



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**TROMBOSİTTEN ZENGİN VE FAKİR PLAZMANIN
KRİTİK BOYUTTA KEMİK DEFECTİ
İYİLEŞMESİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kemal FINDIKÇIOĞLU

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Reha YAVUZER**

ANKARA-2006

ÖNSÖZ

Çalışmanın her basamağında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel ve teknik olarak çalışma boyunca hoşgörüsüyle yol gösteren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Reha Yavuzer'e;

Tez çalışmalarım sırasında değerli fikirsel katkı, desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Osman Latifoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Cemalettin Çelebi'ye, Sayın Prof. Dr. Kenan Atabay'a, Sayın Prof. Dr. Seyhan Çenetoğlu'na, Sayın Doç. Dr. Sühan Ayhan'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Selahattin Özmen'e, Sayın Uzm. Dr. Serhan Tuncer'e, tezimin hazırlık aşamasında büyük bir özveriyle yardımcı olan Dr. Fulya Fındıkçioğlu'na ve Dr. Başar Kaya'ya, Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nın olanaklarından faydalanmamı sağlayan GÜ Deney Hayvanları Laboratuvarı ve Cerrahi Komisyonu üyelerine, çalışmamın histolojik değerlendirmesini yapan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Dr. Çiğdem Elmas'a, trombosit zengin plazma ve fibrin yapıştırıcı hazırlanabilmesi için GÜ Kan Bankasının imkanlarını sunan Çocuk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. İdil Yenicesu'ya, radyolojik inceleme konusundaki yardımlarından dolayı Radyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Mehmet Araç ve Dr. Gonca Erbaş'a, istatistiksel incelemelerde katkılarından dolayı Dr. Hakan Tüzün'e, GÜ Tıp Fakültesi Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinde çalışmam boyunca hiçbir konuda yardımını esirgemeyen Sayın Vet. Dr. Şeyda Diker ve özveriyle çalışan tüm teknisyenlere, desteklerini her zaman arayacağım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Uzun cerrahi eğitiminde olduğu gibi, tez çalışmalarım süresince de desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Dr. Kemal FINDIKÇIOĞLU

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ	1
II.	GENEL BİLGİLER	4
	• Kemik Dokusu	4
	• Kemikte gelişim ve büyüme	13
	• Kemik iyileşmesi	16
	• Kemik iyileşmesinde etkili büyüme faktörleri	19
	• Fibrin yapıştırıcı ve klinik uygulamalar	21
	• Trombosit zengin plazma ve klinik uygulamalar	23
	• Tavşan kraniyum anatomisi	34
	• Kritik büyüklükte kemik defekti	35
III.	GEREÇ VE YÖNTEM	37
IV.	BULGULAR	52
V.	TARTIŞMA VE SONUÇ	76
VI.	ÖZET	87
VII.	İNGİLİZCE ÖZET	88
VIII.	KAYNAKLAR	89

GİRİŞ

Kemik iyileşmesi, birçok tıp dalını yakından ilgilendirmesi nedeniyle, literatürde yer alan en fazla çalışma yapılmış konulardan biridir. Kemik iyileşmesinde temel amaç, kendiliğinden ve hızlı bir şekilde iyileşmeyi sağlamaktır. Uygun büyüklükte kemik defektlerinde bunu sağlamak mümkün olsa da; farklı vücut bölgelerinde, belli büyüklüğün üzerindeki kemik defektleri kendiliğinden iyileşememekte ve cerrahiye ihtiyaç göstermektedir.^{7,29,31} Bu tür defektler için altın, gümüş gibi metaller, ksenogreftler, allogreftler ve otogreftler uzun yıllardır kullanılmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle alloplastik materyaller de bu tür defektlerde sıkça kullanılır hale gelmiştir. Ancak bu tür seçeneklerin rezorbsiyon, enfeksiyon, doku reaksiyonu ve donör alan morbiditesi gibi dezavantajları vardır.

Bu yan etkilerden kurtulabilmek, büyük kemik defektlerinin de kendiliğinden iyileşmesini sağlamak ya da yerleştirilen kemik greftlerinin bölgeye entegrasyonunu hızlandırmak amacı ile büyüme hormonlarının kemik iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Rekombinant teknoloji ile elde edilen bu hormonların osteoindüktif etkisi ispatlanmış, ancak teknolojinin pahalı olması nedeniyle kullanımı kliniğe yeterince yansımamıştır.^{14,51,66}

Trombosit zengin plazma (TZP) vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), 'transforming' büyüme faktörü α ve β (TGF α ve β), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) vb büyüme faktörlerini içeren ve kanın farklı iki frekansta sanrifüj edilmesiyle oluşan bir maddedir. Elde edilen plazmadaki trombosit miktarı normal

plazmadakinin 3-5 katıdır. Bu ürüne trombin ilavesiyle trombositlerin α -granüllerinden çok sayıda mediatör salınır. Bunların hemen hepsi kemik iyileşmesinde görev alan mediatörlerdir. Trombosit jel, platelet jel gibi farklı isimler de verilen TZP, teorik olarak, yukarıdaki faktörleri içerdiği göz önüne alındığında önemli bir üründür. Bunun yanında otolog olarak üretilebiliyor olması son on yılda özellikle kemik iyileşmesinde klinik kullanım alanı bulmasına sebep olmuştur. Yapılan klinik çalışmalarda yara ve kemik iyileşmesini hızlandırdığı; şişliği, ağrıyı, enfeksiyonu ve skarı azalttığı, kanama kontrolü sağladığı iddia edilmektedir.^{26,53,54,62,63,68,98}

Otolog üretilebiliyor olması ve rekombinant teknolojiye göre daha ucuz bir yöntemle elde edilmesi nedeniyle yeterli hayvan deneyi yapılmadan klinikte kullanıma giren trombosit zengin plazma, teorik olarak çok şey vaat etmesine rağmen; yeterli kontrollü çalışma olmaması nedeniyle hala sonuçlar konusunda şüphe uyandırmaktadır. Literatürde konuyla ilgili deneysel çalışmaların eksikliği dikkati çekmektedir.

Trombosit fakir plazma, daha sık kullanılan adıyla fibrin yapıştırıcı (FY) ise TZP'den daha önce kullanıma girmiştir. Trombosit ve diğer kan hücrelerinden mümkün olduğunca arındırılmış plazmaya trombin ilave edilerek, fibrinojenin fibrine dönüşümü aktive edilir. Klinikte daha çok doku yapıştırıcı özelliğinden yararlanılır. Yük taşımayan kemiklerde kemik fiksasyonu için, kansellöz kemik greftleri ya da çeşitli kemik benzeri maddelere şekil verip, alıcı sahada tutunmasına yardımcı olmak amacıyla sıkça kullanılır. Ayrıca kemik iyileşmesinde etkili bazı büyüme faktörlerinin uygulanmasında taşıyıcı olarakta kullanılmıştır. Klinik kullanımı yaygın olmasına rağmen FY'nin osteoindüktif etkisi olup olmadığı net olarak ortaya konulamamıştır. Kemik iyileşmeyi hızlandırdığı, etkisi olmadığı hata yavaşlattığına dair yayınlar vardır.^{1,38,46,72,86,87}

Bu çalışmasının amacı, birbirine trombosit konsantrasyonları dışında benzer olan FY ve TZP'nin kemik iyileşmesine etkilerinin radyolojik ve histolojik olarak tavşan kraniyal kemik defekti modelinde saptanması ve karşılaştırılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

KEMİK DOKUSU

Kemik, embriyolojik olarak mezenşimal hücrelerden encondral ya da membranöz kemikleşme yolu ile farklılaşan bir dokudur. Kemikler iskelet sistemini oluşturup kaslarla birlikte hareketi sağlar, vücudu destekler, hayati bazı organları çevreleyip korur, kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içerir ve metabolik önemi olan kalsiyum deposu olarak görev alırlar. Kemik; bir çatı içerisinde bütünleşmiş birçok hücreden oluşan, metabolik ve biyolojik yönden dinamik bir dokudur. Bu özelliği dikkate alındığında, büyüme ve iyileşmesi çok sayıda biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik olayın zincirleme reaksiyonu gibi düşünülebilir.^{9,47}

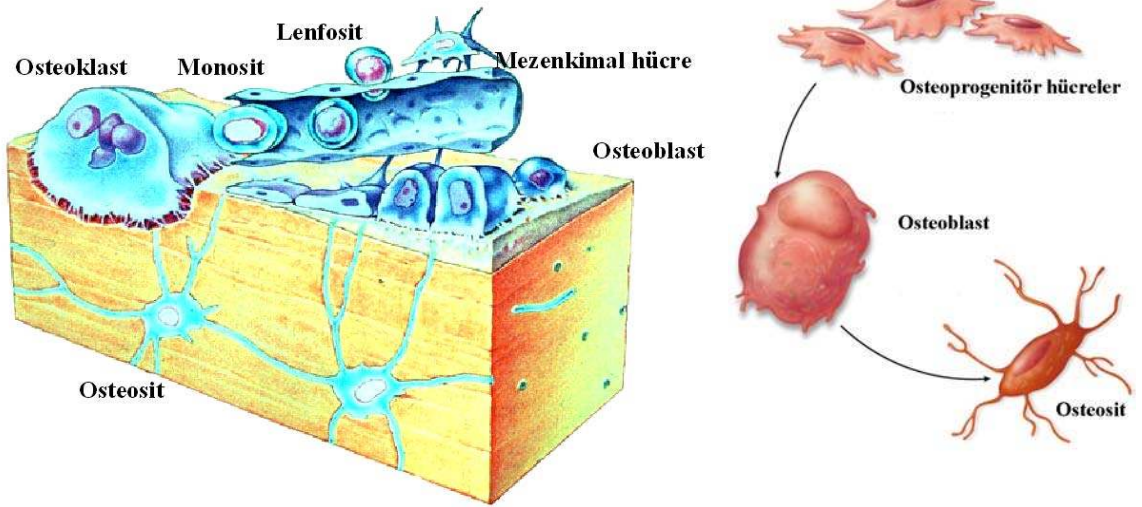
Kemik zarları

Periosteum, kaba, vasküler, konnektif bağ doku tabakasıdır ve eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreler. Periosteumun kemiğe destek sağlamada, beslenmesinde, gelişiminde ve tamir olaylarında önemli rolleri vardır. Yapısında temel olarak kollajen ve elastik lifler bulunur. “Sharpey lifleri” adı verilen kollajen uzantılar ile kemiğe bağlanmaktadır. Perikondrium bol damar içeren, iki tabakalı bir zardır. Kalın dış tabaka “fibröz tabaka” olarak da adlandırılır ve düzensiz, yoğun konnektif dokudan oluşur. Daha ince ve zayıf iç tabaka ise “osteojenik tabaka” olarak bilinir ve gevşek bağ dokusunda olup, hücreden zengindir. Tabakaların her birinin ayrı fonksiyonları vardır. Dış kat metabolizmada rol alan damarları ve lenfatikleri içerir. İç tabakanın hücreleri ise kemik hasarında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik oluşumunu sağlar. Kemik onarımına katılan bu hücreler normal koşullarda aktif değildir.^{9,47,52}

Endosteum tabakası, kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini çevreleyen ince bir retiküler bağ dokusudur. Periosteumdan daha incedir ve tek tabaka osteojenik hücre içerir. Bu tabakanın kemik doku yanında, hemopoetik hücreleri yapabilme özelliği vardır.^{9,47,52}

Kemik hücreleri (Şekil 1)

- Osteoprogenitör hücreler,
- Osteoblastlar,
- Osteoklastlar,
- Osteositler,
- Kemik iliği hematopoetik hücreler



Şekil 1: Kemik hücrelerinin ve farklılaşma yollarının şematik gösterimi. Osteoklastlar, kemik iliğinde yer alan makrofaj öncülerinden köken alan monositlerin füzyonuyla oluşur. Osteoprogenitör hücreler ise kemikteki aktiviteye göre osteoblastlara, osteoblastlar da osteositlere farklılaşabilir (Kierszenbaum A.L. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 127, 2002).

Osteoprogenitör hücreler mitozla çoğalabilen, mezenşimden kaynaklanan, kemik yapıcı öncü hücreler olup, osteoblastlara veya düşük oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücrelere farklılaşabilirler. Kemik büyümesinde ve kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünüp, osteoblast hücrelerine dönüşürler. Genellikle soluk boyanan nükleuslu, asidofilik sitoplazmalı hücreler olup, periostun derin tabakasında, Havers kanallarında ve endosteumda bulunurlar.^{9,47,52}

Osteoblastlar matür, metabolik yönden aktif, kemik organik matriksin yapımından sorumlu hücrelerdir. Bu hücreler, kübik ya da alçak prizmatik hücrelerden yapılmıştır. İri nükleusları olup sitoplazmaları koyu bazofiliktir. Osteoid doku ve tip I kollajeni, glikoproteinleri, proteoglikanları ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, osteoprotegerin gibi bazı proteinleri salgılar. Bunların yanında kemik rejenerasyonunda önemli rol aldıkları düşünülen, BMP (bone morphogenic protein), TGF- β , IGF-I, IGF-II, IL-1, PDGF gibi sinyal proteinlerini salgılar. Kemik yapım aktivitesi sonlanmaya başladığında, osteoblastların bir kısmı oluşturdukları matriks içinde hapsolarak osteositlere dönüşürken, diğer kısmı periost ve endosteal örtücü yüzey hücrelerine dönüşürler.^{9,47,52}

Osteositler kemik matriks içerisinde lakün olarak adlandırılan küçük boşluklarda yerleşmiş olgun osteoblastlardır. Her bir osteositten çıkan sitoplazmik uzantılar diğer osteositlere uzanarak bir ağ oluştururlar. Lakünlerde bulunan kanaliküller yardımıyla da kan damarlarına ve diğer lakünlere bağlanırlar. Lokal çevre faktörlerinden etkilenirler ve kemiğe etki eden kuvvetler karşısında siklik adenosin monofosfat (cAMP), osteokalsin ve IGF salgırlar. Bu faktörlerin salgılanmasını takiben, öncül osteoblastların sayısı artarak kemikte remodeling ve kemik apozisyonu görülür. Ayrıca osteositler ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun düzenlenmesinde de önemli rol alırlar.^{9,47,52}

Osteoklastlar hormonal ve hücrel mekanizmaların kontrolünde, 4 ile 40 arasında çekirdekleri olan ve kemik rezorpsiyonu yapan hücrelerdir. Kemik yüzeylerine tutunmuş “cutting cones” olarak adlandırılan gruplardaki bu hücrelerin fonksiyonu; içerdikleri kollajenaz ile diğer proteolitik enzimlerini salgılamak, kemiğin inorganik ve organik matriksi ile kalsifiye kartilajı çözmektir. Bu süreç sonunda “Howship Lakünaları” olarak adlandırılan kemik yüzeyi erozif alanları oluşur. Osteoklastlar, kemik iliğinde yer alan granülositik makrofaj öncülerinden köken alan monositlerin füzyonuyla oluşur. İnterlökin-1, -3, -6 ve -11, TNF- α ve TGF- α ’nın osteoklast oluşumunu etkileyen faktörler olduğu düşünülmektedir. Osteoklastlar hormonlara karşı da çok duyarlıdır. Parathormon, kalsitonin ve osteoblast stimule edici faktör bağlayan reseptörleri vardır. Örneğin paratiroid hormonu hücrede RNA sentezini arttırmada etkili olurken, kalsitonun hormonu bunun tersi etki yapmaktadır. Kemik yıkımı, kemiğin şekillenmesinde önemli rol oynar. Bu olay osteoklast ve osteoblastların uyumlu çalışması neticesinde gerçekleşmektedir.^{9,47,52}

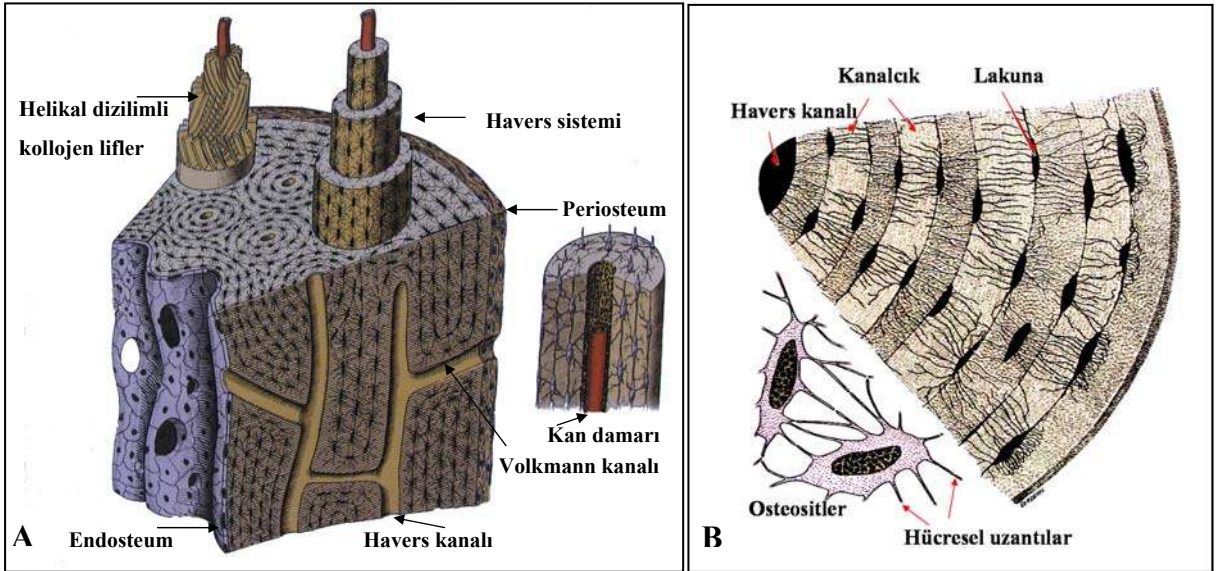
Morfolojik sınıflama

Kemik morfolojik olarak nonlameller, kortikal ve kansellöz kemik olarak üçe ayrılır.

Nonlameller kemik embriyonik dönemde, kırık iyileşmesinde, hiperparatiroidizm ve Paget hastalığı gibi patolojik süreçlerde vardır. Gelişigüzel dizili kollajen lifler ve osteoblastlar ile döşeli düzensiz vasküler boşluklardan oluşur. Daha sonra yeniden yapılanma ile kortikal veya kansellöz kemiğe dönüşür.

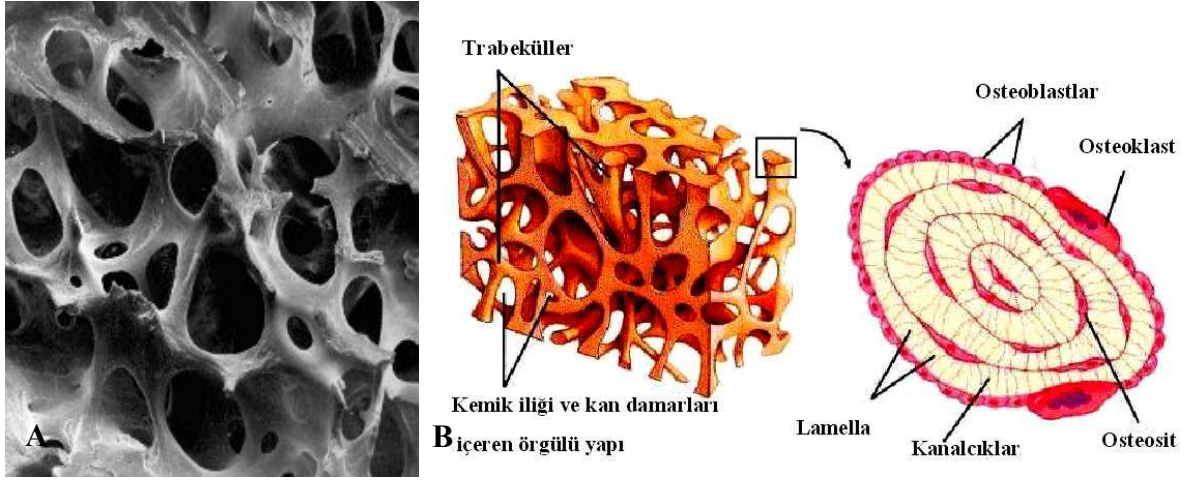
Kortikal kemik, kompakt veya lameller kemik olarak da adlandırılır. Nonlameller kemikten yeniden yapılanma sonucu oluşur. Yassı kemiklerin iç ve dış tabakalarını, uzun kemiklerin dış yüzünü oluşturur. Kortikal kemiğin ana yapısı “Havers sistemi” olarak da

adlandırılan osteondur. Osteon uzunlamasına dizili vasküler kanalları (Havers kanalları) saran silindirik şekilli vasküler kemikten oluşur. Horizontal dizilimli kanallar (Volkman kanalları) komşu osteonları birleştirir. Volkman kanalları sayesinde, Havers kanalları kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon olanağı olmadığından kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar ulaşır. Kortikal kemiğin mekanik gücü osteonların sıkı dizilimine bağlıdır.^{9,47,52} (Şekil 2)



Şekil 2: Kortikal kemiğin morfolojik yapısı (A) Havers ve Volkman kanallarının kemik yapısındaki yerleşimleri. Sağda içerisinden kapiller arter geçen bir havers sistemi ve etrafındaki lameller yapı görülmekte. (B) Birden fazla paralel ve farklı yönlerde dizilimli kollajen liflerinden oluşmuş lameller yapıları izlenmekte. Lakunadan uzanan birden fazla sayıdaki kanalikül yapılarla Havers kanalları arasındaki bağlantı sağlanmakta (Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter eight, page: 144-146, 2003).

Kansellöz kemik (trabeküler kemik) kortikal kemik yüzleri arasında, balpeteği görünümlü, boşluklarında hematopoetik elemanlar içeren, 1 mm kalınlığında trabeküllerden oluşur. Kortikal kemiğe göre daha gevşek yapıda olmasına rağmen, özellikle femur başında ve vertebralarda trabeküllerin kortekse dik yerleşimli dizilimi sayesinde dış yüklenmeye yapısal karşı koyma gücü oluşur. Kansellöz kemik iç endostal yüzeyde sürekli yeniden yapılanma oluşturur^{9,47,52} (**Şekil 3**).



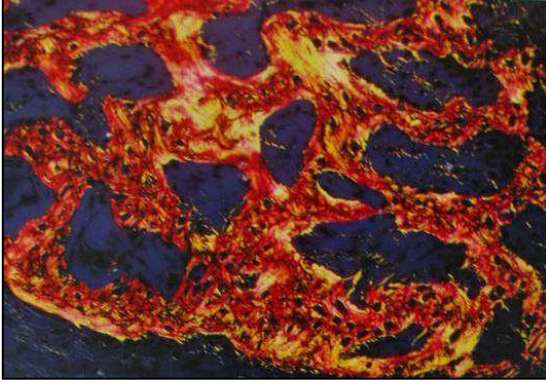
Şekil 3: Kansellöz kemiğin morfolojik yapısı (A) Kansellöz kemiğin gevşek trabeküler yapısının görünümü. (B) Kansellöz kemiğin trabeküler yapısının ve kemik iliği ile kan damarı içeren örgülü yapının şematik görünümü.

Kemik matriksi

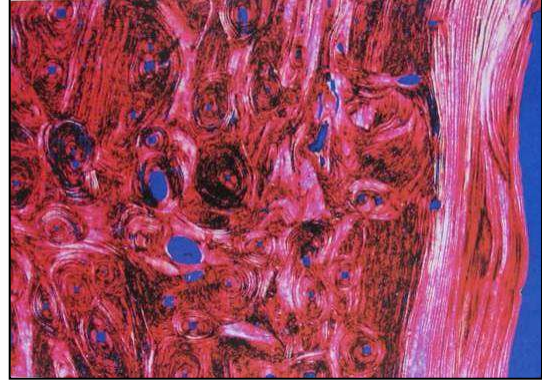
Kemik matriksi; organik ve inorganik elemanlardan oluşur. Kemiğin organizmadaki gerekli işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi ancak dokudaki organik ve inorganik matriks elemanlarının uyumlu birlikteliğine bağlıdır. Kemik ağırlığının yaklaşık %20'si sudur. Hacminin ise çoğunu kollajen oluştururken, kuru kemik ağırlığının %60-70'ini

inorganik kalsiyum fosfat, %30-35'ini ise organik fibröz protein ve kollajen oluşturur. Kemik iliğine kıyasla, kemikteki hücre sayısı daha azdır.^{9,47,52}

Kemik organik matriksi osteoid adı verilen, osteoblastlar tarafından salgılanan mineralize olmamış organik yapıdan oluşur. %90'ını tip I kollajen; %10'unu ise nonkollajenöz proteinler (glikoproteinler, proteoglikanlar), peptitler, karbohidratlar ve lipidler meydana getirir. Nonkollajenöz proteinlerin büyüme faktörlerinin salınımında, hücrelerin organik matrikse tutunmalarında ve organik matriksin kalsifikasyonunda görevli oldukları düşünülmektedir. Gelişmiş bir kemik dokuda lifler paralel ve porlar bırakacak şekilde dizilmiş olup, aralarında hidroksiapatit kristalleri yerleşiktir.^{9,47,52} (Şekil 4)



Şekil 4-A



Şekil 4-B

Şekil 4: Kansellöz ve kortikal kemiğin kollajen yapıları (A) Tipik, gelişigüzel kollajen lif dağılımı sergileyen kansellöz kemik kesiti. (B) Kortikal kemikte kollajen liflerinin düzenli paralel ve havers sistemini oluşturan yapısını gösteren kemik kesiti (Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter eight, page: 145-6 , 2003).

