growth Factor. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 76(3), 1279-1283. 1979
114. POSITION PAPER: The Potential Role of Growth and Differentiation Factors in Periodontal Regeneration. *J. Periodontol.*, 67, 545-553. 1996
115. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol.* 2004;36: 28–35.
116. Graziani F, Cei S, Ducci F, Giuca MR, Donos N, Gabriele M. In vitro effects of different concentration of PRP on primary bone and gingival cell lines. Preliminary results. *Minerva Stomatol.* 2005;54(1-2):15-22
117. Gandhi A, Doumas C, O'Connor JP, et al. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone.* 2006;38:540–546
118. Tsay, R.C. Vo, J., Burke, A., Eising, S.B., Lu, H.H., Landesberg, R.: Differential Growth Factor Retention By Platelet-Rich Plasma Composites. *J Oral Maxillofac Surg.*, 63(4), 521-8. 2005
119. Weibrich, G, Kleis, W.K.G., Hafner, G., Hitzler, W.E.: Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 30, 97-102. 2002
120. Weibrich, G., Kleis, W.K.G., Hafner, G., Hitzler, W.E., Wagner, W.: Comparison Of Platelet, Leukocyte, And Growth Factor Levels In Point-Of-Care Plateletenriched Plasma. Prepared Using A Modified Curasan Kit, With Preparations Received From A Local Blood Bank. *Clin Oral Impl Res.*, 14, 357-362. 2003

121. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(4):489-96.
122. Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *J Am Acad Orthop Surg.* 2009;17(10):602-8
123. Griffin XL, Smith CM, Costa ML. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury.* 2009;40(2):158-62
124. Ferreira, F.C. Gomez, M.C.C., Filho, J.S., Granjeiro, J.M., Simoes, C.M.O., Magini, R.S.: Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res.*, 16, 456-460. 2005
125. Kocazeybek, B, Arabacı, U, Akdur, H, Sezgiç, M, Erenturk, S.: Prospective evaluation of platelets prepared by single and random methods during 5 days of storage: aspects related to quality and quantity. *Transfus Apher Sci.* 26(1), 29-34. 2002
126. Kassolis, J.D., Rosen, P.S., Reynolds, M.A.: Alveolar Ridge And Sinus Augmentation Utilizing platelet rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: Case series. *J. Periodontol.*, 71, 1654-1661. 2000
127. Raghoobar, G.M., Schortinghuis, J., Liem, R.S.B., Ruben, J.L., Van Der Wal, J.E., Vissink, A.: Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res.*, 16, 349-356. 2005
128. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
129. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 60(10): 1176-1181, 2002
130. Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 17(1): 86-94, 2002
131. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 18(1): 15-22, 2003

132. Freymiller EG, Agbaloo TL: Platelet –Rich Plasma: Ready or not? J Oral Maxillofac Surg 62: 484-488, 2004
133. Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT: Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. Plast Reconstr Surg. 106: 360-71, 2000
134. Thor A, Franke-Stenport V, Johansson CB, Rasmusson L. Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. Int J Oral Maxillofac Surg, 36(12): 1164-1171, 2007
135. Castro FP: Role of activated growth factors in lumbar spinal fusions. J Spinal Disord Tech 17: 380-384, 2004
136. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I: Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. Med Sci Sports Exerc 35:1648-1652, 2003
137. Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Klüter H: Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. Transfusion 39: 144-148,1999
138. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R: Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. Transfusion 41: 1217-1224, 2001
139. Banoth S, Alex JC: Current applications of platelet-gels in facial plastic surgery. Facial Plast Surg 18:27-32, 2002
140. Peng L, Malloy PJ, Wang J, et al. Growth inhibitory concentrations of androgens up-regulate insulin-like growth factor binding protein-3 expression via an androgen response element in LNCaP human prostate cancer cells. Endocrinology. 2006;147:4599–4607
141. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, et al. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. J Hand Surg [Am]. 2002;27:615–620
142. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. Am J Sports Med. 2006;34: 1774–1778
143. Barrett S, Erredge S: Growth factors for chronic plantar fasciitis. Podiatry Today 2004;17:37-42