Kemik inorganik elemanlarının başında kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum, sodyum gibi maddeler gelir. Ayrıca vücuttaki kalsiyumun %99'u, fosforun %85'i, magnezyum ve sodyumun %40-60'ı iskelet sistemindedir. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte içiçe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, osteoid mineralizasyonu sayesinde, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır.^{9,47,52}

Kemiğin üç temel ögesi olan kollajen, mineraller ve hücreler durağan olmayıp sürekli olarak yenilenirler. Bu yenilenme kemik üzerine etki eden kuvvetlerle bağlantılı olup, basınç altındaki kemikte rezorpsiyon, gerilim kuvvetleri altında ise apozisyon görülür. Ölen hücrelerin yerine yenisi geçerken, kollajen ve mineraller devamlı olarak rezorbe edilip, yeniden oluşturulur. “Remodelling” adı verilen, rezorbsiyon ve depozisyon işlemleri arasındaki denge sayesinde kemiğin şekli ve hacmi neredeyse değişmeden kalır. Rezorpsiyon depozisyon kadar hızlı devam edemediğinde kemiğin kırılabilirliği artar (Paget hastalığı). Yeniden yapılanmadaki (remodelling) dengenin rezorbsiyon lehine bozulmasında ise osteoporoz ortaya çıkar.²⁵

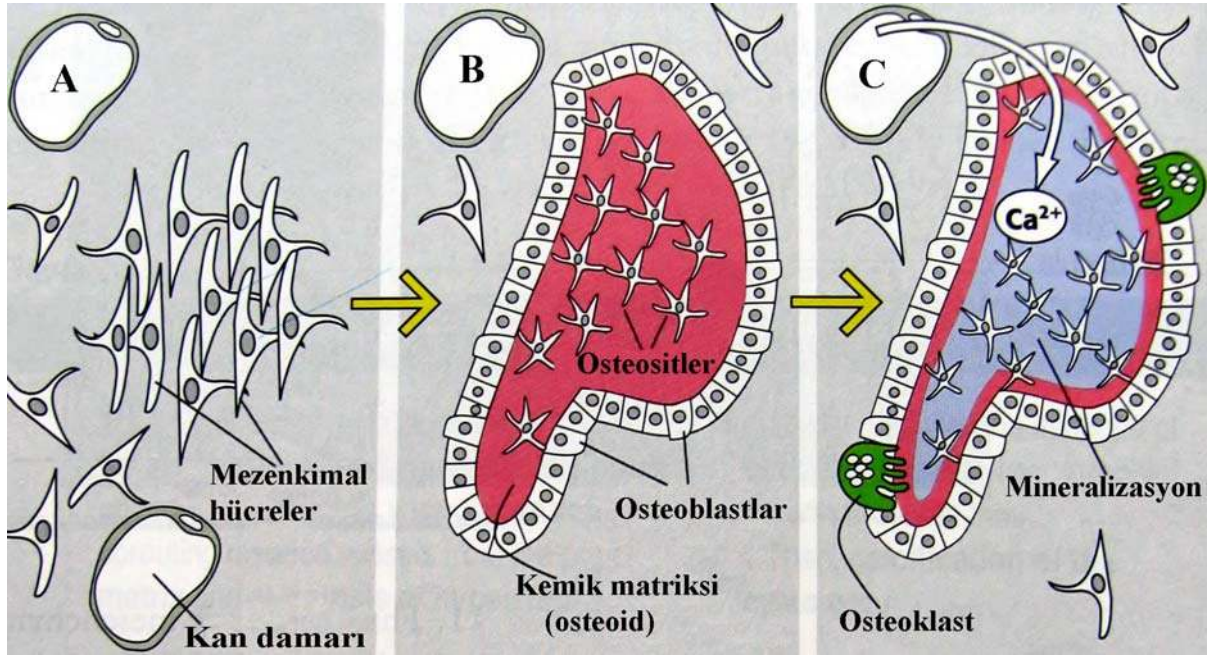
Kemik metabolizması hormonlar ve lokal faktörlerin kontrolü altındadır. Bunlardan en önemlileri; parathormon, kalsitonin ve vitamin D'dir. Osteoblastlar kalsiyum reseptörleri içeren yegane kemik hücreleridir. Bu sebeple osteoblastlar paratiroid hormon etkisindedirler. Parathormon kalsiyumun, kemikte kalsiyum içeren boşluklara geçişini artırarak ekstrasellüler kalsiyum seviyesini düzenler. Vitamin D ise intestinal ve renal kalsiyum bağlayıcı proteinleri uyararak aktif kalsiyum transportunu kolaylaştırır. Kalsitonin de plazma kalsiyum seviyesinde akut artışa cevap olarak tiroid bezinin parafoliküler hücrelerinden salgınır ve kalsiyuma bağlı hücresel metabolik aktiviteyi inhibe eder.^{9,25,47,52}

KEMİKTE GELİŞİM VE BÜYÜME

Kemikte gelişim ve büyüme embriyonik dönemde başlayıp, genç erişkin döneme kadar devam eder. İntramembranöz ve endokondral olmak üzere 2 tür kemikleşme vardır. Bunlardan intramembranöz kemikleşme bağ dokusu, endokondral kemikleşme ise kıkırdak dokunun katılımıyla oluşmaktadır. Kemikleşme hangi türde olursa olsun, ilk oluşan kemik dokusu birincil kemik olarak adlandırılan olgunlaşmamış kemiktir. Oluşan bu birincil kemik kalıcı olmayıp yerini olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır.

İntramembranöz kemikleşme, mezenşimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesidir (**Şekil 5**). Organizmada kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın processus coronoideus ve simfisis dışındaki bölgelerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Mezenşim hücreleri önce hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücreye farklılaşırlar, daha sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler. Bu dokuda bol kılcal damar gözlenir. Bu damarlar osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonlarını taşır. İyonlar, osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. Oluşan dokuya kemik trabekülleri denir. Trabeküller içinde kalan osteoblastlar aktivitesi azalmış osteositlere dönüşür. Şekillenen trabeküllerin yüzeyine osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar tek sıra halinde dizilirler ve kemik lamelleri yaparlar. Bu olayın ardı ardına tekrarlanması sonucu birincil kemik trabeküllerinin yüzeylerinde ve kenarlarında lamelli ikincil kemik yapısında katmanlar meydana gelir ve trabeküller kalınlaşıp uzarlar. Bu sırada osteoklastlar kemikleri iç yüzlerinden rezorbe ederken, osteoblastlar da bir taraftan yeni kemik lamelleri eklerler. Böylece birincil kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar, geriye sadece ikincil kemik yapısındaki trabeküller kalır. Komşu trabeküller

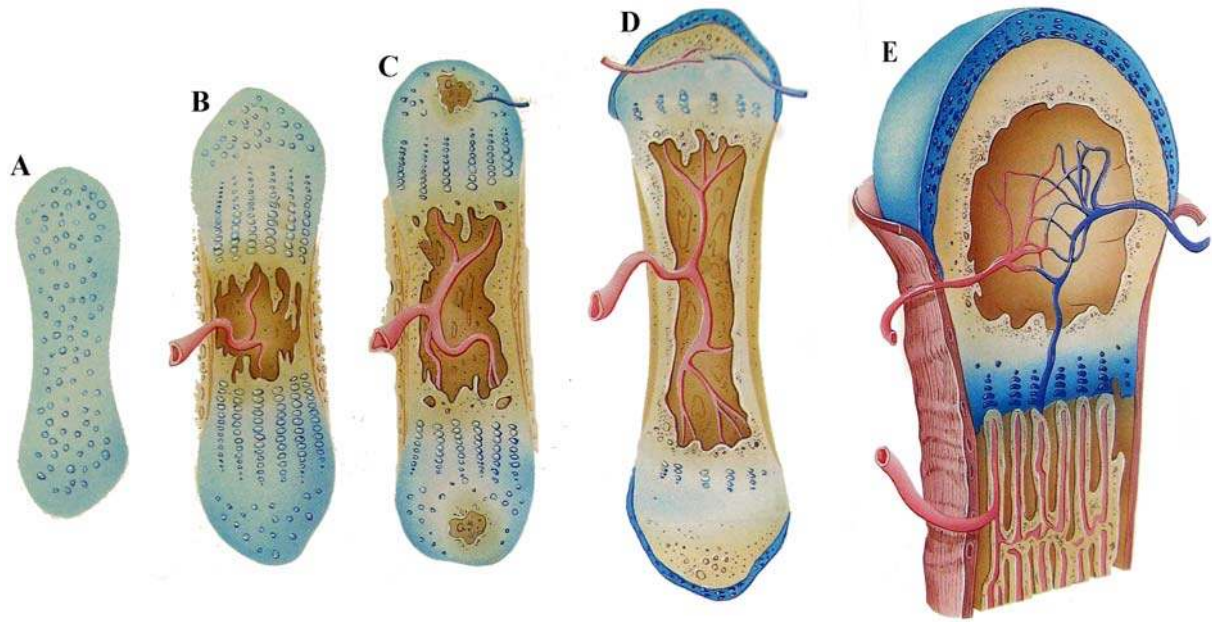
birbirleriyle kaynaşarak spongiyöz kemiği şekillendirirler. Bu kemiklerin iç ve dış yüzlerinde yine intramembranöz yolla bir miktar kompakt kemik eklenir ve kemikleşme sona erer. Trabeküllerin aralarında kalan mezenşim dokusundan da kemik iliği şekillenir.^{9,25,33,47,52}



Şekil 5: İntramembranöz kemikleşme. **(A)** Mezenkimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesidir. **(B)** Mezenşim hücreleri hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücreye farklanıp, sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler. **(C)** Kılcal damarlardan osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonları taşınır, osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. Osteoklastlar kemikleri iç yüzlerinden rezorbe ederken osteoblastlar da bir taraftan yeni kemik lamelleri eklerler. Birincil kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar, geriye sadece ikincil kemik yapısındaki trabeküller kalır (Kierszenbaum A.L. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 1st ed. Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 131, 2002).

Enkondral kemikleşme uzun ve kısa kemiklerde görülür (**Şekil 6**). Kemikleşme hiyalin kıkırdaktan ufak bir modelle başlayıp, kemik dokusu oluşumuyla sonlanır. Modelin diyafiz kıkırdağını örten perikondriumun iç katında bulunan mezenkim hücreleri osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar üst üste yerleşen kemik lamellerini yapar. Böylece yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında silindirik biçimde bir kemik manşet ortaya çıkar. Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesine engel olur. Oluşan iskemi, kondrositlerde önce hipertrofiye, ardından diyafizin orta kısmından başlayarak tahrip olup, ölmelerine neden olur. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur (kemik iliği kavitesi). Periosteumdaki osteoklastlar kemik manşeti yer yer delerek foramen nutrisyumları açarlar. Periosteumdaki kan damarları bu deliklerden girerek, osteoprogenitör ve hematopoetik hücreleri taşırlar. Damarlarla gelen kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalen fosfataz aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrikse çöker ve böylece diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Diyafizde şekillenen boşluklara kan damarları ile gelen mezenşim hücrelerinden farklılaşan osteoblastlar, kalsifiye kıkırdak matriksi üzerine tek sıra dizilerek kemik dokusu yapmaya başlarlar. Böylece ortaları kalsifiye kıkırdak, yüzeyleri ise kemik dokusundan meydana gelen kemik trabekülleri ortaya çıkar. Kemik trabekülleri ile kan damarlarının aralarında kalan boşluklarda kemik iliği şekillenir. Bu arada kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler mitoz ile çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar. Böylece modelin boyu da devamlı olarak uzar. Kemik manşet de kalınlaşıp, epifizlere doğru uzanır ve kondrositlerin bulunduğu bölgeyi dıştan sarar. Kemikleşme merkezinde olduğu gibi önce kıkırdak matriks, ardından da ilk şekillenenlerin devamı halinde kemik trabekülleri oluşur. Enkondral kemikleşme epifizlere yaklaşıncaya, epifizlerin içlerinde ikincil kemikleşme merkezleri belirir. Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri

arasında sadece kıkırdak bir disk kalır ki buna epifiz plağı denir. Kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plaklarındaki kıkırdak hücreleri diyafiz yönüne doğru bölünüp çoğalarak devamlı kıkırdak dokusu yapar, bu kıkırdak da devamlı olarak yerini kemik dokusuna bırakır. Böylelikle kemikler belli bir yaşa kadar uzamaya devam eder. En sonunda epifiz plakları da kemikleşir ve kemik büyüme sonlanır.^{9,25,33,47,52}



Şekil 6: Enkondral kemikleşme. **(A)** Hyalin kıkırdak model **(B)** Diyafiz kıkırdağını örten perikondriyumun iç katındaki mezenkim hücreleri osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklanır. Osteoblastlar üst üste yerleşen kemik lamellerini yapar. Böylece yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında kemik manşet oluşur. **(C)** Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesini bozarak, kondrositlerde hipertrofiye, 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 (Gartner L.P., James L.H. Color Atlas of Histology, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Chapter 4, page 73, 2000) .

KEMİK İYİLEŞMESİ

Organizmada hasar gören dokuların tamirinde esas olan fibröz skar ile onarımdır. Bunun vücuttaki önemli istisnası kemik dokusudur. Bu dokuda oluşan hasar sonrasında uygun şartlar sağlanırsa, yeni bir kemik dokusu oluşarak bölge tamamen normal hale gelmektedir.

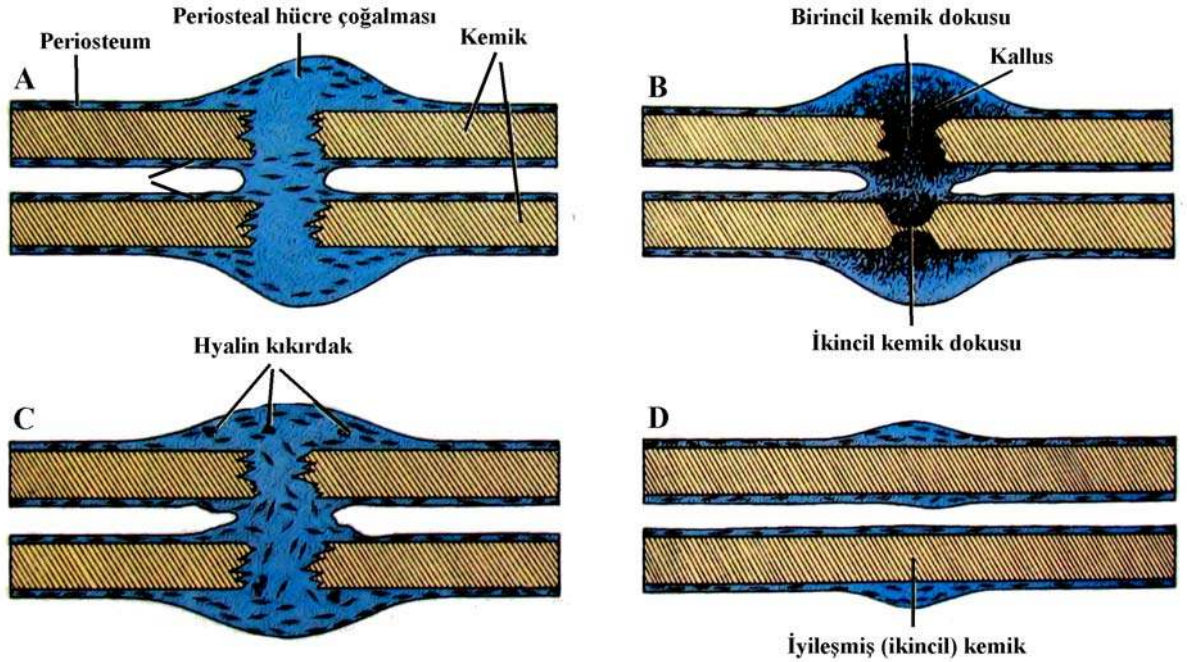
Birincil kırık iyileşmesi, rijit internal fiksasyondan sonra görülür ve belirli bir dış kallus oluşmadan sadece iç kallusla devam eden temas iyileşmesidir. Kırık kapalı yöntemle tedavi edilirse, ikincil kırık iyileşmesi meydana gelir ve evrelere bölünebilir. Histolojik görünümüne göre yapılan sınıflamalarda genel olarak aynı bulgular kabul edilip benzer evrelemeler yapılmıştır. Genel olarak 3 evrede incelenir: erken inflamatuvar dönem, onarım dönemi, yeniden yapılanma dönemi (remodeling). Evreleri birbirinden zaman olarak kesin sınırlarla ayırmak güçtür ve her evre daima kendinden bir önceki veya bir sonraki evre içinde bulunur.^{17,27}

İnflamatuvar fazda önce, kırık bölgesinde yaralanan damarlardan kanama, pıhtılaşmayı sağlamak için trombositlerin toplanmasıyla moleküler aracılardan yaralanma bölgesine salınması ve bunun sonucu olarak pıhtılaşma ile kırık uçları arasında, periost altında ve periost yırtılmışsa bunun etrafında hematoma oluşur. Hematom ikincil kırık iyileşmesinde önemli rol sahibidir. Yarattığı basınçla kırık uçlarını bir arada tutar, ortamındaki trombositler ile diğer hücrelerden salınan büyüme faktörü ve proteinler ile hücre göçünü, periosteal hücre çoğalmasını ve onarım dokusu matriksinin sentezini başlatır. Açık kırıklarda hematoma boşalmasına bağlı kemik iyileşmesinde gecikme gözlenir. Erken dönemde oluşan vazokonstriksiyonu, vazodilatasyon takip eder ve salınan prostoglandinlerin de yardımıyla bölgeye akut yangı hücreleri (nötrofiller, monositler, lenfositler) göç eder. Kırık uçlarında bozulan dolaşıma bağlı, kemik dokuda daha geniş olmak üzere nekroz bölgesi oluşur. Ortama

gelen nötrofiller ve makrofajlar hasarlı dokuyu ortadan kaldırırlar. Kırık bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Nötrofiller ve makrofajların yardımı ile fibrin matriksi oluşur. Fibrin matriksi içindeki öncü hücreler, lokal biyolojik etkilerle değişik dokuları oluşturmak için farklanmaya hazırdır.^{17,25,27}

Onarım evresi, kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7–12 gün sürer. Bu evrede lokal aracılı mekanizmalarla hassaslaşan öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklanmaya ve düzenlenmeye başlar. Bunlar granülasyon dokusundan, periosteumun osteojenik tabakası ve endosteumdan köken alan pluripotent hücrelerdir. Bu aşamada kimyasal, elektriksel ve mekanik uyarılar söz konusudur. Prostoglandinlerin etkisi ile yeni osteoklast oluşumu ve mevcut osteoklast aktivitesinde artış olurken; fibroblastlar kollajen, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoidi salgırlar. Fibroblastlar, vasküler oluşuma yardım etmek üzere stromaya yerleşmeye başlar. Vasküler oluşum arttıkça, kollajen matriksi belirginleşir. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içerdiği kollajen kapsamıyla yakın ilişkilidir. Bu esnada osteoid sekresyonu ve takiben mineralizasyon olur. Kırık hattı bölgesi ve çevresinde yumuşak kallus oluşur. İlk 4–6 haftalık süre içinde oluşan bu kallusun harekete karşı direnci düşüktür. Bu nedenle tespitin sağlam olması önemlidir. Kırık iyileşmesinin ilk dönemlerinde periosteal damarlar, geç dönemdeyse besleyici (nutrisyen) damarlar, kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Sonuçta kallus ossifiye olur ve kırık yüzleri arasında nonlameller kemik köprüsü oluşturur. Eğer uygun immobilizasyon yapılmazsa kallus ossifikasyonu yeterince oluşamaz, instabil fibröz birleşme gelişebilir. Periosteumun hasar görmesi ya da ortamdan uzaklaştırılması kırık iyileşmesini yavaşlatır.^{17,25,27}

Kemik iyileşmesi en uzun faz olan ve yıllarca sürebilen yeniden yapılanma evresi ile sonlanır. Bu fazda kemik orijinal güç, şekil ve yapısını kazanır. Aksiyal yüklenme ile güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümü gerçekleşir. Wolf kanuna göre kemiğin işlevsel durumundaki değişiklik, dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bu kanun günümüzde de kemiğin yeniden şekillenmesinde temel bir kural olarak kabul edilmektedir. Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü ise negatif elektrik ile yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin egemen olduğu konveks yüzde geri emilim ve osteoblastik aktivitenin hakim olduğu konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır. Yani, “kırığın konkav tarafında kemikleşme, konveks tarafında geri emilim” olur^{17,25,27} (Şekil 7) .



Şekil 7: Kortikal kemiklerde kemik iyileşme süreci (Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter eight, page: 144 , 2003).

Kemik iyileşmesini etkileyen faktörler yerel ve genel faktörler olarak incelenir. Yerel faktörler; yüksek enerjili travma, kırık uçlarının ucuca gelmemesi, yetersiz immobilizasyon ve kanlanma, eşlik eden yumuşak doku yaralanması, enfeksiyon ile kanser gibi yerel patolojiler ve denervasyon olarak sayılabilir. Genel faktörler içinde ise ileri yaş, sigara, sistemik hastalıklar ve enfeksiyonlar, beslenme bozuklukları, hormonal bozukluklar, vitamin eksiklikleri (A, C, D, B₆, K), bazı ilaçlar (nonsteroid antiinflatuar ilaçlar, steroid, sitotoksik ilaçlar) ve radyoterapi sayılabilir.^{17,25,27}

KEMİK İYİLEŞMESİNDE ETKİLİ BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Kemik metabolizması bazı kimyasal, elektriksel ve mekanik uyarılarca düzenlenir. Özellikle kemik iyileşmesi sırasında trombosit, makrofaj ve fibroblastlar, bazı proteinler ve büyüme faktörleri salgılar. Bu proteinler karmaşık trafiği düzenlemekte, migrasyon, proliferasyon ve diferansiasyon ile rezorpsiyon arasındaki hassas dengeyi yerel olarak sağlamaktadırlar. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kemik iyileşmesinde rol alan birçok kemik uyarıcı faktör tanımlanmıştır. Bunların bazıları sınırlı da olsa klinik olarak kullanılmış ancak rutin klinik kullanıma girmeleri zor görünmektedir. Bunlardan BMP (bone morphogenetic protein)'ler, TGF β “transforming growth factor β ”, PDGF “platelet derived-growth factor” ve FGF “fibroblast growth factor”, VEGF “vascular endothelial growth factor”, IGF “insülin-like growth factor” en çok bilinenleridir. Bu faktörler çeşitli saflaştırma metodlarıyla direk denekten elde edilebildiği gibi, rekombinant olarak da istenilen miktarda elde edilmesi mümkündür. İlk çalışmalarda, direk kemik iyileşmesi olan bölgeye uygulanmıştır. Ancak günümüzde faktörlerin yavaş salınımını sağlayan modellerle veya kemik benzeri ürünlerle kombine şekilde uygulamaları yapılmaktadır^{14,51,66} **(Tablo 1)** .

Tablo 1: Kemik iyileşmesinde görevli büyüme faktörleri

Büyüme Faktörü	Ektopik Kemik Oluşturma	Segmental Defekt İyileşmesi	Kemik İyileşmeye Etkisi	Düşük			Potansiyel Klinik Kullanım
				Diğer Büyüme Faktörleriyle Etkileşim	Vertebral Grubunda Etki	Primatlarda Etki	
BMP	Evet	Enkondral ++++ Membranöz ++++	-Kallus hacmini artırır -Mekanik direnci artırır -Eksojen uygulama kritik yükümlükteki kemik defektlerini iyileştirebilir	TGF- β ile sinerjistik	Evet	Evet	-Spinal füzyon -Alveolar kemik defektleri -Segmental defektler -Diş implantları
TGF-β	Hayır	Enkondral ++ Membranöz ++	-Kallus hacmini artırır - Mekanik direnci artırır -Subperiosteal enjeksiyonu kondrogenez ve membranöz kemikleşmeyi uyarır -Eksojen uygulama kritik yükümlükteki kemik defektlerini iyileştirebilir	-TGF- β ile sinerjistik -FGF-2 ve VEGF ekspresyonunu artırır	Evet	Hayır (sınırlı çalışma)	-Tek başına etkinliği bilinmiyor
FGF	Hayır	Enkondral +/- Membranöz +/-	- Kallus ve kemik hacmini artırır -İyileşme bölgesinde anjiyogenezi uyarır - Eksojen uygulama mekanik direnci artırır	-VEGF ekspresyonunu artırır -TGF- β ile sinerjistik?	Evet	Evet (sınırlı çalışma)	-İyileşmeyen yaralarda anjiyogenezi artırır
PDGF	Hayır	Enkondral – Membranöz–	-Kallus hacmini artırır -Anjiyogenik faktörlerin salınımını uyarır - Mekanik direnci artırır -Kollajen sentez ve turnoverı artırır	-VEGF ekspresyonunu artırır -TGF- β ile kemotaksis için sinerjistik	Evet	Hayır	-Kronik yaralarda kullanım

FİBRİN YAPIŞTIRICI VE KLİNİK UYGULAMALAR

Cerrahinin temel prensiplerinden olan yaraların kapatılması, uygun yara iyileşmesinin sağlanması adına suture materyalleri vazgeçilmez bir araç olmuştur. Gelişen inflamatuvar reaksiyonlar, granüloma-fistül oluşumu ve yabancı cisim reaksiyonu gibi komplikasyonların görülmesi; bu tür komplikasyonlar oluşturmayacak, ucuz ve kullanımı kolay maddelerin arayışına neden olmuştur. Siyanoakrilatların travmatik doku yapıştırıcısı olarak kullanılmaya başlanması ümit vermiş³⁶, ancak zaman içinde bu materyallerin de granülasyon dokusu oluşumu, yabancı cisim reaksiyonu vb. komplikasyonları ortaya çıkmış ve daha ideal doku yapıştırıcısı bulmaya yönelik çalışmalar devam etmiştir. İlk defa Bergel'in fibrinin hemostatik etkisini göstermesiyle, yara iyileşmesi ve kan pıhtılaşmasında fibrinin önemi anlaşılmış ve dikkatler fibrin öncü maddesi fibrinojene yönelmiştir.^{3,16,67,}

Fibrinojen, α , β ve γ peptid zincirlerinden oluşmuş bir dimer olup; yara iyileşmesinin ilk basamaklarında Faktör XIII ve trombin ile olduğu kadar Faktör XII ile de etkileşerek hücrelerin içine göç ettiği bir iskelet kurar. Kalsiyum ve trombin ilavesinden sonra içerdiği fibrinojen miktarına bağlı olarak 5-30 sn içinde pıhtılaşma yani FY oluşumu gerçekleşir.^{3,28,36} Fibrin yapıştırıcı, diğer adıyla trombosit fakir plazma iki sistemden oluşur. Bunların ilkinde fibrinojen, soğuk çözünmeyen globulin, plazma proteinleri ve faktör 13 bulunur. Diğer sistemde ise trombin ve kalsiyum klorid vardır. İki sistem karıştığında trombin sayesinde fibrinojen fibrine dönüşüp katılaşır ve pıhtılaşma olayı başlar.⁴ Ayrıca trombin iyonize kalsiyum varlığında Faktör 13 ile etkileşerek soğuk çözünmeyen globulin ve fibrinin çapraz bağlar kurmasına neden olur bu bağlar sayesinde pıhtının direnç gücü artar; fakat zaman içinde kademeli olarak yıkılır ve 2-3 hafta içinde ortamdan kaybolur (**Şekil 8**) .



Şekil 8: Fibrin pıhtı oluşum mekanizması

Fibrinojenin trombinle aktif hale getirildiğinin anlaşılmasından sonra, 1940’larda Tidrick gibi araştırmacılar tarafından deri grefti sabitlemesinde ikisi kombine kullanılmış; fakat yetersiz fibrinojen miktarı nedeniyle başarı elde edilememiştir.^{21,28} Bundan 30 yıl sonra, fibrinojen miktarı arttırılan fibrin yapıştırıcı ile 1970’lerin başında Millesi ve arkadaşları deneysel olarak sinir anastomozunda başarı elde etmesiyle, tekrar popüler olmuş ve tüm vücutta kullanım alanı bulmuştur. Kulber yaptığı deneysel çalışmada, sıçan latissimus dorsi seroma modelinde fibrin yapıştırıcı kullanıldığında seroma oluşumunda azalma olduğunu göstermiştir.⁵⁷

Klinik olarak sinir anastomozlarında, yumuşak doku defektlerinde hemostaz ve keratinosit kültürleriyle birlikte yara iyileşmesi amaçlı, deri greftlerinin tespitinde^{21,28,36,99}, kansellöz kemik greftleriyle birlikte, kanama eğilimi olan hastalarda diş çekimi sonrası alveoler kavitede, dura yapıştırmada, spontan pnömotoraks olgularında hava vakum drenaj ile birlikte hava kaçağını önlemek için, akciğer rezeksiyonu sonrası hava- sıvı kaçağını önlemek için, vasküler anastomozlarda, peptik ülser kanamalarında kanamayı durdurmak için, yüz-boyun germe, meme küçültme ve büyütme gibi estetik ameliyatlarda kanamayı, sonrasındaki şişlik ve morluk oluşumunu azaltmak; dren kullanım süresini kısaltmak veya hiç kullanılmamasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.^{3,4,12,13,16,21,28,30,35,36,62,75}

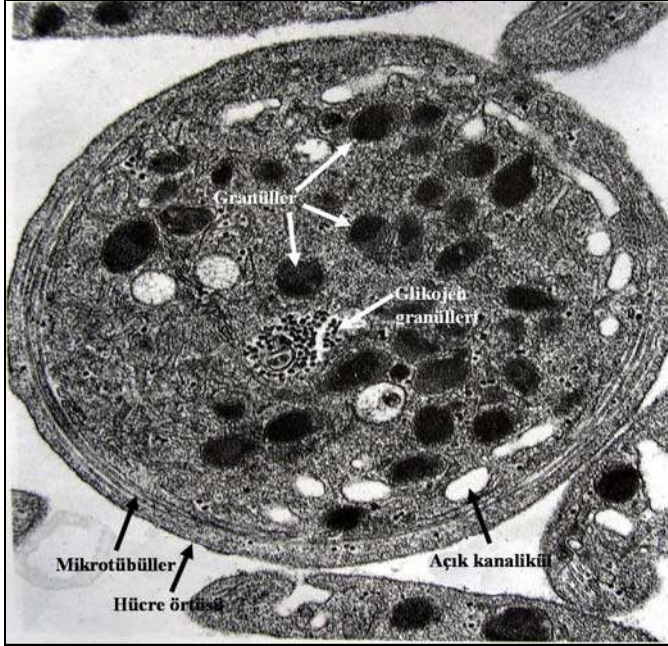
Ticari olarak hazırlanmış olan fibrin yapıştırıcıların hastalık bulaşma riski nedeniyle kullanımı kısıtlanmıştır.^{4,28} Otolog olarak kullanılması bu riski ortadan kaldırır, fakat ameliyattan önce hastanın kan vermesi gerekliliği ve yüksek maliyeti kullanımını sınırlandırmaktadır. Fibrin yapıştırıcı kemikte daha çok frontal sinüs gibi yük taşımayan alanlarda kemik tespiti için, veya kapama sırasında kemikle periost arasına yapıştırıcı olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında osteoindüktif etkisi de, pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Osteoindüktif etkisi olmadığını belirten yayınlar yanında, osteoindüktif etkiyi gösteren çalışmalar da vardır. Bu özeliğinden yararlanmak amacıyla kemik greftleriyle ve kemik benzeri ürünlerle kombine kullanımı tarif edilmiştir. Daha çok deneysel olan bir başka kullanımında ise, kültürde üretilmiş periosteal hücrelerle taşıyıcı olarak kırık iyileşme alanlarına uygulanmıştır.^{1,38,46,72,86,87}

TROMBOSİT ZENGİN PLAZMA VE KLİNİK UYGULAMALAR

Trombositlerin Yapısı ve İçerikleri

Trombositler, kemik iliğindeki megakaryositler tarafından üretilen 2–4 µm çapında, mitokondri ve mRNA içermesine rağmen çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Dinlenme halinde tipik olarak disk şeklinde olmalarına rağmen aktive olduklarında 5 µm'ye kadar ulaşabilen psödopodlar içeren globüler bir şekil alırlar. Vücutta herhangi bir zamanda dalakta lokalize olarak bulunur ve periferik dolaşıma geçtikten sonra ortalama 8-10 gün yaşarlar. Periferik yaymada kümeler halinde gözlenen trombositler tek tek incelendiğinde açık mavi boyanan periferik “hyalomer”; mor granüller ve mitokondrilerden oluşan santral “granülomer” kısımlarından oluştuğu görülür. Hem hücre zarlarının sitoplazma içine parmak

şeklinde girmesi sonucu oluşan ve yüzeye açılan “açık kanaliküler sistem” olarak adlandırılan bir kanalikül sistemine, hem de hyalomer bölgesinde trombosit aktivasyonu için gerekli olan Ca iyonlarını depolayan “yoğun tübüler sistem” adı verilen ikinci bir kanalikül sistemine sahiptirler. Yüzeylerinde bulunan reseptörleri, trombin, kollajen vb. moleküllerin uyarmasıyla aktif hale geçen trombositler, sitoplazmalarındaki aktif molekülleri içeren granülleri “açık kanaliküler sistem” yoluyla dışarı atarlar (**Şekil 9**). Yoğunluk ve içeriklerine göre delta, alfa ve lambda olarak üç değişik granül tariflenmiştir⁸¹ (**Tablo 2**).



Şekil 9: İnsan trombosit elektron mikroskopik fotoğrafı (Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter eight, page: 145-6 , 2003) .

Tablo 2: Trombosit granüllerinin içerikleri

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. Hücrel 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 • Karboksipeptidazlar • Kollajenaz • Asit Fosfataz • Arisülfataz Glikohidrolazlar • Heparinaz • Diğerleri

Kemik iyileşmesinde önemli rol oynayan büyüme faktörlerinin yanı sıra, salınan ADP ve Tromboksan A₂ gibi moleküller diğer trombositleri aktive ederek; vWF (von Willebrand Faktörü) trombositlerin birbirine yapışmasını sağlayarak pıhtılaşma mekanizmasında görev alırlar. ^{41,80,81}

Alfa Granüller: 200-400 nm çapında tek kat membranlı büyük organeller olup sayısal olarak trombositlerin majör granülleridir. Bu granüllerin koyu renkli boyanan alanlarında proteoglikanlar, açık renkli bölümlerinde vWF, albumin gibi proteinler ve tübüler yapılar vardır. Alfa granüllerin hemostaz, inflamasyon, 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 içerip, serotonin deposu olarak görev yapan granüllerdir.

Lambda Granüller (Lizozomlar): 175-250 nm çapında olup içinde asit hidrolazlar gibi lizozomal enzimler olan granüllerdir. Bakterisidal etkisi olan glikozidaz, proteaz gibi proteinleri de içerirler.

Trombositten Salınan Büyüme Faktörleri

Anjiogenez terimi ilk kez plasentadaki yeni damar oluşumunu tarif etmek için 1935'te kullanıma girmiş ve daha sonra tüm yeni damar oluşumları için kullanılır olmuştur. Dokuların normal büyüme ve gelişmesi için damar proliferasyonu gerekli bir işlem olmasına rağmen erişkinlerde anjiogenez nadir olarak gözlenir. Üreme sisteminde folikül ve korpus luteumda, hamilelik sonrası plasentada, yara ve kemik iyileşmesinde normal olarak gerçekleşirken; tümörlerde, diyabetik retinopati gibi durumlarda kontrolsüz ve patolojiktir. Bu nedenle anjiogenezi uyaran ve durduran bir takım faktörlerin araştırılıp, bulunması vücudun normal ve patolojik işleyiş mekanizmalarının kısmen de olsa aydınlanmasını sağlamıştır. Anjiogenez çeşitli anjiogenik faktörler tarafından başlatılıp yönlendirildiği bilinen kompleks bir mekanizmadır.⁸² Son yıllarda büyüme faktörlerinin yara iyileşmesini ve anjiogenezi olumlu yönde etkilediğinin saptanıp etki mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması, araştırmacıların kemik, yara, tendon, sinir iyileşmesine yönelik deneysel ve klinik uygulamalarında bu faktörleri daha büyük ilgi ile kullanmalarına neden olmuştur.¹⁰²

Dolaşımda bulunan trombositlerin α -granüllerinde VEGF, PDGF, TGF β 1 ve β 2, bFGF (bazic Fibroblast Growth Factor) gibi pek çok büyüme faktörü depolanmış durumdadır. Çeşitli uyaranlara karşı trombosit aktivasyonu olduğunda bu maddeler granüllerden salınırlar.

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): Trombosit kaynaklı büyüme faktörü molekülü hücre membranındaki reseptörlere bağlanınca sitoplazmadaki yüksek enerjili fosfat bağı içeren bir sinyal proteini aktive olur ve bu sinyal iyileşmede görevli hücrelerin çoğalmasına, anjiogeneze, kollajen, fibronektin, hyaluronik asit üretilmesine, diğer büyüme faktörleri ve hücrelerin fonksiyonlarının artmasına aracılık eder.^{22,24,48,79} Böylece fibroblastik ve osteoblastik faaliyetler artar, hücreler farklılaşır, büyüme faktörlerinin makrofaj gibi hücreler üzerindeki etkileri hızlanmış olur.^{58,60,89,103} Trombosit kaynaklı büyüme faktörü insan mezenkimal hücreleri için birincil mitojen olan bir büyüme faktörüdür. Bu etki plazmada diğer büyüme faktörlerinin bulunmasına bağlı olup interferon- γ sayesinde daha da artar.^{5,12,40,84} Trombosit kaynaklı büyüme faktörü'nün nötrofil, monosit, makrofaj ve fibroblastlar için kemotaktik olmasının diğer büyüme faktörlerinin varlığından bağımsız olmasının yanısıra, yara iyileşmesinin ileri safhalarında kollajenaz aktivasyonu yaparak 'remodelling'e katkıda bulunması gibi bir özelliği de vardır.^{5,16,39,40,44,53,54,79,91} Trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve TGF- β yara iyileşmesinde rol oynayan faktörler olup genellikle sinerjistik etki gösterir. Kollajen miktarını arttıran bu iki proteinin de kemik, periodontium ve deri iyileşmesini stimüle ettiği, yara kuvvetini arttırdığı gösterilmiştir.^{3,39,56,89,110}

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü kemik iyileşmesine temel olarak osteoblast ve inflamatuvar mediatorlerin kemotaksisi, kemik hücre proliferasyonu, kollajen sentezini ve döngüsünü arttırması, kemik matriks sentez ve döngüsünü uyarması ve diğer anjiyojenik faktörlerin salınımını uyarması yoluyla yardımcı olur.^{66,100}

Klinikte diyabet veya iskemi kaynaklı kronik deri ülserlerinde yara iyileşmesini arttırmak için, maksillofasiyal cerrahide kemik grefti yerleştirilen bölgede, oral ve nazal fistüllerin cerrahi onarımında, kemik-integre implantlara destek olarak kullanılmıştır.^{44,64,103}

Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmiş olan PDGF (becaplermin 0,01 %- Regranex OMP, Raritan, NJ) ile kronik yaralarda yapılmış olan iyileşme çalışmaları da ümit vaat eden sonuçlar sunmaktadır.^{16,44,92}

“Transforming” büyüme faktörü (TGF- β): “Transforming” büyüme faktörü- β 1 ve β 2 trombositlerde bulunduğu tespit edilen, bağ dokusu iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda görev alan, TGF’nin en sık görülen alt gruplarıdır. Hücre büyümesi, farklılaşması, extraselüler matriks üretimi gibi çeşitli biyolojik olaylarda rol alırlar.^{3,56} Fibroblastları prokollajen üretimi için aktive ederek yarada kollajen depolanmasına neden olurlar.^{56,70} TGF- β lar parakrin olarak etkilerini fibroblast, kemik iliği kök hücresi ve preosteoblast gibi hücreler üzerinde gösterebilirler ve bu hedef hücreler de yine TGF- β salgılayabilirler. Böylece TGF- β yalnızca yumuşak doku ve kemik rejenerasyonunu başlatmakla kalmayıp remodelling aşamaları ve kemik grefti olgunlaşmasında da etkili olur.^{60,64,73} TGF- β ailesinin bir üyesi olan BMP (Bone Morphogenetic Protein) ler bugünlerde kemik iyileşmesinde en popüler araştırma konusudur ve sınırlı klinik kullanımları da tariflenmiştir.⁴⁴

TGF- β kemik iyileşmesinde kallus formasyonunu ve hacmini artırır, diğer anjiogenik ve osteogenik faktörlerin salınımını artırır, matriks sentezini artırır, eksojen uygulamaları sonrası kritik büyüklükteki defektlerde iyileşme gözlenmiştir. ‘Bone Morphogenetic Protein’ ise mezenkimal ve osteoblastlar için mitojendir, kallus oluşumu artırır, kemik iyileşmesini hızlandırır.^{11,14,51,59,66}

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF): fibroblast büyüme faktörleri mitojenik polipeptid ailesidirler. İçlerinde en çok incelenmiş olan altgrup bFGF; fibroblastlar, endotel hücreleri, osteoblastlar, kondrositler ve keratinositler üzerinde mitozu arttırıcı etki gösterir, anjiogenezis ve endotelial hücre göçünde rol oynar, TGF- β ’nın dağılımını arttırıcı etki yapar. Vasküler

endotelyal büyüme faktörü ve TNF- α ile birlikte olduğunda maksimum anjiyogenik etkisini gösterir. Yara iyileşmesinde özellikle keratinositlerin proliferasyon ve göçüne neden olur. Anjiogenezin başlaması için gerekli olan fibroblastlardan kollajenaz üretimi ve kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar.⁷² Granülasyon dokusu oluşumunu başlatmaya da yardımcı olur.^{40,69}

Kemik iyileşmesi için düşünüldüğünde, kırık bölgesinde anjiyogenezi arttırarak, osteoblast diferansiasyon ve proliferasyonunu doz bağımlı uyararak, mekanik dayanıklılığı arttırarak yardımcı olur.^{14,51,66}

İnsülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I): İnsülin benzeri büyüme faktörü-I, fibroblast, kondrosit, keratinosit, osteoblast, mezangial eritroid progenitör hücreler gibi pek çok hücre tipinin çoğalmasını arttırarak büyümeyi uyarır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü ile birlikte olduğunda daha iyi bir etki gösterir. Dolaşımdaki IGF-1'in protein sentezini, periferel glukoz alımını, glikojen sentezini, sinir sağkalımını, miyelin sentezini, kemik oluşumunu arttıran anabolik etkileri arttırdığı, kaslardaki protein yıkımı gibi katabolik etkileri azalttığı bilinmektedir.^{59,71} Aşıl tendonunda travma oluşturarak yapılan çalışmada düzeyinin arttığı görülüp tendon iyileşmesinde muhtemelen mitozu arttırarak etki gösterdiği düşünülmüştür. Egzojen olarak verilen IGF-1'in DNA, kollajen ve proteoglikanı arttırdığı gösterilmiştir.^{5,44,45} İnsülin benzeri büyüme faktörünün proteoglikan sentez ve yıkımını dengeleyerek kırıkta homeostazında önemli rol oynadığı öne sürülmüş ve atlarda yapılan kırıkta defekti modelinde fibrin pıhtıya IGF ilave edilerek bu defekte uygulandığında onarılan dokunun kalite ve miktarını arttırdığı gözlenmiştir.⁸⁴

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF): Vasküler endotelyal büyüme faktörünün, tümör hücrelerinden salgılanan, damar geçirgenliğini arttırarak asit oluşumuna katkıda

bulunan bir madde olduğu düşünölmüş ve bu nedenle 1983'te "vascular permeability factor" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar doğrultusunda VEGF olarak ismi değıştirilmiş, en kuvvetli anjiogenezis uyarıcısıdır.^{78,28} Kendi salınımından sonra diğer proteoglikan-bağılı salınımı olan büyüme faktörlerinin de salınımını uyarır (Örn:bFGF). Anjiogenezin ilk basamaklarında vasküler bazal membranların yıkılması için gerekli olan kollajenaz ve jelatinazın indüksiyonuna, daha sonra yine anjiogenez için gerekli olan α integrinlerin ekspresyonuna neden olarak iyileşen dokuda anjiogenez başlatır. Doğrudan mitotik etkisinin yanında, VEGF bir taraftan kısmen nitrik oksit sentezini uyarak vazodilatasyona neden olurken, diğer taraftan hücre göçünü ve apoptozu inhibe eder.¹⁰⁹ Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast, inflamatuvar ve endotelial hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir ve vasküler geçirgenliği artırır.^{12,32,45,106,107,108}

Deneysel modellerde ekstremitte iskemisinde egzojen verilen VEGF'in anjiogenez başlatarak vasküler kaynağı, bazı çalışmalarda da vasküler yaralanmanın ardından uygulandığında yeniden endotel oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir.⁴⁴ Corral ve arkadaşları tarafından topikal olarak yaralara uygulandığında olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Petersen ve arkadaşları da 2002'de tendon anjiogenezinin ana belirleyicisinin VEGF olduğunu bulmuşlardır.⁷⁸

VEGF kemik iyileşmesi bölgesine osteoblastlar, osteoklastlar ve mezenkimal hücrelerden yoğun olarak salınır. Kırık bölgesinde yeni damar oluşumu artırarak kemik iyileşmesine yardımcı olur.^{14,51,66}

Epidermal büyüme faktörü (EGF): Epidermal büyüme faktörü, yara iyileşmesinin erken safhalarında fibronektin gibi proteinlerin üretimini ve epitel hücre göçünü uyarır. Kollajen

üretimini arttırmadan fibroblastların çoğalmasını sağladığı düşünülmüş olmasına rağmen Brown ve arkadaşları sıçanlarda insizyon bölgelerine biyosentetik EGF uygulamalarının ardından yaptıkları elektron mikroskopik incelemede artmış kollajen oluşumu göstermişler ve 7-14 gün sonra yara gerim kuvvetinin %200 arttığını bildirmişlerdir.¹⁹ İn vivo olarak anjiogenezi uyardığı bilinen EGF ile yapılan klinik çalışmalarda gümüş sülfadiazin içine koyularak kronik yaralara uygulandığında epitelizasyonu arttırdığı saptanmıştır.^{20,28}

Büyüme faktörlerine ilave olarak α -granüllerinden trombin, tromboksan A₂ ve ADP salınımı olur. Bu maddeler oluşan pıhtıya daha çok trombositin gelmesine ve hemostatik cevabın artmasına neden olurlar.³⁹

Trombosit Zengin Plazma (TZP, büyüme faktörlerinden zengin plazma, trombosit jel) Trombositlerin çeşitli yöntemlerle, antikoagülan ilave edilmiş venöz kandan santrifüj edilerek ayrıştırılıp, fibrinojen de içeren az miktar plazma içerisinde süspansiyon haline getirilmesiyle TZP elde edilir. 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. Hazırlanma tekniğinde temel olarak minimum 45-60 cc kan, antikoagülan solüsyon içine alındıktan sonra seri santrifüj işlemlerinden geçirilip, kırmızı kan hücreleri, fibrin yapıştırıcı (trombosit fakir plazma) ve trombosit konsantresi (TZP) olarak ayrıştırılabilmektedir. Trombosit sayısı kandaki normal değerinin 3-8 katına kadar yoğunlaştırılabilir.^{3,8,23,64} Trombin ve kalsiyum ilave edilerek TZP aktif hale getirilir; pıhtılaşarak jel halini alan bu maddedeki trombositlerin α - granüllerindeki büyüme hormonları ortama salınır.^{8,32,58,62} Trombosit zengin plazma ile fibrin yapıştırıcının farkı TZP’de trombosit konsantrasyonunun fazla, fibrinojen konsantrasyonunun az

olmasıdır.^{8,18,19,20,23,32,39,44,58,64,107} Daha az fibrinojen içerdiği için çok katı bir fibrin pıhtı oluşmadığı; bu nedenle yara iyileşmesini engellemeyip, bilakis içindeki büyüme faktörleri sayesinde bu olayı hızlandırdığı düşünülmüştür.^{3,4,8,36,62}

Yeterli deneysel çalışmaları yapılmadan önce kullanıma giren TZP'nin genelde kontrol gruplarının olmaması deneysel çalışmalara olan ihtiyacı beraberinde getirmiştir. Yapılmış az sayıdaki deneysel çalışmalardan olan Partsafas'ın çalışmasında FY veya TZP'nin serbest flep modelinde olumlu ya da olumsuz etkisi saptanamamıştır.⁷⁷

Şimdiye kadar yara bölgelerine TZP uygulayarak yapılan çalışmalarda amaç, yara iyileşmesinin başlatıcıları olan büyüme faktörlerini konsantre şekilde yara bölgesine vererek iyileşme sürecini hızlandırmaktır. Çünkü klinik olarak ciddi birer problem olan kronik yaralarda, bu faktörlerin miktarlarının azaldığı gösterilmiştir. Bu durum, üretimde veya salınımında azalma, yıkımda artma ya da hepsine birden bağlı olabilir. Venöz ülserler, diyabetik yaralar vb. kronik yaralarda TZP'nin faydalı olduğu birçok kez bildirilmiştir.^{26,53,54,63,68,97} Yara iyileşmesini arttıran proteinlerin yanında bakterisidal proteinleri de içermesi, enfeksiyonların kontrol altına alınmasına ve hastanada yatış sürelerinin kısalmasına, ağrı ve şişlikte azalmaya neden olmuştur.^{97,98} Krupski ve arkadaşları ise plasebo ve TZP ile yaptıkları kontrollü çalışmada yukarıdaki araştırmacıların tam tersi sonuçlar elde etmişlerdir.⁵⁵

Marx tek başına kemik grefti uygulaması ile kemik grefti + TZP uygulamasını karşılaştırdığında, ikili uygulamada kemik dansitesinde, kemik biçimlenmesinin hız ve derecesinde artış saptamış ve bunun PDGF ve TGF- β sayesinde olduğunu belirtmiştir.^{37,64,65,101} Anitua da diş çekimi sonrası oluşan boşluğa TZP uygulamış ve hem epitelizasyon hem de kemik dansitesinde artış rapor etmiştir.⁵ TZP invitro ortamda fetal osteoblast benzeri hücrelerin rejenerasyon ve fonksiyonelliğini arttırıp, mezenkimal kök

hücrelerin ortama göçünü sağlamaktadır.⁴⁸ Aghaloo ve Butterfield ise kemik greftleriyle yaptıkları deneysel hayvan çalışmalarında TZP'nin üstünlüğünü gösterememişlerdir.^{2,32} Fakat oral ve maksillofasiyal cerrahide, osteointegrasyon için kullanılan otojen greftlere kemik doku ilerlemesini hızlandığını bildiren araştırmacılar mevcuttur ve maksiller antroplastide kemik greftleriyle birlikte kullanımında başarılı sonuçlar bildirilmiştir.