144. Sánchez M, Anitua E, Andía I: Poster presentation: Application of autologous growth factors on skeletal muscle healing. Regmed 2005
145. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I: Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007;35: 245-251
146. Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N: Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair: A pilot study. *Disabil Rehabil* 2008;30: 1584-1589
147. Everts PA, Devilee RJ, Brown Mahoney C, et al: Exogenous application of platelet-leukocyte gel during open subacromial decompression contributes to improved patient outcome: A prospective randomized double-blind study. *Eur Surg Res* 2008;40:203-210
148. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, et al: Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35: 1648-1652
149. Roach HI, Shearer JR, Archer C: The choice of an experimental model. A guide for research workers. *J Bone Joint Surg Br* 1989;71(4):549-53
150. Lane JM, Sandhu HS, Current approaches to experimental bone grefting. *Orthop Clin North Am.* 1987;18(2):213-25
151. Nunamaker DM, Experimental model of fracture repair. *Clin Orthop.*1998;(335 supp.):s 56-65
152. Jager M, Sager M, Lensing-Hohn S, Krauspe R: The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed Tech (Berl)* 2005, 50(4):107-10
153. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS: Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 2007, 25(1):51-61
154. Dos Santos Neto FL, Volpon JB: Experimental nonunion in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1984, (187):260-71
155. Brownlow HC, Simpson AH: Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J Orthop Res* 2000, 18(3):438-42
156. Kettunen K, Rokkanen P: The repair of a full-thickness articular defect. An experimental study on growing rats. *Ann Chir Gynaecol Fenn* 1973, 62(3):166-8

157. Mendelson S, Wooley P, Lucas D, Markel D: The effect of hyaluronic acid on a rabbit model of full-thickness cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2004, (424):266-71
158. Breinan HA, Hsu HP, Spector M: Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines. *Clin Orthop Relat Res* 2001,(391 Suppl):219-30 32
159. Lu Y, Markel MD, Swain C, Kaplan LD: Development of partial thickness articular cartilage injury in an ovine model. *J Orthop Res* 2006, 24(10):1974-82
160. Milentijevic D, Rubel IF, Liew AS, Helfet DL, Torzilli PA: An in vivo rabbit model for cartilage trauma: a preliminary study of the influence of impact stress magnitude on chondrocyte death and matrix damage. *J Orthop Trauma* 2005, 19(7):466-73
161. Strauch B, de Moura W, Ferder M, Hall C, Sagi A, Greenstein B: The fate of tendon healing after restoration of the integrity of the tendon sheath with autogenous vein grafts *J Hand Surg Am* 1985, 10(6 Pt 1):790-5
162. Bishop AT, Cooney WP 3rd, Wood MB: Treatment of partial flexor tendon lacerations: the effect of tenorrhaphy and early protected mobilization. *J Trauma* 1986, 26(4):301-12
163. Yuehuei H An, Richard Freidman (eds): *Animal models in orthopaedic research*.CRC, Boca Raton, 1999
164. Carpenter JE, Flanagan CL, Thomopoulos S, Yian EH, Soslowsky LJ: The effects of overuse combined with intrinsic or extrinsic alterations in an animal model of rotator cuff tendinosis. *Am J Sports Med* 1998, 26(6):801-7
165. Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE: Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg* 2000, 9(2):79- 84
166. Tatari H, Skiak E, Destan H, Ulukus C, Ozer E, Satoglu S: Effect of hylan G-F 20 in Achilles' tendonitis: an experimental study in rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2004, 85(9):1470-4
167. Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ: Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res* 2002, 20(5):910-9

168. Mader JT: Animal models of osteomyelitis. *Am J Med* 1985, 28;78(6B):213-7
169. Bremell T, Lange S, Yacoub A, Ryden C, Tarkowski A: Experimental staphylococcus aureus arthritis in mice. *Infect Immun* 1991, 59(8):2615-23
170. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD: Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001, 2(1):117-27
171. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecolud TS the effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surgery Am* 1994;76A(6):827-38
172. Farso NF, Karring T, Gogollewski S. Biodegradable guide for bone regeneration. Polyurethane membranes tested in rabbit Radius defects. *Acta Orthop Scand*. 1992;63(1):66-69
173. Nyman R, Magnusson M, Sennerby L, Nyman S, Lundgren D. Membrane guided bone regeneration. Segmental Radius defects studied in rabbit. *Acta Orthop Scand*. 1995;66(2):169-173
174. Reddi AH, Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop* 1998;355S:66-72
175. Solheim E, Pinholt EM, Andersen R, Bang G, Sudman E, The effect of a composite of polyorthoester and demineralized bone healing of large segmental defects of the Radius in rats. *J Bone and Joint Surg Am* 74 A(10):1456-63
176. Wixson SK, Smiler KL. Anesthesia and Analgesia in Rodents. In: Kohn DF, Wixson SK, White WJ, Benson GJ. Anesthesia and analgesia in Laboratory Animals. Academic Press, San Diego 1998;173-184
177. Tiedeman JJ, Lippiello L, Connolly JF, Strates BS. Quantitative roentgenographic densitometry for assessing fracture healing. *Clin Orthop*. 1990; (253):279-86
178. Yoshinobu Watanabe MD, Yu Nishizawa MD, Nobuyuki Takenaka MD, PhD, Makoto Kobayashi MD, Takashi Matsushita MD, Ability and Limitation of Radiographic Assessment of Fracture Healing in Rats, *Clin Orthop Relat Res* (2009) 467:1981–1985
179. Salkeld S.L, Patron L.P, Barrack R.L, Cook S.D, The Effect of Osteogenic Protein-1 on the Healing of Segmental Bone Defects Treated with Autograft or Allograft Bone, *The Journal Of Bone & Joint Surgery .Jbjs.Org* Volume 83-A · Number 6 · June 2001

180. Siebrecht MA, De Rooij PP, Arm DM, Olsson ML, Aspenberg P: Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite. *Orthopedics* 25(2): 169-172, 2002
181. Markopoulou C.E, Markopoulos P, Dereka X.E, Pepelassi E, Vrotsos I.A; Effect of homologous PRP on proliferation of human periodontally affected osteoblasts. In vitro preliminary study. Report of a case; *Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9(3):167-172
182. Nagata MJH, Melo LGN, Messoria MR, Bomfim SRM, Fucini SE, Garcia VG, Bosco AF, Okamoto T. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 775–783
183. Gumieiro E.H, Márcio A, Jahn R.S, Segretto R, Alves M.T, Nannmark U, Gösta G, Dib L.L., Platelet-rich plasma in bone repair of irradiated tibiae of Wistar rats, *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 25 (3) 2010 – 257*
184. Ranly DM, McMillan J, Keller T, et al. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:2052–2064
185. Ranly DM, Lohmann CH, Andreacchio D, et al. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:139–147
186. BoHan, PhD, JenniferWoodell-May, PhD, Michael Ponticiello, MS, Zhi Yang, MD, and Marcel Nimni, PhD, The Effect of Thrombin Activation of Platelet-Rich Plasma on Demineralized Bone Matrix osteoinductivity, *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91:1459-70
187. S. O. Burhoe. Blood groups of the rat (*rattus norvegicus*) and their inheritance, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1947 May; 33(5): 102–109.
188. Moore DM. Hematology of rat (*Rattus norvegicus*). In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams&Wilkins; 2000.p.1210
189. Palm J, Current Status Of Blood Groups In Rats, *Annals Of The New York Academy Of Sciences Volume 97 , Blood Groups In Infrahuman Species*Pages 57–68,May 1962

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ZONGULDAK KARAEMLAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YÖNETİM KURULU KARARLARI



TOPLANTI TARİHİ : 26/05/2011
TOPLANTI NO : 2011/21

KARARLAR :

- 9- Fakültemiz Cerrahi Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı'nın 24.05.2011 tarih ve 461-1294 sayılı yazısı ve ekleri okundu.

Fakültemiz Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Mustafa Kemal AKÇA'nın tez konusunun "Sıçan Segmenter Kemik Defekti Modelinde Trombositter Zenginleştirilmiş Plazmanın Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi" ve tez danışmanının Yrd Doç. Dr. Egemen TURHAN olarak belirlenmesine ve ilgiliye tebliğine,

Oybirliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Metin DEMİRSAN
Fakülte Sekreteri