Kemikleşmeye ve yara iyileşmesine katkıları nedeniyle lumbar spinal füzyon hastalarında otogreft ve hidroksiapatitle birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar yanında olumsuz sonuçlar da rapor edilmiştir.^{5,23}

Kawase ve Okuda'nın 2003 yılında TZP'nin periodontal ligamentte kollajen sentezini ve invitro osteoblastik aktiviteyi arttırdığını göstermelerinden sonra Huang ve arkadaşları gingival çekilmelerde koronal ilerletme flebine PRP uygulaması yapmışlar fakat istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme artışı saptayamamışlardır.^{50,74}

Siebrecht ile birlikte TZP'nin poröz hidroksiapatit içine kemik ilerlemesini ve kemik oluşumunu arttırdığını gösteren Aspenberg, 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.⁸³

Oftalmolojik cerrahide maküler deliklerin kapatılmasında başarılı sonuçlar bildirilmiş³⁴, tavşanlarda retinal yaralanmalarda hücrel cevabı arttırdığı gösterilmiştir.⁵ Fakat TZP'nin maküler deliklerin tamirinde kullanıldığı başka bir çalışmada, Paques, uzun dönemde iyileşmiş olan deliklerin tekrar açıldığını rapor etmiştir.¹¹⁰

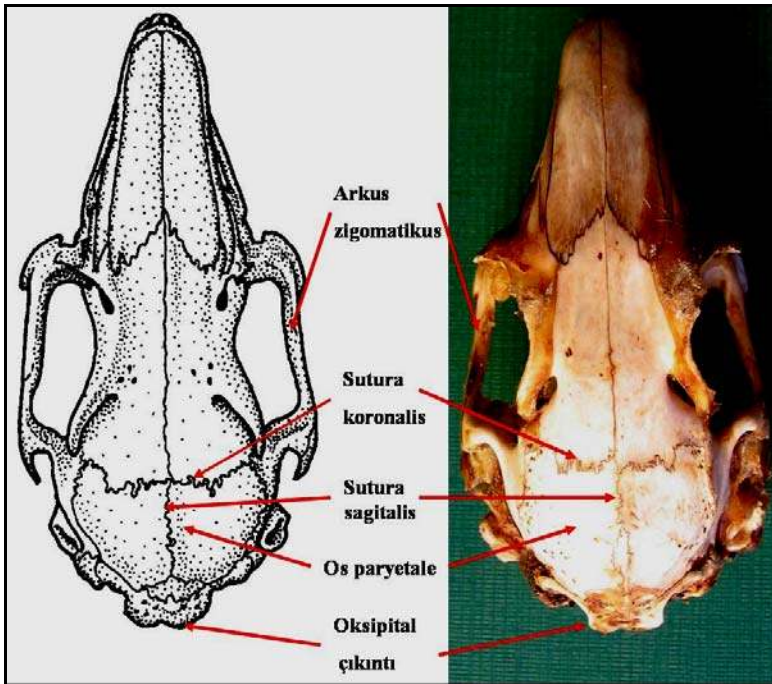
Hem TZP hem de fibrin yapıştırıcı yüz germe, boyun germe, meme küçültme, karın germe gibi estetik ameliyatlarda kullanılmış ve operasyon süresinde kısalma, dren koyma

ihtiyacında, baskılı pansuman kullanımında, seroma oluşumunda, hastanın postoperatif şişlik ve ağrı yakınmalarında azalma rapor edilmiştir.^{10,62}

Teknolojik ilerlemeler sayesinde trombositleri de steril şartlar altında izole ve konsantre etmek mümkündür. Çelişkili sonuçlar yeterli kontrollü çalışmalarla aydınlatıldığı takdirde, otolog elde edildiği için immün reaksiyon ve hastalık bulaştırma riski olmaması, herhangi bir yan etki oluşmaması, gerektiğinde hastadan tekrar tekrar elde edilebilmesi kullanımının yaygınlaşmasını sağlayacak en önemli faktörlerdendir.⁶²

TAVŞAN KRANİYUM ANATOMİSİ

Tavşanların başları dar ve uzundur. Kafaya göre oldukça geniş ve derin orbita çukurluğu ve son derece güçlü zigomatik ark görülür. Protuberantia oksipitalis eksterna oldukça belirgindir. Frontal kemik ön tarafta kavum kranii'nin tavanını yapar ve belirgin bir prosesus supraorbitalis'e sahiptir. Parietal kemik ise arka tarafta kavum kranii'nin tavanını yapar ve kafanın genel yapısına uygun olarak dar ve uzun bir yapısı vardır (Şekil 10).



Şekil 10: Tavşan kraniyumu

KRİTİK BOYUTTA KEMİK DEFECTİ

Son yıllarda kemik kırıklarının veya defektlerinin iyileşmesinde etkin olduğu ve iyileşmeyi hızlandırdığı düşünülen kemik greftleri, kemik benzeri ürünler, hastadan elde edilen büyüme faktörü içeren kan ürünleri veya rekombinant büyüme faktörleri gibi pek çok malzeme cerrahi kullanımdadır ve bu ürünlere her yıl yenileri eklenerek, liste sürekli uzamaktadır. Her yeni maddenin etkinliğinin diğerleriyle karşılaştırılabilmesi için standart bir hayvan modeline ihtiyaç vardır. Çünkü kemik defektinde gerçekleşen kemik iyileşmesi, defektin büyüklüğüne ve hayvanın türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu amaçla literatürde farklı hayvan modellerinde “kritik boyutta kemik defekti” olarak adlandırılan, dairesel, tam kat ve hayvanın yaşamı boyunca kendiliğinden kapanma şansı olmayan en küçük boyutta kemik defektleri tariflenmiştir. Farklı kaynaklarda değişik rakamlar verilse de, kraniumda kritik boyutta kemik defekti çapı sıçan için 8 mm, tavşan için 15 mm, köpek ve maymun için 20 mm olarak genel geçerlilik kazanmıştır.^{7,15,29,31,37,43,85} Bu defektlerde iyileşme kemikleşmeden ziyade bağ dokusuyla olur. Bu nedenle osteoindüktif etkinin değerlendirilmesinde etkin bir model olarak kabul edilir.

Kraniyumda embriyolojik ve morfolojik olarak intramembranöz kemikleşme izlendiğinden, aynı özelliklere sahip maksillofasiyal kemik iyileşmesine de iyi bir modeldir. Kanlanmasında arteria meningia media, duradan ve dış yüzeyden gelen arterioller etkindir. Farklı türde hayvanların kraniyumlarında kritik büyüklükte kemik defektleri tariflense de, köpek ve maymunun bakım zorluğu, sıçan ve kobayların yeterli büyüklükte kraniyumları olmaması nedeniyle tavşan en uygun denektir. Uygun büyüklükte tavşanda çalışılırsa, her iki paryetal kemiğe birer kritik boyutta kemik defekti oluşturmak mümkündür. Bu da denek sayısını azaltacak önemli bir özelliktir (**Şekil 11**).



Şekil 11: Tavşan kraniyumunda oluşturulan bilateral tam kat, kritik boyutta kemik defektinin görünümü

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın 17.05.2005 tarih ve B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/57-6889 sayılı izni ile, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 3500-4000 gram arasında değişen, 34 adet Yeni Zellanda tipi erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar uygun kafeslerde, $22\pm 2^{\circ}$ C sıcaklıkta ve 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı.

TZP hazırlamak için gerekli olan kan, % 10'luk ketamin HCl (50 mg/kg-Alfamine®-im) ve % 2'lik ksilazin HCl (4 mg/kg-Rompun®-im) anestezisi altındaki 2 tavşandan intrakardiak kanülizasyon ile tüm vücut kanları alınarak elde edildi.

Tüm cerrahi işlemler % 10'luk ketamin HCl (50 mg/kg-Alfamine®-im) ve ksilazin HCl (2,5 mg/kg-Rompun®-im) anestezisi altında, aynı cerrah tarafından steril koşullarda gerçekleştirildi. Tavşanlar ameliyat sonrasında, deney hayvanları bakım ünitesinde kendilerine ayrılmış olan odaya alınıp ve ikili gruplar halinde bölmelere konularak, uzman veteriner kontrolünde izlenmişlerdir. Günlük bakımları sırasında insizyonlarına povidone iyot ile pansuman yapıldı. Çalışmanın ilk haftasında cerrahi sahada enfeksiyon nedeniyle 2, ölüm nedeniyle 3 olmak üzere, toplam 5 tavşan çalışma dışı bırakıldı. Bu deneklerin yerine aynı işlemlerin gerçekleştirildiği yeni tavşanlar konularak grupların planlanan sayıları korundu.

ÇALIŞMA GRUPLARI

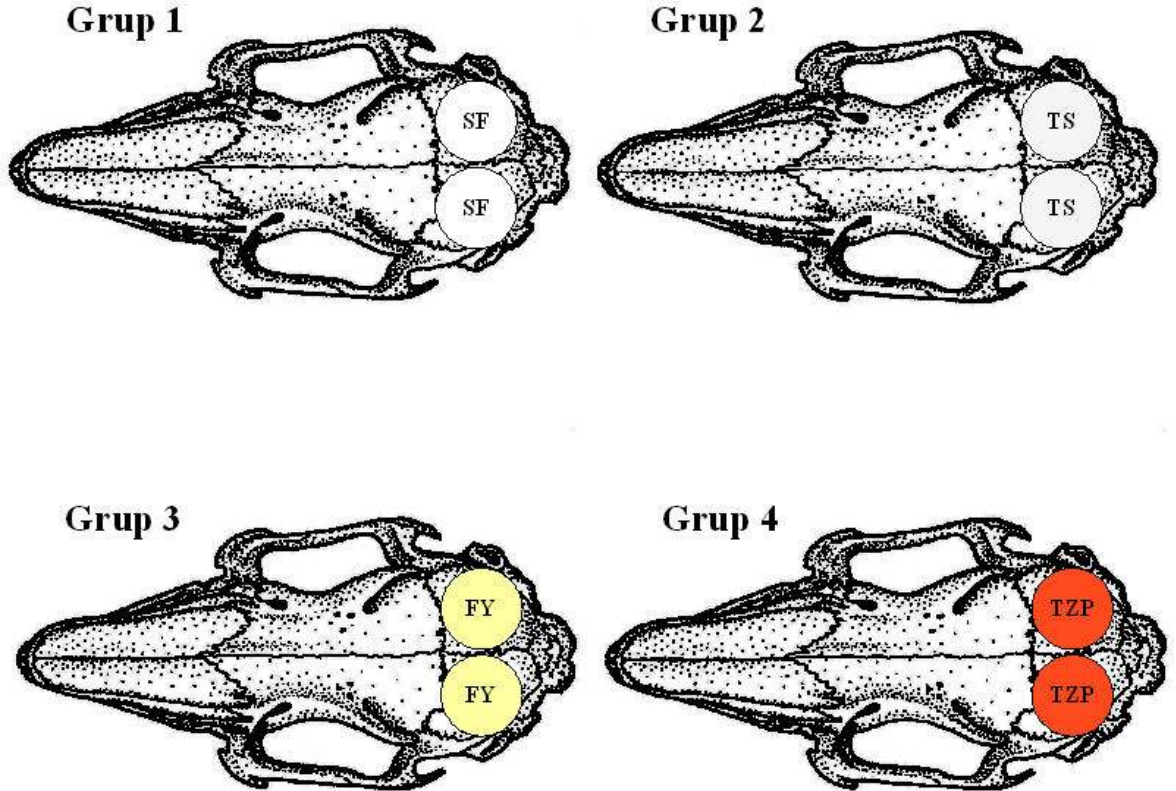
Cerrahi işlemler sırasında 32 adet tavşanda, bilateral paryetal kemikte, toplam 64 tam kat kritik boyutta kemik defekti oluşturuldu. Her iki hemikraniyumdaki defekte de, maddenin lokal ya da sistemik etkileri olabileceği düşünülüp, aynı madde uygulandı. Oluşturulan 4 grubun her biri 8 tavşanda oluşturulan 16 defektten oluşuyordu. Her gruptaki deneklerin yarısı 1. ayda, diğer yarısı da 4. ayda sakrifiye edilerek, değerlendirmeye alındı (Şekil 12).

Grup 1 (n=8): Kontrol grubu (SF)

Grup 2 (n=8): Trombin solüsyon grubu (TS)

Grup 3 (n=8): Fibrin yapıştırıcı (Trombosit fakir plazma) grubu (FY)

Grup 4 (n=8): Trombosit zengin plazma grubu (TZP)



Şekil 12: Çalışma gruplarının şematik gösterimi

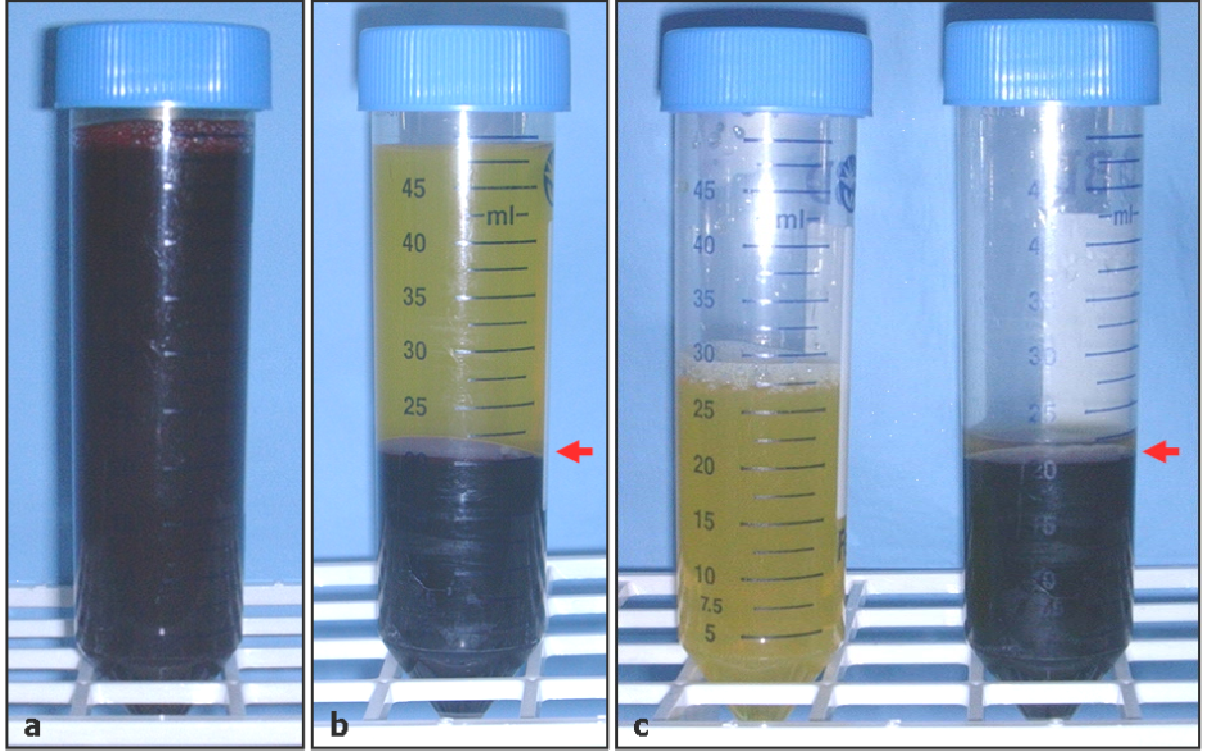
TROMBOSİT ZENGİN PLAZMANIN HAZIRLANMASI

Trombositlerin diğer kan elemanlarından ayrılıp bir miktar plazma ilave edilerek TZP haline getirilebilmesi için gerekli olan kan, donör olarak seçilen 2 adet tavşandan, %10'luk ketamin HCl (50 mg/kg-Alfamine®-im) ve %2'lik ksilazin HCl (4 mg/kg-Rompun®-im) anestezisi altında, intrakardiyak kanülizasyon ile tüm vücut kanları alınarak elde edildi. Bu yöntemle her tavşandan 65 ml olmak üzere toplam 130 ml kan alındı.

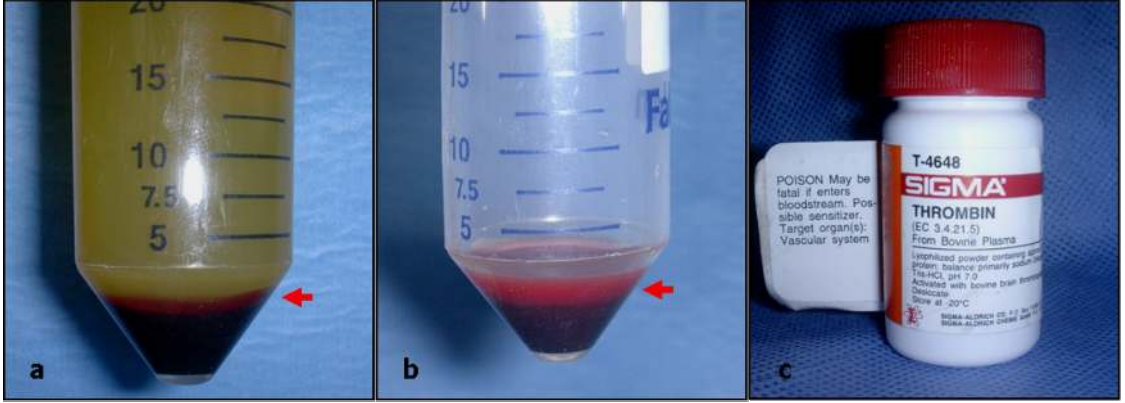
Elde edilen kan, pıhtılaşmasını engellemek için sitrat-fosfat-dekstrozu (CPD) solüsyonu ile, 5 ml kan/1 ml CPD oranında karıştırılarak santrifüj işlemi için uygun olan dört plastik tüp içerisinde toplandı. CPD solüsyonu kan merkezlerindeki üçlü kan torbaları (Baxter Healthcare Corp, USA) içerisinde elde edildi.

Toplanan kanın 22°C sıcaklıkta ve 200g devirde santrifüj cihazında (Heraeus Cryofuge 6000i, Kendo Laboratory Products) 20 dakika boyunca santrifüje tabi tutulmasının ardından eritrositlerin tüpün en alt kısmında toplanıp plazma, trombosit vb. kan elemanlarından ayrıldığı görüldü. Üstte toplanan açık sarı renkli plazma ile en alt tabakada olan eritrositlerin arasında trombosit ve beyaz küreler tarafından oluşturulan ince bir ara tabaka (buffy coat) izlendi (**Şekil 13**). Üzerindeki plazmayla beraber bu ara tabaka ayrı bir tüpe alındı. Plazma ve trombositleri içeren bu tüp ikinci kez 480g devirde 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonunda önceki santrifüj sayesinde ayrıştırılan trombosit ve plazmaya karışan eritrositlerin dibine çöktüğü, trombositlerin eritrositlerin üzerinde yine beyaz ince bir tabaka oluşturduğu, trombositten fakir plazmanın en üstte toplandığı görüldü (**Şekil 14**). Oluşan trombosit konsantresi ve trombosit fakir plazma (fibrin yapıştırıcı= FY) ayrıştırılıp farklı tüplere alındı. Bu arada her iki tavşan için tam kan sayımları yapıldı, trombosit sayıları 213 K/ μ L ve 252 K/ μ L olarak bulundu. Trombosit konsantresi 900 K/ μ L olacak şekilde FY ile

seyreltildi. Böylelikle hazırlanan TZP'de trombosit oranı normal kana göre 3,8 kat konsantre edilmiş oldu.



Şekil 13: Trombosit zengin plazmanın hazırlanması. **a)** Donör sıçanlardan elde edilen ve antikoagülan solüsyon ilave edilen kan; **b)** İlk santrifüj sonrası plazma ve kırmızı kan hücreleri arasında trombositler ve lökositlerin oluşturduğu ince tabaka (işaretli alan); **c)** Plazmanın uzaklaştırılmasından sonra ara tabakanın görünümü.



Şekil 14: Trombosit zengin plazma ve fibrin yapıştırıcının hazırlanması. **a)** İkinci santrifüj işlemi sonrasında iki tabaka arasında yer alan trombosit konsantresi (ok) **b)** FY'nın uzaklaştırılmasından sonra eritrositler ve trombosit konsantresi (ok) **c)** TZP'nin aktive edilmesi için kullanılan sığır kaynaklı trombin preparatı.

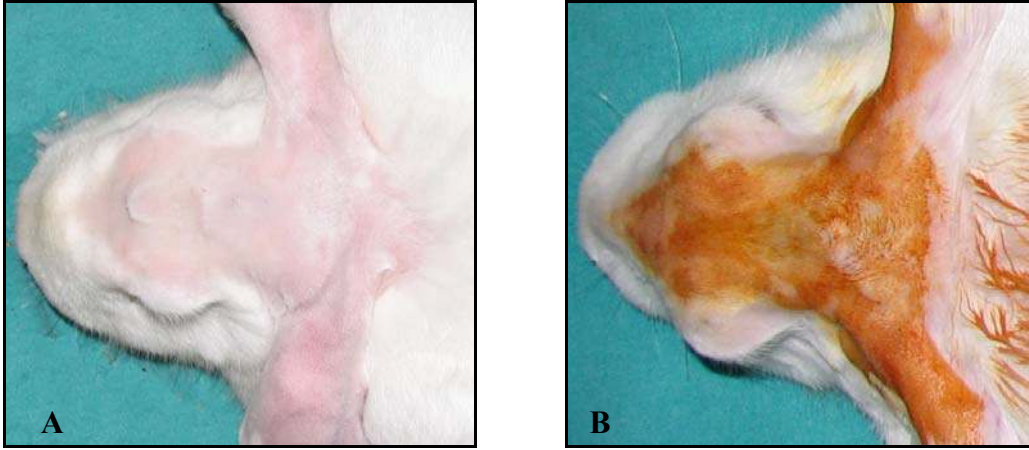
Elde edilen trombosit zengin plazma, içerisinde lökositleri de barındırdığından ve çalışma kapsamında her bir deneğe otolog ürün kullanımı mümkün olmadığından graft versus host reaksiyonunu azaltmak amacıyla ışınlama işlemine alındı ve 25 Gy ışınlanarak lenfosit inaktivasyonu sağlandı.

Trombosit zengin plazma, sığır kaynaklı trombin preparatı (Thrombin, Sigma-Aldrich, Almanya) ile aktive edildi. 1000 ünite/ml oranında trombin içeren toz ürün, 10 ml %10'luk kalsiyum klorür ile karıştırılarak 100 ünite/ml oranında trombin solüsyonu elde edildi.

Çalışma sırasında TZP'nin 1 ml'sine 10 ünite trombin solüsyonu ilave edilerek aktif hale geçmesi ve ortama büyüme faktörlerinin salınımı sağlandı.

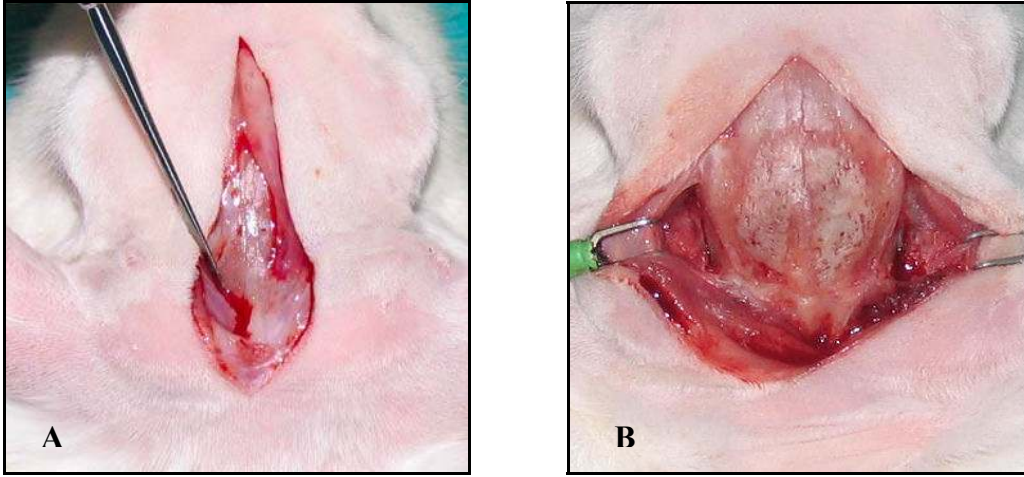
CERRAHİ TEKNİK

Deneklere, %2'lik Ksilazin hidroklorür (Rompun)[®] 4 mg/kg İM ve %10'luk Ketamin hidroklorid (Alfamine[®]) 50 mg/kg İM ile anestezi verildi. Deneklerin tamamına proflaksi amacıyla, ameliyattan 1 saat önce ve 12 saat sonra 50 mg/kg seftriakson İM enjeksiyonu yapıldı. Tüm ameliyat sahası, her iki hemikraniyumu içine alacak şekilde kulaklara kadar traş edildi. Povidone iyodin (%10) ile cerrahi alan temizliği sonrasında uygun steril alan örtümü yapıldı (**Şekil 15**).

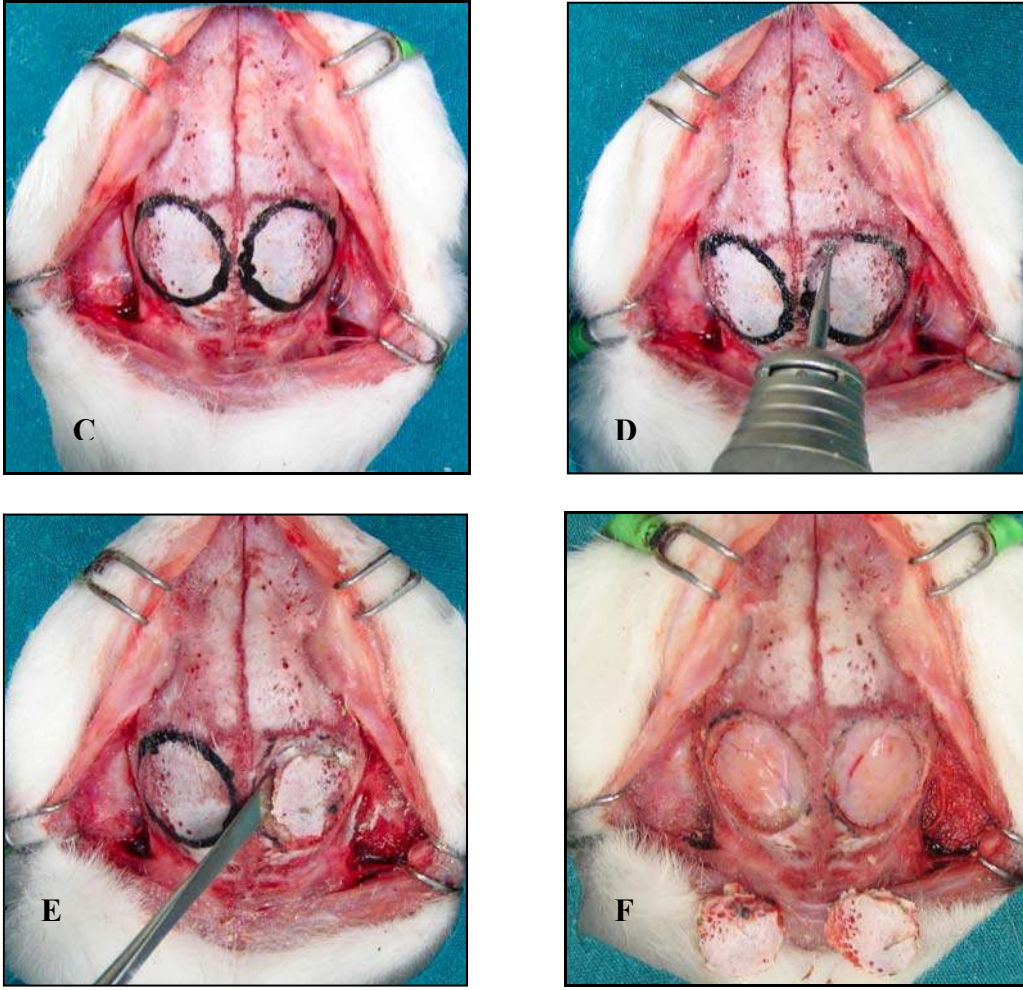


Şekil 15: Cerrahiye hazırlık (A) Ameliyat sahası, her iki hemikraniyumu içine alacak şekilde kulaklara kadar traş edildi. (B) Povidone iyodin (%10) ile cerrahi alan temizliği sonrasında uygun steril alan örtümü yapıldı.

15 numara bistüri ile kraniyal yumuşak doku orta hat sagital insizyon ile periost dahil olacak şekilde kesildi. Yumuşak doku subperiostal plandan her iki yana devrildi ve her iki hemikraniyum tamamen görülecek şekilde ekartörler yerleştirilip, ameliyat sahası hazırlandı. Her iki paryetal kemikte orta hattı geçmeyecek şekilde, şablon yardımı ile 1,5 cm çaplı birer daire çizildi. Çizime uygun olarak 2 mm çaplı freze uçları kullanılarak, kraniyumda tam kat kritik büyüklükte kemik defektleri oluşturuldu. İşlem sırasında duramater ve orta hatta sagital sinüs hasarı oluşturmamaya özellikle dikkat edildi. Cerrahi alanı kemik toz ve artıklarından temizlemek amacıyla saha serum fizyolojik ile irriga edildi (**Şekil 16**).



Şekil 16: Kritik boyutta kemik defektinin hazırlanışı (**A**) Periosteum dahil orta hat insizyonu yapıp, perikondrium elevatörü yardımıyla subperiosteal disseksiyon yapıldı. (**B**) Yumuşak doku subperiosteal plandan her iki yana devrildi ve her iki hemikraniyum tamamen görülecek şekilde ekartörler yerleştirilip, ameliyat sahası hazırlandı.

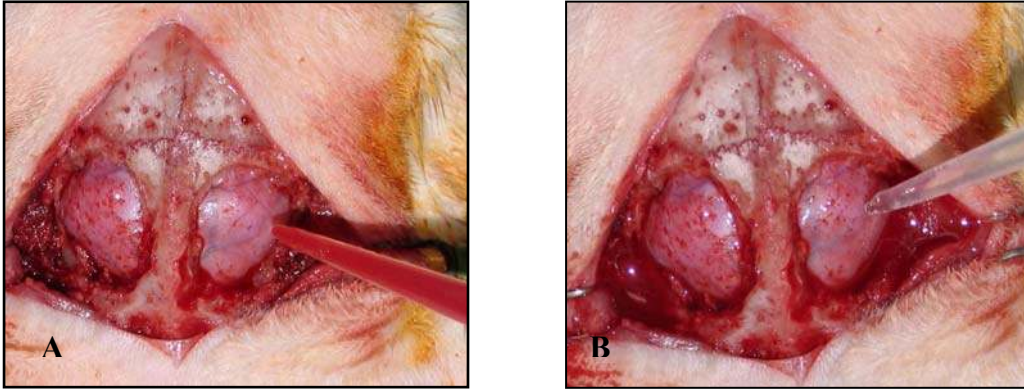


Şekil 16'nın devamı: Kritik boyutta kemik defektinin hazırlanışı (C) Her iki paryetal kemikte orta hattı geçmeyecek şekilde, şablon yardımı ile 1,5 cm çaplı birer daire çizildi (D, E, F) Çizime uygun olarak 2 mm çaplı freze uçları ve perikondrium elevatörü kullanılarak, kraniyumda tam kat kritik boyutta kemik defektleri oluşturuldu.

Daha sonra oluşturulan her bir defekte aşağıda belirtilen maddeler, belirtilen oranlarda uygulandı. (Şekil 17)

Grup 1 (n=8): Kontrol grubu →	0,5 ml serum fizyolojik
Grup 2 (n=8): Trombin solüsyon grubu →	0,5 ml serum fizyolojik + 0,05 ml trombin solüsyonu
Grup 3 (n=8): Fibrin yapıştırıcı grubu →	0,5 ml trombosit fakir plazma + 0,05 ml trombin solüsyonu
Grup 4 (n=8): Trombosit zengin plazma grubu →	0,5 ml trombosit zengin plazma + 0,05 ml trombin solüsyonu

Trombin solüsyonunun hacim olarak çok küçük miktarlarda uygulanması gerektiğinden ve standardizasyonun tam sağlanabilmesi amacıyla tüm maddeler mikropipet yardımıyla uygulandı. Her denek için kesiler kapanmadan önce, trombosit zengin plazma ve fibrin yapıştırıcının defekt dışına taşmadan pıhtılaşabilmesi için, 5 dakika süre ile beklenildi. Daha sonra periost ve cilt 4-0 “polyglycolic acid” içerikli eriyen dikiş ipi (Vicryl - Johnson and Johnson) ile iki tabaka halinde kapatıldı (Şekil 18).



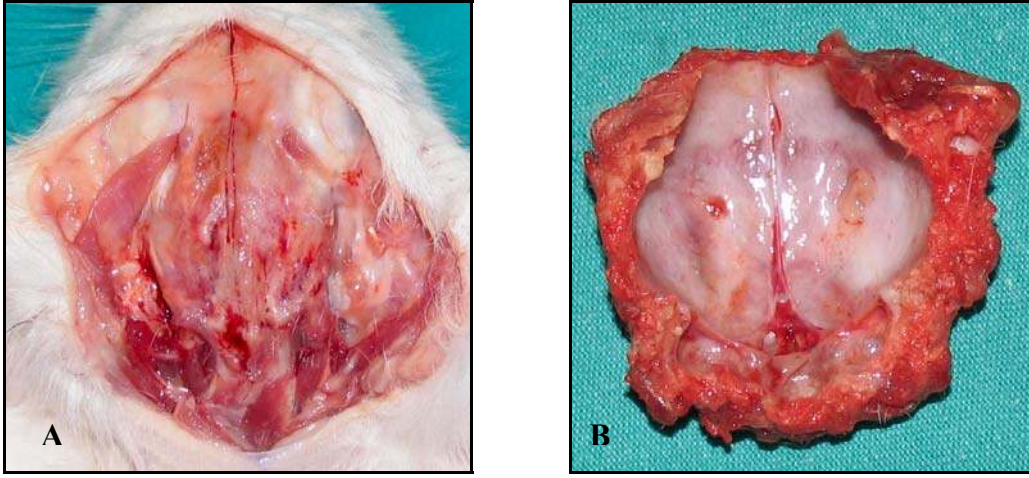
Şekil 17: Oluşturulan kemik defektine mikropipet yardımıyla trombosit zengin plazma uygulanması. **(A)** 0,5 ml trombosit zengin plazma uygulanması **(B)** takiben 0,05 ml trombin solüsyonu uygulanması (Her denek trombosit zengin plazma ve fibrin yapıştırıcının defekt dışına taşmadan pıhtılaşabilmesi için, 5 dakika süre ile beklenildi.)



Şekil 18: Periost ve cilt 4-0 “polyglycolic acid” içerikli eriyen dikiş ipi ile iki tabaka halinde kapatıldı.

Denekler ayıldıktan sonra ikişerli gruplar halinde kafeslere alındı ve standart bakım koşulları sağlandı. Çalışmanın ilk haftasında kontrol grubundan 1, trombin solusyon grubundan 2, fibrin yapıştırıcı grubundan 2 olmak üzere toplam 5 denek çalışma dışı bırakıldı. Bunlardan 2 denek cerrahi sahada enfeksiyon, 3 denek de ölüm nedeniyle çalışma dışı kaldı. Bu deneklerin yerine aynı işlemlerin gerçekleştirildiği yeni tavşanlar konularak grupların planlanan sayıları korundu.

Her gruptaki deneklerin yarısı (4'er denek) 4. hafta sonunda, diğer yarısı da 16. hafta sonunda %2'lik Ksilazin hidroklorür (Rompun)[®] 30 mg/kg İM ve %10'luk Ketamin hidroklorid (Alfamine)[®] 70 mg/kg İM enjekte edilerek sakrifiye edildi. Daha sonra eski orta hat sagittal insizyon skarından girilip, kavum kranii'nin tavanını oluşturan kemik yapı her iki defekti geniş sınırla içine alacak şekilde tek parça olarak çıkarıldı (**Şekil 19**).



Şekil 19: Her gruptaki deneklerin yarısı (4'er denek) 4. hafta sonunda, diğer yarısı da 16. hafta sonunda sakrifiye edildi. **(A)** Daha sonra eski orta hat sagittal insizyon skarından girilip, **(B)** kavum kranii'nin tavanını oluşturan kemik yapı her iki defekti geniş sınırla içine alacak şekilde tek parça olarak çıkarıldı.

DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

A. GENEL DEĞERLENDİRME

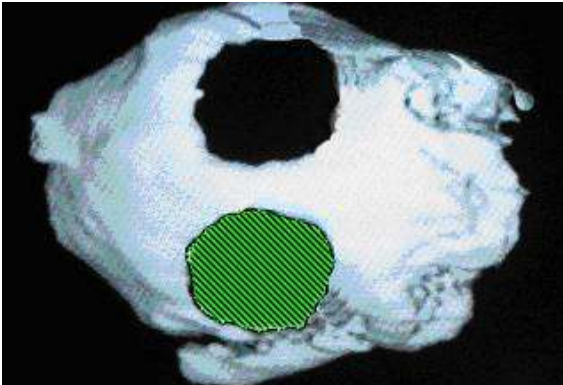
Çalışmaya dahil edilen deneklerin, deney süresince genel sağlık durumları, operasyona bağlı nörolojik sekelleri ve yara bölgesinde izlenen değişiklikler kaydedildi.

B. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME

Defekt alanı değerlendirme

Alan değerlendirme her denek için ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ve gruptaki deneklerin yarısı için 4. hafta sonunda, diğer yarısı için de 16. hafta sonunda bilgisayarlı tomografi (GE CTI, General Electric Inc, ABD) yardımı ile gerçekleştirildi. Her defekt için 1 mm'lik dilimler şeklinde elde edilen iki boyutlu koronal kesitler, üç boyutlu görüntü elde etmek için kullanıldı. Alan ölçümleri aynı cihazda, üç boyutlu görüntüler üzerinde, mm² cinsinden sonuç elde edilecek şekilde, grup hakkında bilgilendirilmeyen radyolog tarafından yapıldı. Ameliyattan hemen sonra (0. hafta) oluşturulan defektlerin alanları açısından gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığı, 4. ve 16. haftalarda defekt alanları açısından gruplar arasında fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

Ayrıca her denek için ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen alana göre 4. ve 16. haftalardaki alanların yüzde cinsinden oranları kaydedildi. Dördüncü ve 16. hafta için gruplar arasında bu yüzde oranlar açısından istatistiksel fark olup olmadığı değerlendirildi.

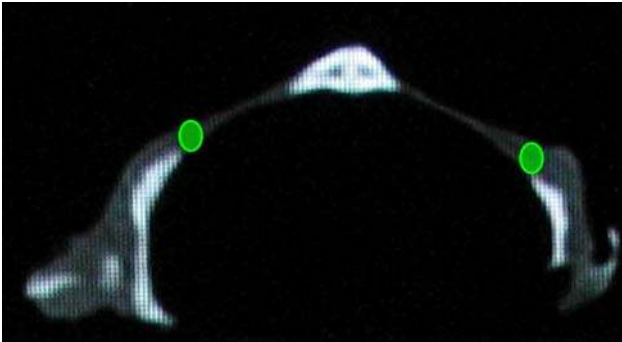


Şekil 20: Kemik defekt alanları üç boyutlu bilgisayarlı tomografi görüntüleri üzerinde, bilgisayar ortamında ölçüldü.

Kemik yoğunluğu değerlendirme

Kemik iyileşme kalitesini gösteren kriterlerden biri olan kalsifikasyonu, diğer bir deyişle yeni oluşan kemik yoğunluğunu radyolojik görüntülerde, bilgisayar ortamında değerlendirmek mümkün olmaktadır. Bu amaçla yapılan ölçümler, bilgisayarlı tomografi için Hounsfield ünitesi (HU) olarak tespit edilmektedir. Hava -1000 HU, su 0 HU ve kemik 1000 HU olarak kabul edilmekte, ölçülen alanın yoğunluğu ise bu değerlere dayanarak nisbi bir değer olarak verilmektedir.

Yoğunluk değerlendirmesi, kemik iyileşmesinin evreleri göz önünde bulundurularak, sadece 16. hafta tomografik görüntülerinde değerlendirildi. Her defekt için kemik iyileşmesinin iyi görüntülendiği 5 koronal kesit seçildi. Grup hakkında bilgilendirilmeyen radyolog tarafından, her kesitte yer alan iki kenardan birer ölçüm yapıldı. Her bir defekt için elde edilen toplam 5 değerin medianı, o defektte oluşan yeni kemiğin HU cinsinden yoğunluğu olarak kabul edildi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 21: Kemik yoğunluğu iki boyutlu koronal kesitlerde, yeni kemik oluşum bölgesinden ölçüldü.

C. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Dördüncü ve 16. haftalarda deneklerin sakrifiye edilmesinden sonra alınan tek parça kemik örnekleri tespit amacıyla, %10'luk formaldehit solusyonunda, oda sıcaklığında 72 saat bekletildi. Tespit sonrasında, demineralizasyon amacıyla %10'luk EDTA (Etilen diamin-tetra asetik asit)'lı dekalsifikasyon solusyonunda 2 ay süreyle bekletildi. Bu sürede günlük olarak solusyonlar yenilendi.

EDTA'lı dekalsifikasyon solusyonu, hassas ve nötral pH'da çalışan bir solusyondur ve asit solusyonlara göre daha yavaş ancak daha kontrollü bir dekalsifikasyon sağlar. Asidik solusyonlara göre doku morfolojisini daha iyi korur ve boyama güçlüklerine neden olmaz. Bu nedenle, hücresel morfoloji ve ayrıntıların önemli olduğu, enzim çalışması yapılacak ancak zaman sorunu olmayan durumlarda tercih edilir. Sıvı şekilde hazırlanan solusyon asitlerden farklı olarak, EDTA hidroksiapatit kristalinin dış kabuğundaki kalsiyum iyonlarına sırayla bağlanır, şelasyonla hidroksiapatit kristalini fiziksel olarak küçültür ve demineralizasyonu gerçekleştirir.

Dekalsifikasyon sağlandıktan sonra, her bir defekt çevre sağlam doku ile birlikte tek bir parafin bloğa sığacak şekilde kemik segmentler hazırlandı. Dehidratasyon ve parafinizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, kemik segmentleri parafin bloğa, kesit yüzeyine paralel olacak şekilde gömüldü. Hazırlanan blokların değişik seviyelerinden 4-5 µm kalınlığında elde edilen 6 kesitten 4'ü Hematoksilen Eozin, 2'si ise Masson Trikrom boyası ile boyandı. Her iki boyama için iyileşme hattının en iyi değerlendirildiği birer preparat seçildi ve bu preparatlar histolojik değerlendirilmede kullanıldı. Örnekler bilgisayar ortamına veri aktarımını sağlayan Leica DM 4000 dijital ışık mikroskobu (Leica Microsystems, Almanya) ile görüntülendi.

İyileşme bölgesi histolojik olarak incelendikten sonra, iyileşme durumu, incelenilen preparatın ait olduğu grup hakkında bilgilendirilmeyen tecrübeli bir histolog tarafından evrelendirildi. Evrelemede birincil trabekül oluşumu, ikincil trabekül oluşumu, damarlanma, kemik iliği ve bağ dokusu göz önüne alındı. Bu parametreler her bir defekt için 0 (yok), 1 (az), 2 (orta), 3 (çok) olacak şekilde puanlandı. Her grup için elde edilen 4. ve 16. hafta değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

D. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Değerlendirilen tüm parametrelerden elde edilen veriler, istatistiksel değerlendirme için SPSS for Windows v.13.0 programına (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) aktarıldı. Tüm verilerin ortalama ve standart sapmaları (SS) hesaplandı. İki'den fazla grubun karşılaştırmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Parametrelerin ikili karşılaştırması bağımsız değişkenler için çift yönlü non-parametrik bir test olan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney-U testi kullanılarak yapıldı. Değerlendirmede 4 grubun ikili karşılaştırmaları yapıldığından, $p < 0,05$ değeri dörde bölünerek Bonferroni düzeltmesi yapıldı ve $p \leq 0,0125$ anlamlı kabul edildi.

Histolojik parametreler Ki-kare testi ile değerlendirildi ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

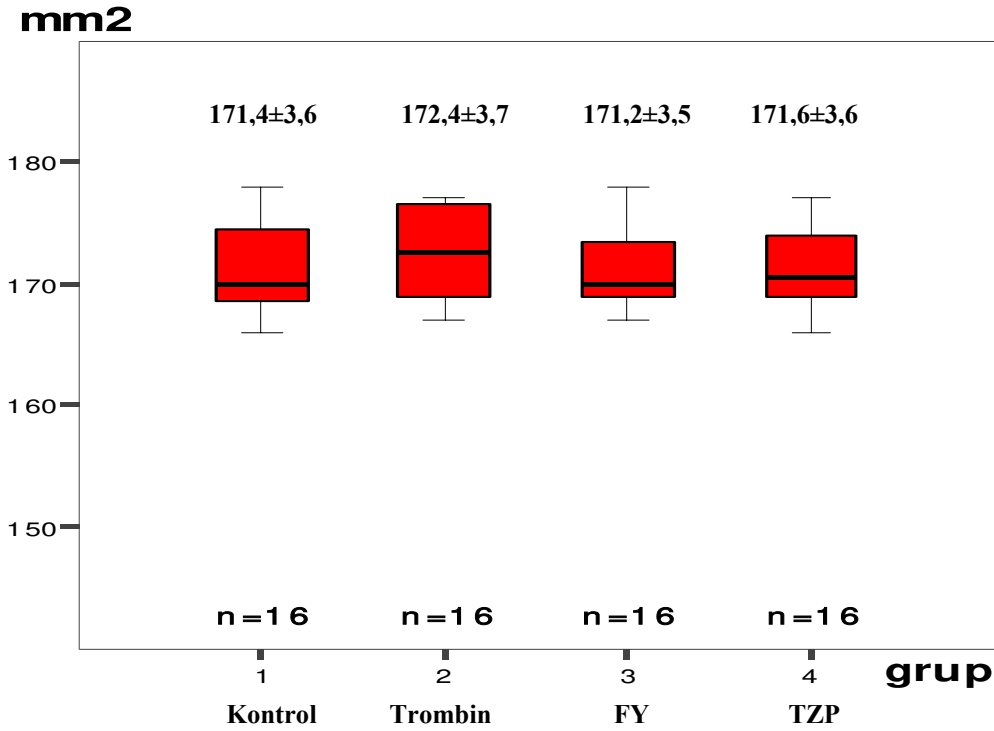
A. GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

Çalışmanın ilk haftasında Grup I'den 1, Grup II'den 2, Grup III'den 2 olmak üzere toplam 5 denek çalışma dışı bırakıldı. Bunlardan 2 denek cerrahi sahada enfeksiyon, 3 denek de ölüm nedeniyle çalışma dışı kaldı. Bu deneklerin yerine aynı işlemlerin gerçekleştirildiği yeni tavşanlar konularak grupların planlanan sayıları korundu. Diğer tavşanlarda ameliyata ikincil gelişen yara yeri enfeksiyonu, deri nekrozu, kıl dönmesi, nörolojik sekeller ya da başka bir komplikasyon izlenmedi.

B. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Defekt alanı değerlendirme bulguları

Ameliyatta oluşturulan (0. hafta) ve alan ölçümleri yapılan defektler gruplar arasında karşılaştırıldı. Her grup için oluşturulan 16'şar defektin ortalamaları; Grup I'de $171,4 \pm 3,6 \text{ mm}^2$, Grup II'de $172,4 \pm 3,7 \text{ mm}^2$, Grup III'de $171,2 \pm 3,5 \text{ mm}^2$ ve Grup IV'te $171,6 \pm 3,6 \text{ mm}^2$ olarak tespit edildi. Gruplar arasında cerrahi ile oluşturulan kemik defekt alanları açısından istatistiksel fark olmadığı saptandı. ($p=0,937$) (Kruskal-Wallis) (**Şekil 22**)



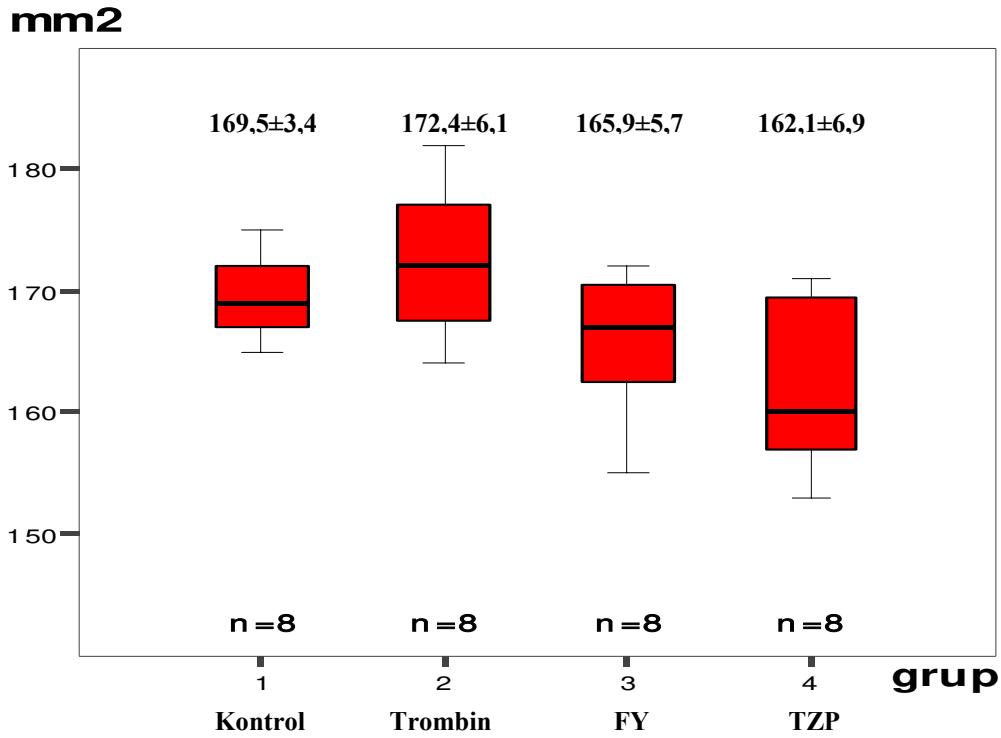
Şekil 22: Grupların ameliyatta oluşturulan (0. hafta) ortalama defekt alanları açısından karşılaştırılması. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,937$) (Kruskal-Wallis).

Dördüncü hafta sonunda her gruptan kurban edilmiş 4'er denekte oluşturulmuş 8'er defekt alanı, üç boyutlu tomografik görüntü üzerinde hesaplandı. Her grup için 8'er defektin ortalamaları; Grup I'de $169,5 \pm 3,4 \text{ mm}^2$, Grup II'de $172,4 \pm 6,1 \text{ mm}^2$, Grup III'de $165,9 \pm 5,7 \text{ mm}^2$ ve Grup IV'te $162,1 \pm 6,9 \text{ mm}^2$ olarak tespit edildi. Çoklu karşılaştırmada alanlar açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmasına rağmen, ikili karşılaştırmalarda farkın hangi gruplardan kaynaklandığı saptanamadı. ($p=0,33$) (Kruskal-Wallis) İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da Grup III ve Grup IV'te ölçülen alanın, Grup I ve II'ye göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Özellikle Grup I ile Grup IV ($p=0,051$); Grup II ile

Grup III ($p=0,058$) ve Grup IV ($p=0,015$) arasındaki fark daha çok dikkat çekmekte idi. Grup III ve Grup IV'te ise alanlar birbirine benzerdi ($p=0,247$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U) (Tablo 3) (Şekil 23) (Şekil 25).

Tablo 3: Dördüncü haftada sakrifiye edilen deneklerin 0. ve 4. haftada ölçülen kemik defekt alanları (mm^2)

Tavşan No		GRUP							
		I		II		III		IV	
		0. hafta	4. hafta	0. hafta	4. hafta	0. hafta	4. hafta	0. hafta	4. hafta
1	Sağ	174	172	177	178	171	171	169	160
	Sol	170	170	170	171	178	170	170	153
2	Sağ	173	168	169	166	169	163	169	160
	Sol	168	166	167	164	170	166	177	171
3	Sağ	170	165	177	182	174	172	174	170
	Sol	170	172	176	176	177	168	173	169
4	Sağ	169	168	174	173	167	162	166	158
	Sol	175	175	168	169	170	155	168	156
Ort		171,1± 2,5	169,5± 3,4	172,3± 4,2	172,4± 6,1	172,0± 3,9	165,9± 5,7	170,8± 3,6	162,1± 6,9



Şekil 23: Grupların 4. hafta sonunda sakrifiye edilen deneklerde ortalama defekt alanları açısından karşılaştırılması. Çoklu karşılaştırmada gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmasına rağmen, ikili karşılaştırmalarda farkın hangi gruplardan kaynaklandığı saptanamadı ($p=0,33$) (Kruskal-Wallis).

Grup I ile II arasında fark bulunamadı ($p=0,317$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup I ile III arasında fark bulunamadı ($p=0,204$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup I ile IV arasında fark bulunamadı ($p=0,051$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup II ile III arasında fark bulunamadı ($p=0,058$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

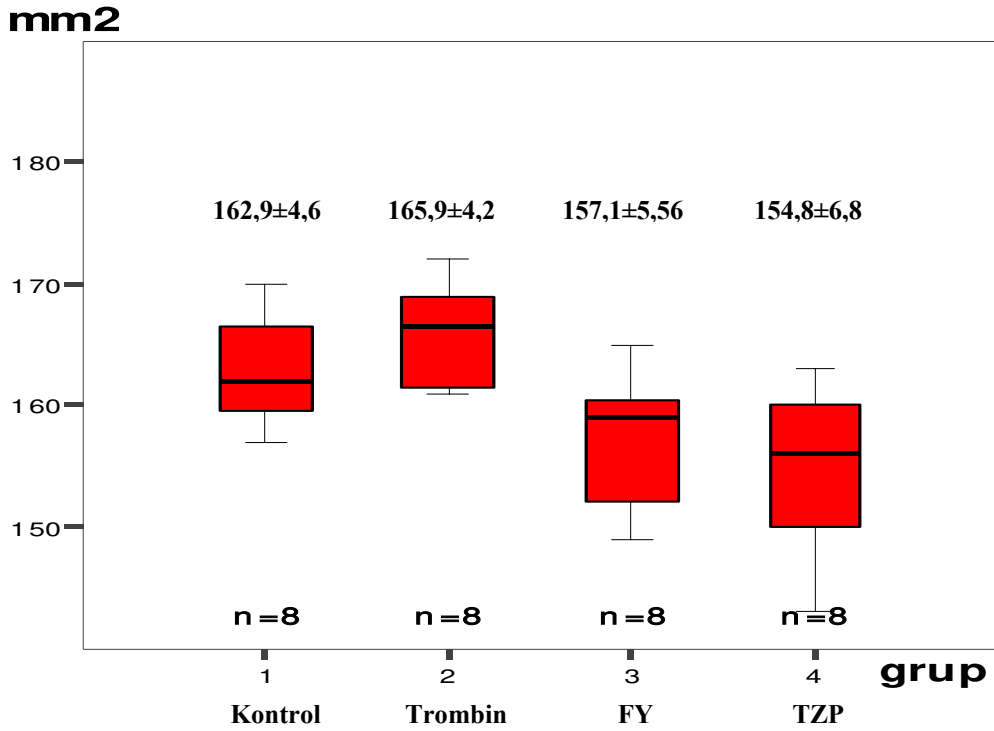
Grup II ile IV arasında fark bulunamadı ($p<0,015$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup III ile IV arasında fark bulunamadı ($p=0,247$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Onaltıncı hafta sonunda her grupta kalan 4'er denekte bulunan 8'er defekt alanı incelendi. Her grup için 8'er defektin ortalamaları; Grup I'de $162,9 \pm 4,6 \text{ mm}^2$, Grup II'de $165,9 \pm 4,2 \text{ mm}^2$, Grup III'de $157,1 \pm 5,5 \text{ mm}^2$ ve Grup IV'te $154,8 \pm 6,8 \text{ mm}^2$ olarak tespit edildi. Alanlar açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. ($p < 0,01$) (Kruskal-Wallis) İkili karşılaştırmalarda farkın Grup II ile Grup III ve Grup IV arasında olduğu tespit edildi. ($p < 0,01$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U) Grup I ile Grup III ($p = 0,073$) ve Grup IV ($p = 0,023$) arasında anlamlı fark tespit edilemedi. Grup III ve Grup IV ise benzer alanlara sahipti ($p = 0,494$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U) (**Tablo 4**) (**Şekil 24**) (**Şekil 25**).

Tablo 4: Onaltıncı haftada kurban edilen deneklerin 0. ve 4. haftada ölçülen kemik defekt alanları (mm^2)

Tavşan No		GRUP							
		I		II		III		IV	
		0. hafta	16. hafta	0. hafta	16. hafta	0. hafta	16. hafta	0. hafta	16. hafta
5	Sağ	176	159	174	172	167	149	174	152
	Sol	178	170	168	161	171	153	169	158
6	Sağ	168	162	171	166	169	160	166	155
	Sol	169	160	177	169	170	158	171	148
7	Sağ	166	162	169	161	169	151	175	143
	Sol	174	164	170	162	177	165	174	163
8	Sağ	175	169	174	167	168	160	177	162
	Sol	167	157	177	169	173	161	169	157
Ort		$171,6 \pm 4,6$	$162,9 \pm 4,6$	$172,5 \pm 3,5$	$165,9 \pm 4,2$	$170,5 \pm 3,2$	$157,1 \pm 5,5$	$171,9 \pm 3,7$	$154,8 \pm 6,8$



Şekil 24: Grupların 16. hafta sonunda sakrifiye edilen deneklerde ortalama defekt alanları açısından karşılaştırılması. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. ($p < 0,01$) (Kruskal-Wallis)

Grup I ile II arasında fark bulunamadı ($p = 0,245$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

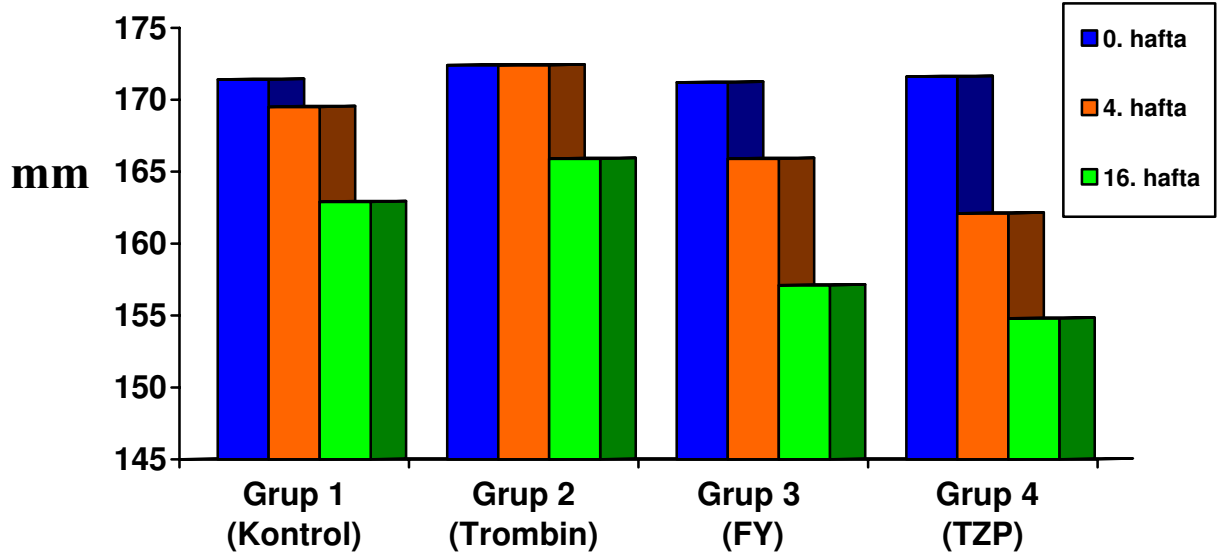
Grup I ile III arasında fark bulunamadı ($p = 0,073$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

Grup I ile IV arasında fark bulunamadı ($p = 0,023$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

Grup II ile III arasında fark bulundu ($p < 0,01$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

Grup II ile IV arasında fark bulundu ($p < 0,01$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

Grup III ile IV arasında fark bulunamadı ($p = 0,494$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).



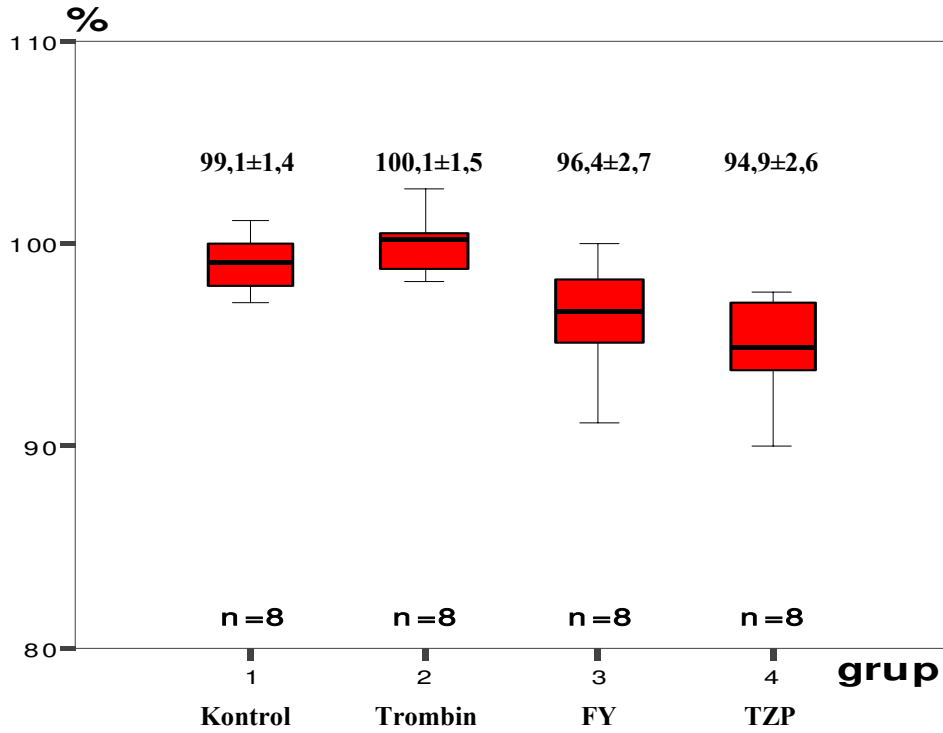
Şekil 25: Gruplardaki deneklerin 0., 4. ve 16. hafta sonunda ortalama defekt alanlarının tek grafikte toplu görünümü

- Ameliyatta oluşturulan (0. hafta) ortalama defekt alanları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,937$) (Kruskal-Wallis).
- 4. hafta sonunda sakrifiye edilen deneklerde ortalama defekt alanları açısından çoklu karşılaştırmada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmasına rağmen, ikili karşılaştırmalarda farkın hangi gruplardan kaynaklandığı saptanamadı ($p=0,33$) (Kruskal-Wallis).
- 16. hafta sonunda sakrifiye edilen deneklerde ortalama defekt alanları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$) (Kruskal-Wallis). Yapılan ikili karşılaştırmalarda farkın Grup II ile III ve Grup II ile IV arasında olduğu saptandı ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U) .

Her denek için ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen alana göre 4. haftadaki alanların yüzde cinsinden oran ortalamaları Grup I için % 99,1±1,4, Grup II için % 100,1±1,5, Grup III için % 96,4±2,7 ve Grup IV için % 94,9±2,6 olarak saptandı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arasında anlamlı fark saptandı. ($p<0,01$) (Kruskal-Wallis) İkili karşılaştırmalarda farkın Grup I ile Grup IV, Grup II ile Grup III ve Grup IV arasında olduğu saptandı. ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U). Grup III ve IV arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0,247$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U) (**Tablo 5**) (**Şekil 26**) (**Şekil 28**).

Tablo 5: Dördüncü haftada sakrifiye edilen deneklerin, ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen defekt alanına göre 4. haftadaki defekt alanlarının yüzde oranı (%)

Tavşan No		GRUP			
		I	II	III	IV
1	Sağ	98,9	100,6	100,0	94,7
	Sol	100,0	100,6	95,5	90,0
2	Sağ	97,1	98,2	96,4	94,7
	Sol	98,8	98,2	97,6	96,6
3	Sağ	97,1	102,8	98,9	97,7
	Sol	101,2	100,0	94,9	97,7
4	Sağ	99,4	99,4	97,0	95,2
	Sol	100,0	100,6	91,2	92,9
Ort		99,1±1,4	100,1±1,5	96,4±2,7	94,9±2,6



Şekil 26: Grupların ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen defekt alanına göre 4. haftadaki defekt alanlarının yüzde oran ortalamaları açısından karşılaştırılması. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. ($p<0,01$) (Kruskal-Wallis)

Grup I ile II arasında fark bulunamadı ($p=0,223$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup I ile III arasında fark bulunamadı ($p=0,031$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup I ile IV arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup II ile III arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

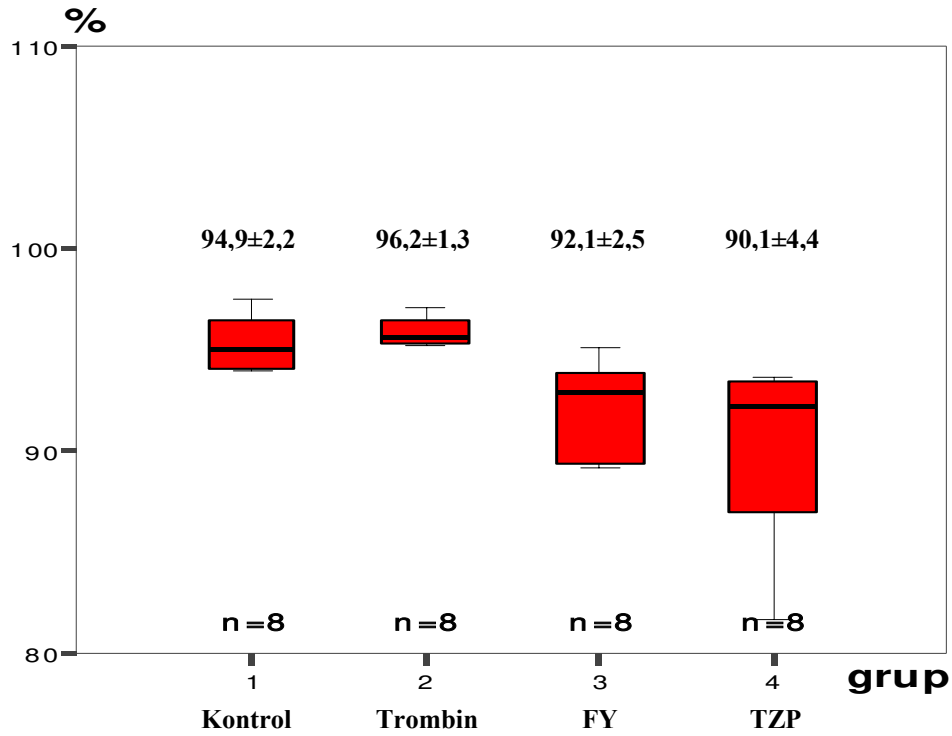
Grup II ile IV arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup III ile IV arasında fark bulunamadı ($p=0,247$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Ameliyattan sonra (0.hafta) ölçülen alana göre 16. haftadaki alanların yüzde cinsinden oran ortalamaları ise Grup I için $94,9 \pm 2,2$, Grup II için $96,2 \pm 1,3$, Grup III için $92,1 \pm 2,5$ ve Grup IV için $90,1 \pm 4,4$ olarak saptandı. Gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmesi üzerine ($p < 0,01$) (Kruskal-Wallis), yapılan ikili karşılaştırmalarla farkın Grup I ile Grup IV, Grup II ile Grup III ve Grup IV arasında olduğu belirlendi. ($p < 0,01$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U). Grup III ve IV arasında, 4 hafta alan-oran sonuçlarında olduğu gibi, anlamlı fark saptanamadı ($p = 0,247$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U) (**Tablo 6**) (**Şekil 27**) (**Şekil 28**).

Tablo 6: Onaltıncı haftada kurban edilen deneklerin, ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen defekt alanına göre 16. haftadaki defekt alanlarının yüzde oranı (%)

Tavşan No		GRUP			
		I	II	III	IV
5	Sağ	90,3	98,9	89,2	87,4
	Sol	95,5	95,8	89,5	93,5
6	Sağ	96,4	97,1	94,7	93,4
	Sol	94,7	95,5	92,9	86,6
7	Sağ	97,6	95,3	89,3	81,7
	Sol	94,3	95,3	93,2	93,7
8	Sağ	96,6	96,0	95,2	91,5
	Sol	94,0	95,5	93,1	92,9
Ort		$94,9 \pm 2,2$	$96,2 \pm 1,3$	$92,1 \pm 2,5$	$90,1 \pm 4,4$



Şekil 27: Grupların ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen defekt alanına göre 16. haftadaki alanlarının yüzde oran ortalamaları açısından karşılaştırılması. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. ($p<0,01$) (Kruskal-Wallis)

Grup I ile II arasında fark bulunamadı ($p=0,292$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

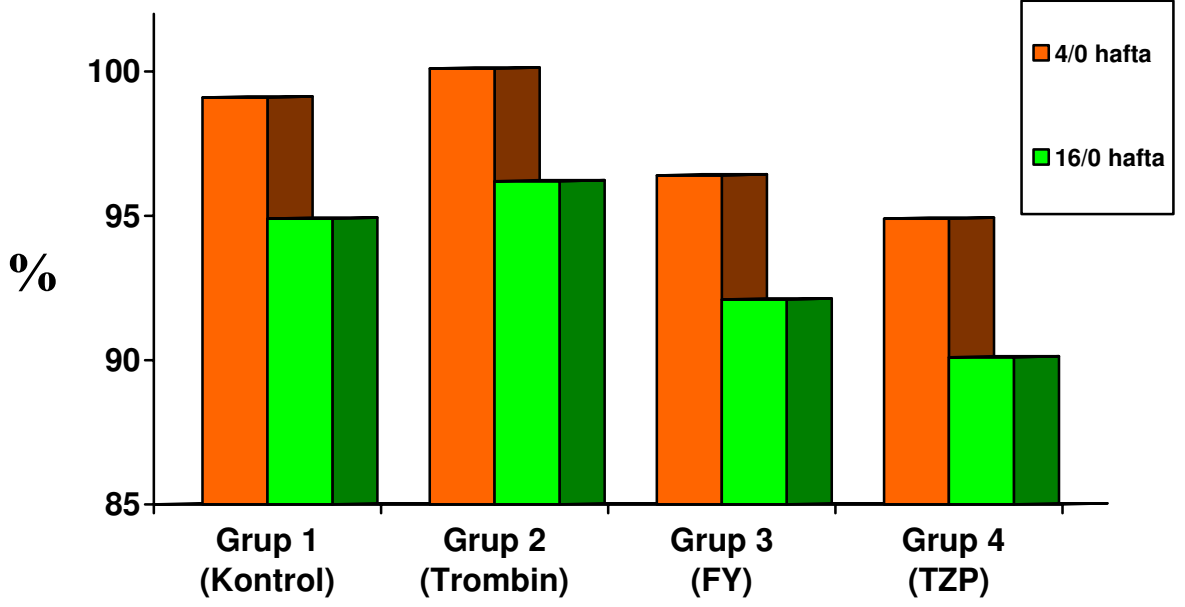
Grup I ile III arasında fark bulunamadı ($p=0,024$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

Grup I ile IV arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

Grup II ile III arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

Grup II ile IV arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).

Grup III ile IV arasında fark bulunamadı ($p=0,431$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U).



Şekil 28: Gruplardaki deneklerin ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen defekt alanına göre 4. ve 16. haftadaki alanlarının yüzde oran ortalamalarının tek grafikte toplu görünümü

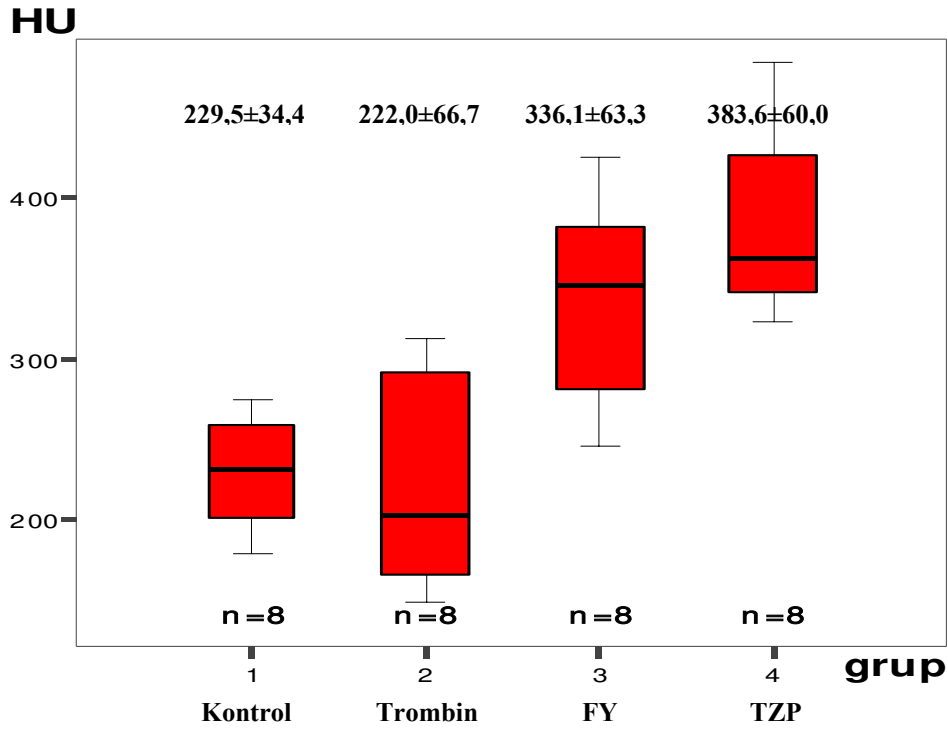
- Ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen defekt alanına göre 4. haftadaki defekt alanlarının yüzde oran ortalamaları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$) (Kruskal-Wallis). Yapılan ikili karşılaştırmalarda farkın Grup I ile IV, Grup II ile III ve Grup II ile IV arasında olduğu saptandı ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).
- Ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen defekt alanına göre 16. haftadaki alanlarının yüzde oran ortalamaları açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,01$) (Kruskal-Wallis). Yapılan ikili karşılaştırmalarda farkın Grup I ile IV, Grup II ile III ve Grup II ile IV arasında olduğu saptandı ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Kemik yoğunluk değerlendirme bulguları

Yeni oluşan kemiğin yoğunluğunu, 16. hafta sonunda tüm gruplardaki 4'er denekteki, toplam 8'er defekt için belirlendi. Grup I'de ortalama değer $229,5 \pm 34,4$ HU, Grup II'de $222,0 \pm 66,7$ HU, Grup III'de $336,1 \pm 63,3$ HU ve Grup IV'te $383,6 \pm 60,0$ olarak tespit edildi. Gruplar arasında anlamlı fark tespit edimesi üzerine ($p < 0,01$) (Kruskal-Wallis), yapılan ikili karşılaştırmalarla farkın Grup I ile Grup III ve Grup IV, Grup II ile Grup III ve Grup IV arasında olduğu belirlendi ($p < 0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U). Grup I ile Grup II ($p = 0,674$) ve Grup III ile Grup IV ($p = 0,208$) arasında anlamlı fark saptanmadı (**Tablo 7**) (**Şekil 29**).

Tablo 7: Onaltıncı haftada sakrifiye edilen deneklerin, yeni oluşmuş kemik doku yoğunlukları (HU)

Tavşan No		GRUP			
		I	II	III	IV
5	Sağ	219	162	426	463
	Sol	244	273	246	371
6	Sağ	275	312	286	485
	Sol	206	148	407	352
7	Sağ	196	168	348	330
	Sol	258	207	342	391
8	Sağ	259	309	276	354
	Sol	179	197	358	323
Ort		229,5±34,4	222,0±66,7	336,1±63,3	383,6±60,0



Şekil 29: Grupların 16. hafta sonunda yeni oluşmuş kemiğin yoğunluk ortalamaları açısından karşılaştırılması. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$) (Kruskal-Wallis) .

Grup I ile II arasında fark bulunamadı ($p=0,674$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup I ile III arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup I ile IV arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup II ile III arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

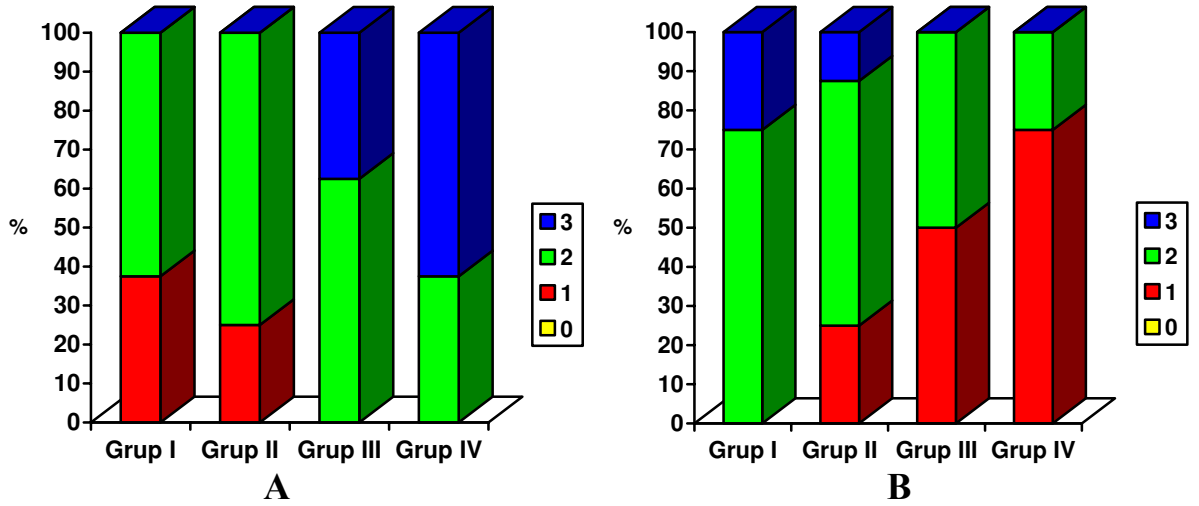
Grup II ile IV arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

Grup III ile IV arasında fark bulunamadı ($p=0,208$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U).

C. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Histolojik evreleme bulguları

Histolojik evrelemede kullanılan 5 parametre, 4. ve 16. haftalarda sakrifiye edilen denekler için gruplar arasında karşılaştırıldı. Buna göre; ilk parametre olan birincil kemik trabekül oluşumu açısından gruplar arasında 4. haftada istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken ($p=0,017$) (Ki-kare), 16. haftada istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi. ($p=0,054$) (Ki-kare) Birincil kemik trabekülleri 4. haftada Grup I ve Grup II'ye göre Grup III ve Grup IV'te daha fazla olduğu izlendi. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanamasa da, 16. haftada birincil kemik trabekülleri Grup III ve Grup IV'e göre Grup I ve Grup II'de daha fazla izlendi (Şekil 30).

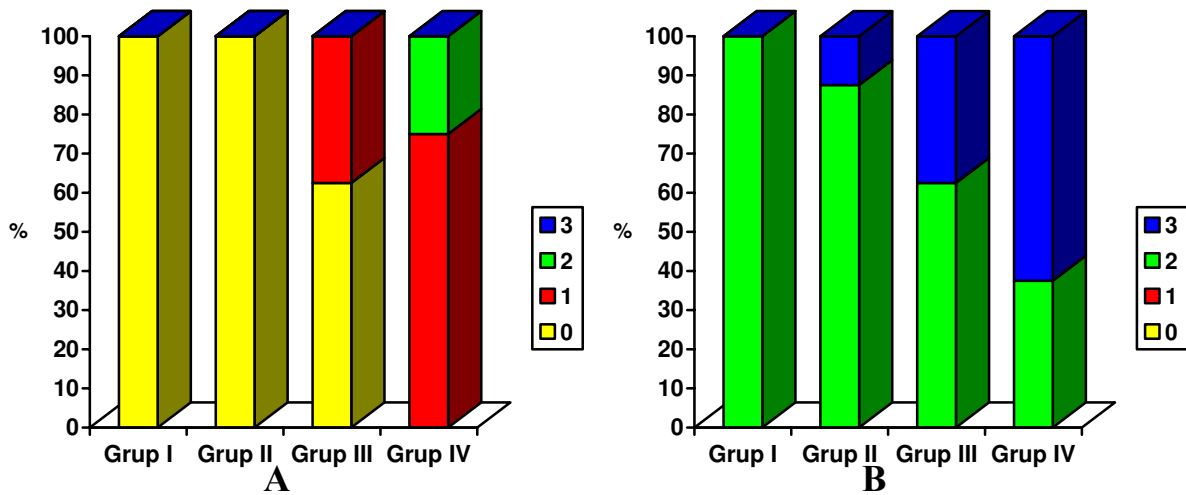


Şekil 30: Grupların birincil kemik trabekül oluşumu açısından karşılaştırılması [Renkler histolojik evreleme puanlarını temsil etmekte: 0 (yok) 1 (az) 2 (orta) 3 (çok)]

(A) 4. haftada gruplar arasında fark bulundu ($p=0,017$) (Ki-kare).

(B) 16. haftada gruplar arasında fark bulunamadı ($p=0,054$) (Ki-kare).

İkincil kemik trabeküleri açısından değerlendirildiğinde, hem 4. haftada ($p<0,01$) (Ki-kare), hemde 16. haftada ($p=0,028$) (Ki-kare) istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Dördüncü hafta sonunda, Grup I ve Grup II’de hiç ikincil kemik trabekülüne rastlanmazken, Grup IV’te Grup III’e göre daha fazla tespit edildi. Onaltı hafta sonunda da Grup III ve Grup IV’de, Grup I ve II’ye göre daha fazla ikincil kemik trabekülü izlendi (**Şekil 31**).

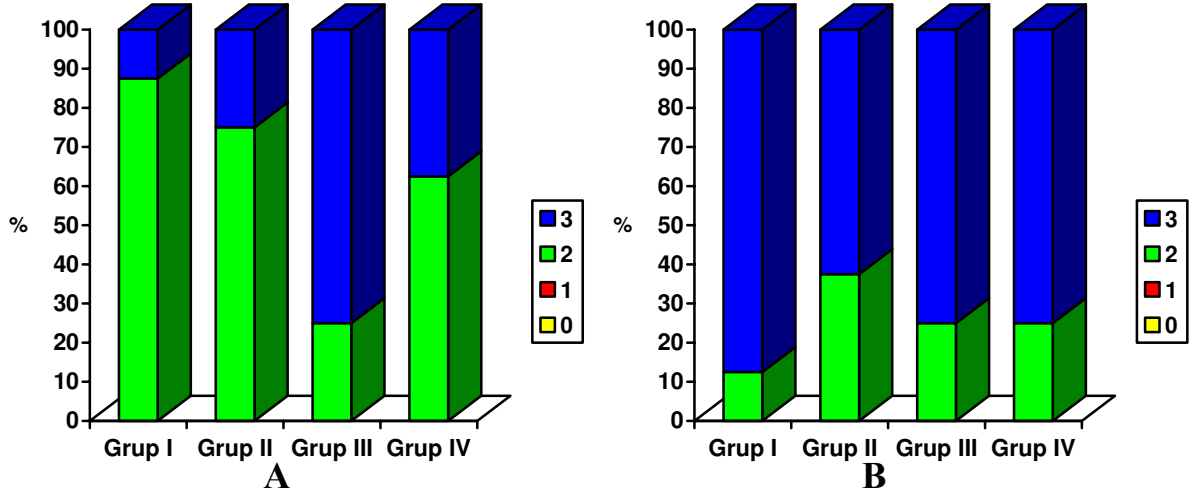


Şekil 31: Grupların ikincil kemik trabekül oluşumu açısından karşılaştırılması [Renkler histolojik evreleme puanlarını temsil etmekte: ■ 0 (yok) ■ 1 (az) ■ 2 (orta) ■ 3 (çok)]

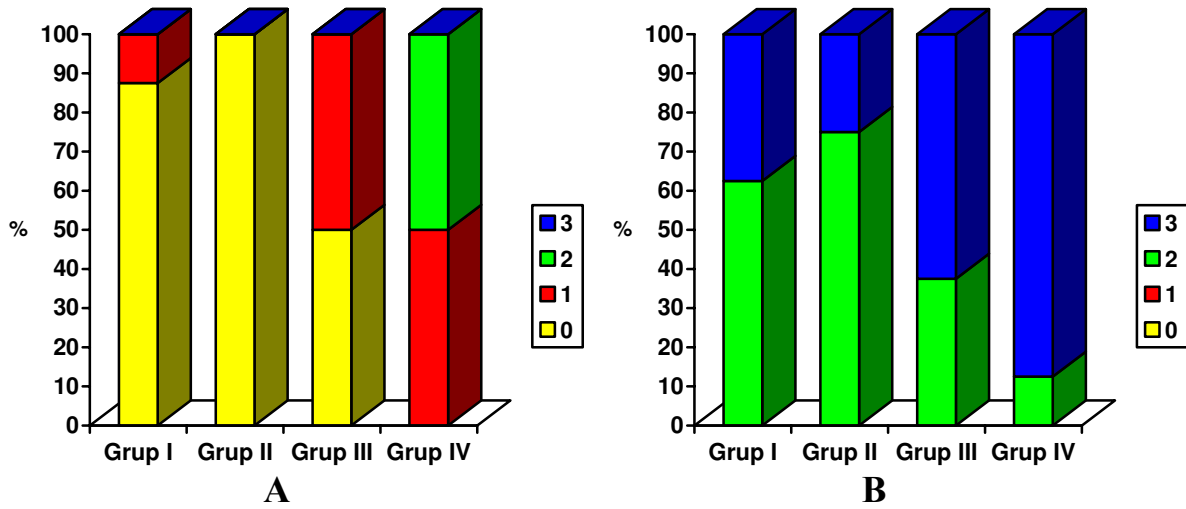
(A) 4. haftada gruplar arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Ki-kare).

(B) 16. haftada gruplar arasında fark bulundu ($p=0,028$) (Ki-kare).

Gruplar histolojik olarak damarlanma açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında hem 4. hafta için ($p=0,058$) (Ki-kare), hemde 16. hafta için anlamlı fark saptanamadı ($p=0,721$) (Ki-kare). Dördüncü hafta sonunda damarlanma Grup III için; istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, diğer gruplardan fazla izlenirken, Grup I, Grup II ve Grup IV benzer damarlanma göstermekte idi. Onaltıncı hafta sonunda ise 4 grupta birbirine benzer damarlanma göstermekte idi (Şekil 32).



Kemik iliği oluşumu açısından 4. hafta sonunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken ($p<0,01$) (Ki-kare), 16. hafta sonunda bu fark tespit edilemedi ($p=0,060$) (Ki-kare). Dördüncü hafta sonunda özellikle Grup IV'te, daha az olmakla birlikte Grup III'te kemik iliği oluşumunun daha fazla olduğu izlendi. Onaltıncı hafta sonunda ise, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, Grup III ve Grup IV'te diğer iki gruba göre daha fazla kemik iliği oluşumu gözlemlendi (Şekil 33).



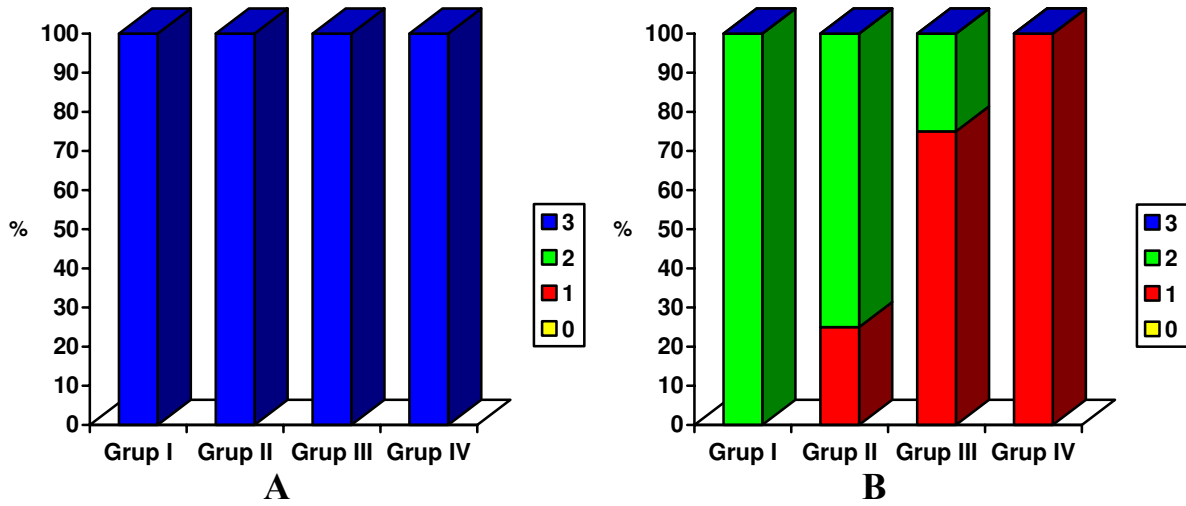
Şekil 33: Grupların kemik iliği oluşumu açısından karşılaştırılması [Renkler histolojik

evreleme puanlarını temsil etmekte: 0 (yok) 1 (az) 2 (orta) 3 (çok)]

(A) 4. haftada gruplar arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Ki-kare).

(B) 16. haftada gruplar arasında fark bulunamadı ($p=0,060$) (Ki-kare).

Bağ dokusu oluşumu açısından değerlendirildiğinde ise, 4. hafta sonunda gruplar arasında fark saptanmazken, tüm gruplarda maksimum düzeyde bağ dokusu izlendi ($p>0,05$) (Ki-kare). Onaltıncı hafta sonunda ise gruplar arasında bağ dokusu yoğunluğu açısından anlamlı fark saptandı ($p<0,01$) (Ki-kare). Grup I ve Grup II’de daha yoğun bağ dokusu izlenirken, Grup III ve Grup IV’te azaldığı tespit edildi (**Şekil 34**).



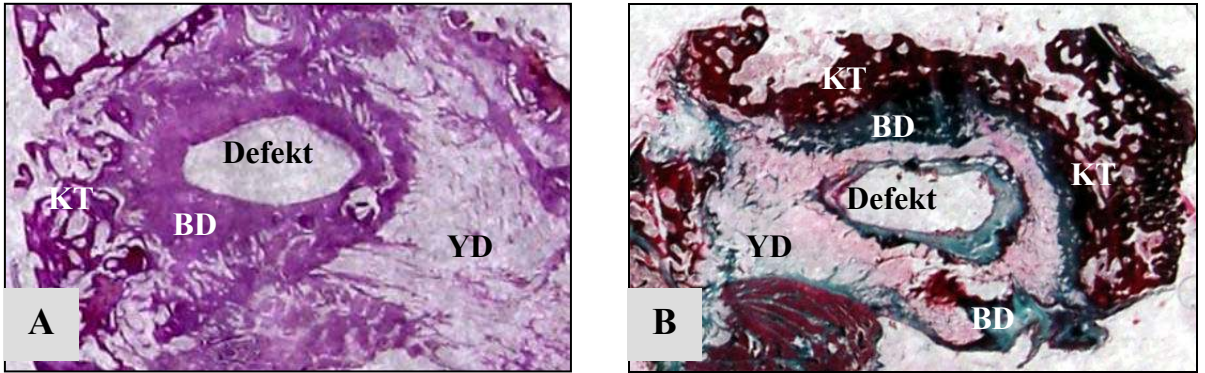
Şekil 34: Grupların bağ dokusu oluşumu açısından karşılaştırılması [Renkler histolojik evreleme puanlarını temsil etmekte: 0 (yok) 1 (az) 2 (orta) 3 (çok)]

(A) 4. haftada gruplar arasında fark bulunamadı ($p>0,05$) (Ki-kare).

(B) 16. haftada gruplar arasında fark bulundu ($p<0,01$) (Ki-kare).

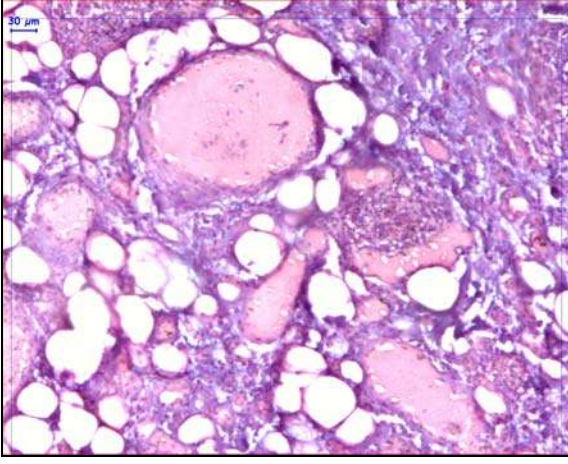
Histolojik görüntüleme bulguları

Histolojik kesitler oluşturulan defekte paralel olarak alındığından, preparatların makroskopik incelemesinde, özellikle Masson trikrom boyamasında dokular kolaylıkla tanımlanabiliyordu. Ortada defekt alanı, bunu çevreleyen bağ ve yer yer yağ dokusu vardı. Bağ dokusu haftalara göre değişmekle birlikte, yer yer yeni oluşmuş trabekülleri içermekteydi (Şekil 35).

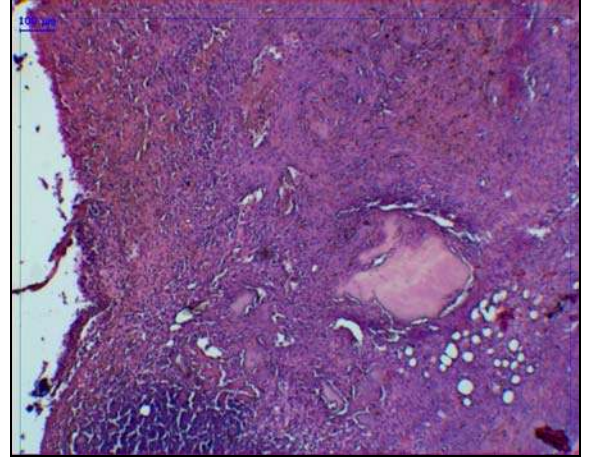


Şekil 35: Histolojik kesitlerin makroskopik görünümü. Ortada defekt, dış komşuluğunda bağ dokusu ve yeni oluşmakta olan kemik doku, en dışta da sağlıklı kemik dokusu izlenmektedir. KT: Kemik trabekülü, BD: Bağ dokusu, YD: Yağ dokusu, (A) Hematoksilen-Eozin (B) Masson Trikrom

Dördüncü hafta sonunda sakrifiye edilen deneklerin histolojik kesitlerine bakıldığında, tüm gruplarda yoğun bir bağ dokusu izlenmekteydi. Birincil kemik trabekülleri ilk iki grupta daha az izlenirken, Grup II ve Grup III'te daha yoğundu. İkincil trabeküllere ise ilk iki grupta rastlanmazken, Grup III'te daha az, Grup IV'te ise nispeten daha fazla saptandı. Kemik iliği oluşumu da buna paralel olarak son grupta daha fazla idi. Damar oluşumu tüm gruplarda benzerdi (Şekil 36 - 41)



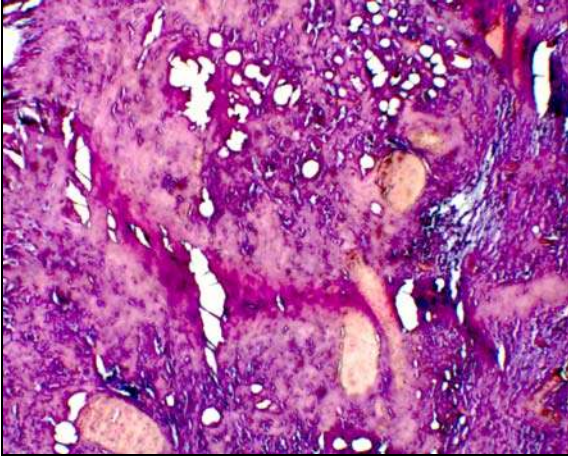
Şekil 36



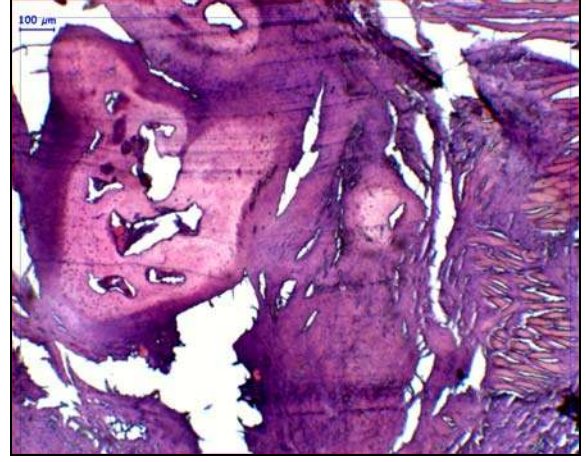
Şekil 37

Şekil 36: Yer yer birincil kemik trabeküllerinin bulunduğu, kalan bölgelerde bağ dokusundan zengin görünüm izlenmektedir (Grup I - 4. hafta) (Hematoksilen-Eozin X 100).

Şekil 37: Bağ dokusundan yoğun görünüm. Nadir birincil kemik trabekülleri izlenmektedir (Grup II- 4. hafta) (Hematoksilen-Eozin X 40).

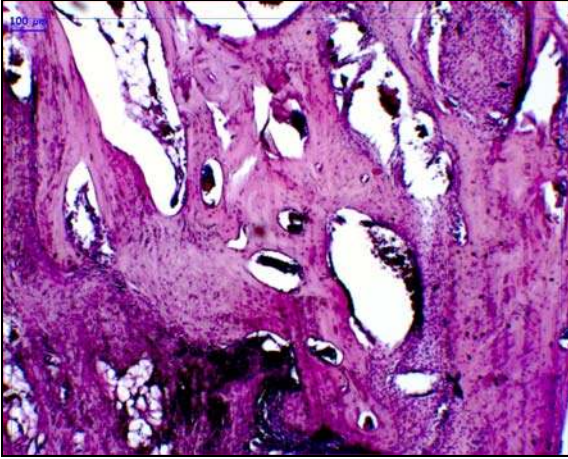


Şekil 38



Şekil 39

Şekil 38 - 39: Grup I ve II'ye göre birincil trabekül oluşumu daha çok izlenen, çok az ikincil trabekül bulunan, bağ dokusundan yoğun görünüm izlenmektedir (Grup III - 4. hafta) (Hematoksilen-Eozin X 100).



Şekil 40

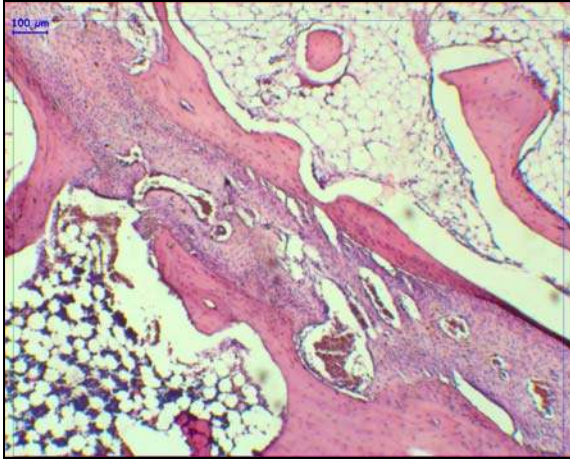


Şekil 41

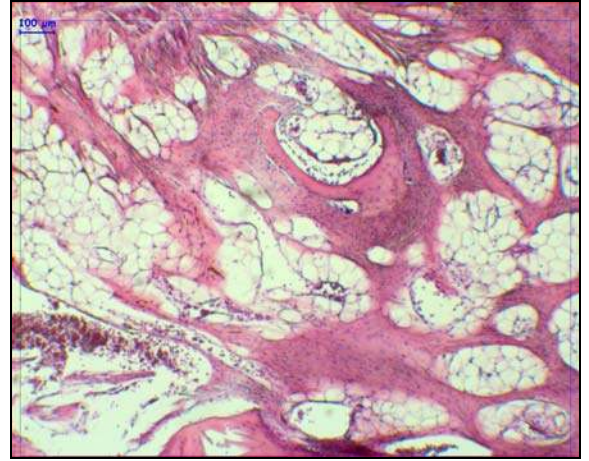
Şekil 40: Dördüncü haftada diğer gruplara göre daha yoğun izlenen birincil ve ikincil trabeküller. Buna bağlı daha yoğun kemik iliği izlendi (Grup IV - 4. hafta) (Hematoksilen-Eozin X 40).

Şekil 41: Bağ dokusu içinde yoğun izlenen kemikleşme alanları. Kırmızı boya kemikleşme alanlarını, yeşil boya bağ dokusunu gösteriyor (Grup IV - 4. hafta) (Masson Trikrom X 40).

Onaltıncı hafta sonunda sakrifiye edilen deneklerin histolojik kesitlerine bakıldığında ise tüm gruplarda kemikleşmenin devam ettiği, birincil ve ikincil trabeküllerin azalmış bağ dokusu ile yer değiştirmeye başladığı izlendi. Birincil kemik tabekülleri, Grup I ve Grup II’de daha yoğun izlendi. Grup III ve IV’te ise birincil kemik trabekülleri, yerlerini daha çok ikincil kemik trabekülerine bırakmaya başlamışlardı. Kemik iliği de buna paralel olarak son iki grupta daha fazla izlendi (**Şekil 42 - 47**).



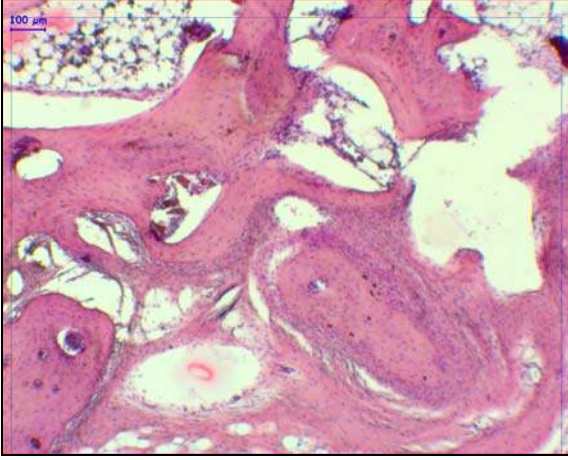
Şekil 42



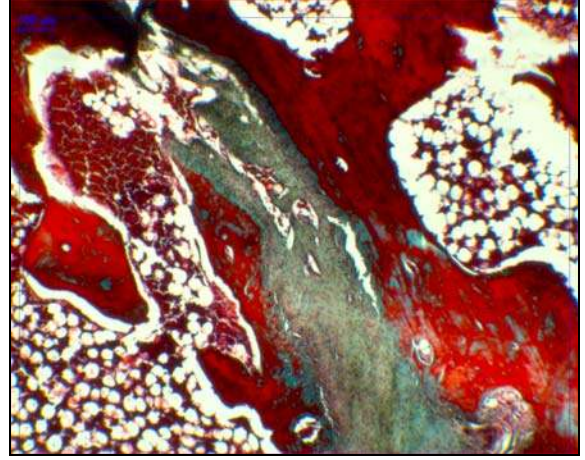
Şekil 43

Şekil 42: Birincil ve ikincil kemik trabekülleri izlenen, bağ dokusundan 4. haftaya göre daha fakir görünüm izlenmektedir (Grup I - 16. hafta) (Hematoksilen-Eozin X 40).

Şekil 43: Grup I’e benzer birincil ve ikincil kemik trabekül dağılımı izlenmekte (Grup II - 16. hafta) (Hematoksilen-Eozin x 40).



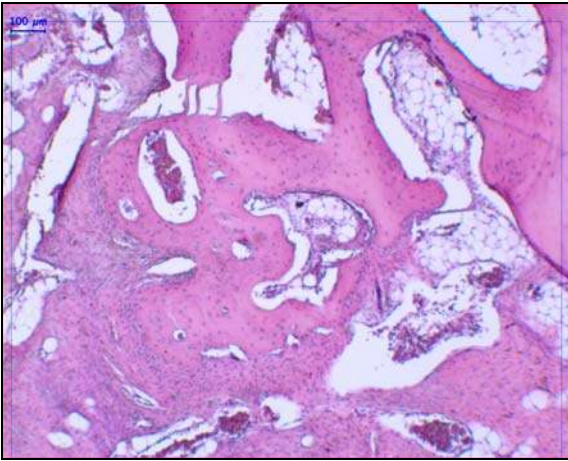
Şekil 44



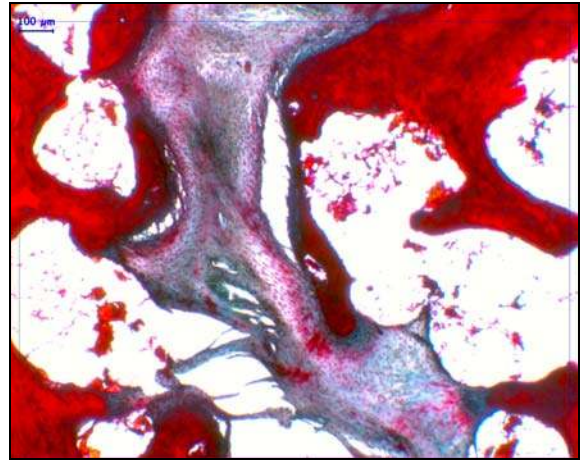
Şekil 45

Şekil 44: Birincil ve ikincil kemik trabekülleri ve arada daha az olmak üzere bağ dokusu izlenmektedir (Grup III - 16. hafta) (Hematoksilen-Eozin X 40).

Şekil 45: Birincil ve ikincil kemik trabekülleri ve arada daha az olmak üzere bağ dokusu izlenmektedir (Grup III - 16. hafta) (Masson trikrom X 40).



Şekil 46: Yaygın ikincil kemik trabekülleri (Grup IV - 16. hafta)(Hematoksilen-Eozin X 40).



Şekil 47: Yaygın ikincil kemik trabekülleri (Grup IV - 16. hafta)(Masson trikrom X 40).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kemik doku ile ilgilenen araştırmacılar uzun yıllar, kırık iyileşmesini hızlandıracak, kemik defektlerinin kendiliğinden ve hızlı bir biçimde kapanmasını sağlayacak, daha büyük defektlerde rekonstrüksiyon amacıyla kullanılan kemik grefti veya kemik benzeri alloplastik maddelerin daha hızlı ve daha az komplikasyonla kemikle bütünleşmesine yardımcı olacak yöntemler üzerinde çalışmışlardır. Bazı başarılı sonuçlar bildirilmesine rağmen, bu çalışmaların kliniğe yansımaları beklenen düzeyde olmamıştır.

Kemik metabolizmasının bazı kimyasal, elektriksel ve mekanik uyarılarca düzenlendiği, kemik iyileşmesi sırasında trombosit, makrofaj ve fibroblastlardan bazı peptidlerin (büyüme faktörleri) salgılandığı bilinmektedir. Bu proteinler kemik iyileşmesi sırasındaki karmaşık trafiği düzenleyerek; migrasyon, proliferasyon ve diferansiasyon ile rezorpsiyon arasındaki hassas dengeyi yerel olarak sağlamaktadırlar. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kemik iyileşmesinde rol alan birçok kemik uyarıcı faktör tanımlanmıştır. Son yıllarda rekombinant teknolojinin gelişmesi, bu yolla elde edilen büyüme faktörlerinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin daha iyi ortaya konulmasına yardımcı olmuştur. Çalışmalar en çok TGF ailesinden olan BMP' ler üzerine yoğunlaşmış olmakla birlikte, TGF- β , PDGF, FGF, VEGF ve IGF kemik iyileşmesinde etkisi ortaya konulan diğer büyüme faktörleridir. Bunların deneysel çalışmalarla kemik iyileşme üzerine etkinliği gösterilmiş, bazıları sınırlı da olsa klinikte kullanılmış olmalarına rağmen, rutin klinik kullanıma girmeleri zor görünmektedir. Bunun en önemli nedeni ise rekombinant teknolojinin pahalı olmasıdır.^{14,51,66}

Dolaşımda bulunan trombositlerin α -granüllerinde VEGF, PDGF, TGF β 1 ve β 2, bFGF gibi pek çok büyüme faktörü depolanmış durumdadır. Çeşitli uyaranlara karşı trombosit aktivasyonu olduğunda bu maddeler granüllerden salınırlar. Bu bilgiye dayanarak, rekombinant teknikle yüksek maliyet nedeniyle yeterince kullanıma girememiş büyüme faktörlerinin, maliyetinin düşürülüp, direkt kişinin kendi kanından hazırlanması amaçlanmıştır. Venöz kandan santrifüj edilerek ayrıştırılıp, fibrinojen de içeren az miktar plazma içerisinde süspansiyon haline getirilmesiyle hazırlanan trombosit zenginleştirilmiş plazmanın içerdiği trombositlerin trombinle ve kalsiyumla aktive edilmesi ilkesine dayanan bu teknikle, birçok büyüme hormonunu aynı anda ve büyük miktarlarda uygulamak mümkündür. Farklı tekniklerle plazmadaki trombosit sayısı 3-8 katına kadar konsantre edilebilir.^{3,8,23,64} Teorik olarak çok şey vaat eden 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 ticari firmaların geliştirdiği cihazlar sayesinde daha kolay ve ucuz elde edilebilir hale gelmiştir. Bu hızlı gelişme, beklentinin yüksek olması, uygulamanın kolaylığı ve otolog hazırlanması nedeniyle otolog olmayan kan ürünlerinin yan etkilerini taşıması ürünün klinik uygulamalara hızla girmesini sağlamıştır.

Deneysel çalışmaları tamamlanmadan önce kullanıma giren TZP ile yapılan klinik çalışmalarda genelde kontrol gruplarının olmaması veya yetersiz olması, deneysel çalışmalara olan ihtiyacı ön plana çıkarmıştır. Yapılan sınırlı çalışmalarda, Marx tek başına kemik grefti uygulaması ile kemik grefti + TZP uygulamasını karşılaştırdığında ikili uygulamada kemik dansitesinde, kemik biçimlenmesinin hız ve derecesinde daha çok artış saptamış ve bunun PDGF ve TGF- β sayesinde olduğunu belirtmiştir.^{37,64,65,101} Anitua da diş çekimi sonrası oluşan boşluğa TZP uygulamış ve hem epitelizasyon hem de kemik dansitesinde artış rapor

etmiştir. Trombosit zengin plazma invitro ortamda fetal osteoblast benzeri hücrelerin rejenerasyon ve fonksiyonelliğini arttırıp, mezenkimal kök hücrelerin ortama göçünü sağlamaktadır.⁴⁸ Aghaloo ve Butterfield gibi araştırmacılar ise kemik greftleriyle yaptıkları deneysel hayvan çalışmalarında TZP'nin üstünlüğünü gösterememişlerdir.^{2,32} Fakat diş hekimliğinde, osteointegrasyon için kullanılan otojen greftlere kemik doku ilerlemesini hızlandığını bildiren araştırmacılar mevcuttur ve maksiller antroplastide kemik greftleriyle birlikte kullanımında başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Kemikleşmeye ve yara iyileşmesine katkıları nedeniyle lumbar spinal füzyon hastalarında otogreft ve hidroksiapatitle birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar yanında olumsuz sonuçlar da rapor edilmiştir.^{5,23} Kawase ve Okuda'nın 2003 yılında TZP'nin periodontal ligamentte kollajen sentezini ve in vitro osteoblastik aktiviteyi arttırdığını göstermelerinden sonra Huang ve arkadaşları gingival çekilmelerde koronal ilerletme flebine TZP uygulaması yapmışlar fakat istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme artışı saptayamamışlardır.^{50,74} Daha önceden Siebrecht ile birlikte TZP'nin poröz hidroksiapatit içine kemik ilerlemesini ve kemik oluşumunu arttırdığını gösteren Aspenberg, sıçan aşıl tendonunda yaptığı çalışmada da TZP uygulanan tendon defektinin tendon kopma kuvvetinde ve tendon kallusunda artış saptamıştır.^{6,88} Ligamanlar üzerinde de benzer etkileri saptanmış ve artroskopik cerrahide kullanımı önerilmiştir.⁸³

Trombosit zengin plazma ile FY'nin başlıca farkı, TZP'de trombosit konsantrasyonunun fazla, fibrinojen konsantrasyonunun az olmasıdır. Daha az fibrinojen içerdiği için çok katı bir fibrin pıhtı oluşmadığı; bu nedenle yara iyileşmesini engellemeyip, bilakis içindeki büyüme faktörleri sayesinde bu olayı hızlandığı düşünülmüştür. Fibrin yapıştırıcı ise fibrinojenden yoğun, trombosit fakir olduğu için klinikte daha çok doku yapıştırıcı, pıhtı oluşturuca özelliğinden yararlanılmıştır. İlk defa Bergel'in fibrinin

hemostatik etkisini göstermesiyle, yara iyileşmesi ve kan pıhtılaşmasında fibrinin önemi anlaşılmış ve dikkatler fibrin öncü maddesi fibrinojene yönelmiştir.^{3,16,67} Fibrinojenin trombinle aktif hale getirildiğinin anlaşılmasından sonra, 1940'larda Tidrick gibi araştırmacılar tarafından deri grefti sabitlemesinde ikisi kombine kullanılmış, fakat yetersiz fibrinojen miktarı nedeniyle başarı elde edilememiştir.^{21,28} Bundan 30 yıl sonra, fibrinojen miktarı arttırılan fibrin yapıştırıcı ile 1970'lerin başında Millesi ve arkadaşlarının deneysel olarak sinir anastomozunda başarı elde etmesiyle, tekrar popüler olmuş ve tüm vücutta kullanım alanı bulmuştur. Klinik olarak sinir anastomozlarında, yumuşak doku defektlerinde hemostaz ve keratinosit kültürleriyle birlikte yara iyileşmesi amaçlı, deri greftlerinin tespitinde^{21,28,36,99}, kansellöz kemik greftleriyle birlikte, kanama eğilimi olan hastalarda diş çekimi sonrası alveoler kavitede, dura yapıştırmada, spontan pnömotoraks olgularında hava vakum drenaj ile birlikte hava kaçağını önlemek için, akciğer rezeksiyonu sonrası hava-sıvı kaçağını önlemek için, vasküler anastomozlarda, peptik ülser kanamalarında kanamayı durdurmak için, yüz-boyun germe, meme küçültme ve büyütme gibi estetik ameliyatlarda kanamayı, sonrasındaki şişlik ve morluk oluşumunu azaltmak; dren kullanım süresini kısaltmak veya hiç kullanılmamasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

3,4,12,13,16,21,28,30,35,36,62,75

Fibrin yapıştırıcı kemikte daha çok frontal sinüs gibi yük taşımayan alanlarda kemik tespiti için, ya da kapama sırasında kemikle periost arasına yapıştırıcı olarak kullanılmaktadır.¹⁰⁴ Bunun yanında osteoindüktif etkisi de, araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Osteoindüktif etkisi olmadığını belirten yayınlar yanında, osteoindüktif etkiyi gösteren çalışmalar da vardır. Bu özeliğinden yararlanmak amacıyla kemik greftleriyle ve kemik benzeri ürünlerle kombine kullanımı tarif edilmiştir. Bu tür greftleri bir tutkal gibi bir

arada tutması da başka bir avantajdır. Daha çok deneysel olan bir başka kullanımında ise, kültürde üretilmiş periosteal hücrelerle ya da büyüme faktörleriyle taşıyıcı olarak kırık iyileşme alanlarına uygulanmıştır.^{1,38,46,72,86,87,96}

Trombosit zengin plazma ile yapılan çalışmaların bir kısmı, bu ürünün osteoindüktif etkisi olduğunu savunurken, azımsanamayacak sayıda çalışma da klinik yararı olmadığını öne sürmektedir.^{88,105} Trombosit zengin plazma'ya göre daha uzun yıllardır kullanılmasına rağmen, osteoindüktif etkideki belirsizlik FY için de devam etmektedir. Bu tez çalışmasında, iki ürünün gerek içerik olarak trombosit yoğunluğu hariç benzemesi, gerekse aynı mekanizma ile çalışması nedeni ile kemik iyileşmesine katkılarının deneysel olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla günümüzde en sık kullanılan deneysel model olan, tavşan kraniyumunda oluşturulan ve kendi kendine kapanması beklenmeyen en küçük boyutta kemik defekti (kritik boyutta kemik defekti) tercih edilmiştir. Defektin boyutu hakkında farklı yayınlar olsa da, en sık kullanılan 15 mm çaplı daire biçiminde tam kat defektlerdir.^{7,15,29,31,37,43,85} Gruplar oluşturulurken ise, Grup I cerrahi kontrol olarak planlanmıştır. Grup II ise TZP ve FY'de ortak olarak kullanılan trombin ve kalsiyumun etkisini izleyebilmek amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir. Grup III FY, Grup IV ise TZP grubu olarak planlanmıştır. Bu tür çalışmalarda, bilateral defektlerden birinin kontrol, diğerinin çalışma grubu olarak tasarlanması sıkça karşılaşılan bir durumdur. Ancak tek kesiden cerrahi yapıldığında, başta sıvı olan bu maddelerin karşı defekte geçmesini önlemek hemen hemen imkansızdır. Farklı kesilerden, orta hatta yumuşak dokular kemikten ayrılmadan defektler hazırlanıp, maddeler uygulansa bile, bu maddelerin lokal ve sistemik etkileri göz ardı edilemez. Bu nedenle, bu deneyde her

iki defekte de aynı madde uygulanıp, maddelerin muhtemel lokal ve sistemik etkilerinin diğer grupları etkilemesinden kaçınılmıştır.

Değerlendirme radyolojik alan ölçümlerinin gruplar arasında 0., 4. ve 16. haftalar için karşılaştırılması, 16. hafta için gruplar arasında yeni oluşan kemik yoğunluğunun karşılaştırılması ve histolojik olarak 4. ve 16. haftalarda gruplar arasında birincil kemik trabekülü, ikincil kemik trabekülü, damarlanma, kemik iliği ve bağ dokusunun karşılaştırılması ile yapıldı.

Hemen cerrahi sonrası (0. hafta) yapılan radyolojik alan değerlendirmesi, oluşturulan defektlerin alanları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını gösterdi. P değerinin de yüksek olması, gruplar arasında cerrahi defekt alanı açısından standardizasyonun sağlandığını gösteriyordu.

Dördüncü hafta için yapılan ölçümler sonucunda gruplar arasında anlamlı fark saptanamadı, ancak TZP ve FY gruplarının benzer iyileşme gösterdiklerini izlemek mümkündü. Her iki grup da kontrol ve trombin grubuna göre daha hızlı bir iyileşme göstermişlerdi. Trombin grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark saptanmasa da, tüm gruplar içinde en yavaş iyileşme bu grupta izlendi.

Onaltıncı haftada da TZP ve FY gruplarının daha hızlı bir iyileşme gösterdiği gözlemlendi. Ancak istatistiksel olarak bu iki grup ile kontrol grubu arasında fark saptanamazken, trombin grubu ile anlamlı fark saptandı. Onaltıncı haftada da anlamlı fark izlenmese de trombin grubunda iyileşme, kontrol grubuna göre daha yavaştı.

Her dört grupta da başlangıçta oluşturulan defektler arasında fark saptanmamasına rağmen, 4. ve 16. haftalardaki alanlar arasındaki farkın az olması nedeni ile başlangıçta oluşturulmuş olan defektlerdeki birkaç mm²'lik farkın sonucu etkileyebileceği düşünüldü. Bu

nedenle grupların ameliyattan hemen sonra (0.hafta) ölçülen defekt alanına göre 4. ve 16. haftadaki alanlarının yüzde oran ortalamaları açısından karşılaştırılmasına karar verildi. Dördüncü hafta için alan yüzde oranları değerlendirildiğinde, trombin grubu ile TZP ve FY grupları arasında anlamlı fark saptandı. Onaltıncı haftada ise kontrol grubu ile TZP grubu ve trombin grubu ile TZP ve FY grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi.

Yeni oluşan kemiğin 16. haftadaki yoğunluğu açısından yapılan değerlendirmede ise hem TZP grubunda, hem de FY grubunda kemik yoğunluğu ilk iki gruba göre anlamlı olarak fazla idi.

Radyolojik parametreleri bir bütün olarak yorumlandığında, trombin grubu en yavaş iyileşmeyi sergiledi. Hatta bu grupta 4. haftada alanın 0. haftaya göre minimal de olsa arttığı tespit edildi. Literatür bu bulgu üzerine incelendiğinde, trombinin kemik rezopsiyonu yaptığına ve osteoblastik aktiviteyi arttırabildiğine dair çalışmalara rastlandı.^{42,49,76,90,93,94,95} Kontrol grubu genel olarak trombin grubuna benzer ama biraz daha hızlı bir iyileşme sergilerken, TZP ve FY grupları hem 4. hafta, hem 16. hafta sonunda bu iki gruptan belirgin olarak daha hızlı iyileşmişlerdi. Trombosit zengin plazma grubu ise FY grubu ile benzer iyileşme sergiledi. Hiçbir haftada ve hiçbir değerlendirmede bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Ancak TZP grubu FY grubuna göre, anlamlı fark olmamasına rağmen daha hızlı iyileşme gösteriyordu. Bu çalışma radyolojik olarak TZP ve FY'nin kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu yönünde güçlü ipuçları vermektedir. Trombinin ise negatif etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Trombosit zengin plazma ile FY'nin etkileri karşılaştırılırken, TZP içindeki trombosit konsantrasyonu (dolayısı ile büyüme hormonu miktarı) önemli bir faktördür. Biz çalışmamızda plazmadaki trombosit oranını 3,8 kat

arttırabildik. Bu iki grup arasında TZP lehine olan zayıf iyileşme farkı, ileri çalışmalarda TZP'deki trombosit konsantrasyonu arttırılarak daha güçlü hale getirilebilir.

İntramembranöz kemikleşme, mezenşimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesi ile meydana geldiğinden, 4. hafta sonunda beklendiği şekilde histolojik olarak tüm gruplarda yoğun bağ dokusu izlendi. Onaltıncı hafta sonunda ise kontrol ve trombin grubunda daha fazla bağ dokusuna rastlanırken, TZP grubunda daha fazla olmak üzere, TZP ve FY gruplarında bağ dokusu yerini önemli ölçüde kemik dokuya bırakmıştı.

Kemikleşme açısından histolojik verilere bakıldığında, 4. haftada tüm gruplarda birincil kemik trabekülleri tespit edilirken, TZP ve FY grubunda daha yoğun izlendi. İkincil kemik trabekülleri ise, kontrol ve trombin grubunda hiç izlenmezken, FY grubunda çok az, TZP grubunda ise nispeten fazla olarak izlendi. Onaltıncı haftadaki kemikleşme değerlendirildiğinde, birincil kemik trabekülleri açısından gruplar arasında fark saptanmamasına rağmen, ikincil kemik trabekülleri açısından fark vardı. Trombosit zengin plazma grubunda daha fazla olmak üzere, TZP ve FY gruplarında birincil trabeküller yerlerini önemli ölçüde ikincil trabeküllere bırakmışlardı. Kontrol ve trombin grubunda ikincil trabekül oluşumu daha az izlendi. Başka bir deyişle, TZP ve FY'nin 4. haftada kemikleşme üzerinde oluşturdukları etki 16. haftada da devam ediyordu.

Kemik iliği, ikincil kemik trabeküllerinin oluşumu sırasında trabeküller arasında oluşan boşluklarda oluştuğu için, ikincil kemik trabekülü oluşumu ile paralellik göstermesi beklenebilir. Nitekim, bu çalışmada da kemik iliği oluşumu ikincil kemik trabekül oluşumuna benzer bulgular verdi. Dördüncü haftada kontrol ve trombin gruplarında hiç kemik iliğine rastlanmazken, FY grubunda çok az, TZP grubunda ise nispeten fazla olarak izlendi. Onaltıncı

haftada ise, TZP grubunda daha fazla olmak üzere, TZP ve FY gruplarında kontrol ve trombin grubuna göre daha fazla kemik iliği oluşumu gözlemlendi.

Damar oluşumu açısından değerlendirildiğinde ise, 4. ve 16. haftalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı. Dördüncü haftada FY grubunda diğer gruplara göre damar oluşumu biraz daha fazla izlenirken, 16. haftada tüm gruplarda benzer oranlar saptanmıştı. Özellikle TZP'nin içerdiği büyüme faktörleri özellikle de VEGF göz önüne alındığında, damarlanmanın bu grupta artmış olarak saptanması beklenebilir. Ancak çalışmada gruplar arasında fark saptanamamıştır.

Histolojik verileri toplu olarak yorumladığımızda, kontrol ve trombin grubunda kemik iyileşmenin TZP ve FY grubuna göre daha yavaş olduğu söylenebilir. Kontrol grubu ile trombin grubu arasında radyolojik parametrelere göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasına rağmen, trombin grubunda iyileşmenin biraz daha yavaş olduğu izlenmişti. Ancak histolojik parametreler bu yönde bir bulgu vermemiş, trombin grubunda kontrol grubuyla hemen tüm histolojik parametrelerde benzer bulgular gözlenmiştir. Fibrin yapıştırıcı grubu ile TZP grubu arasında radyolojik parametrelere göre de istatistiksel fark saptanmamasına rağmen, TZP grubunda iyileşmenin biraz daha hızlı olduğu izlenmişti. Bu bulguyu damar oluşumu hariç, diğer histolojik veriler de desteklemektedir. Özellikle 4. hafta sonundaki ikincil kemik trabekülü ve kemik iliği oluşumu başta olmak üzere hemen tüm histolojik parametreler TZP ile kemik iyileşmesinin FY'ye göre biraz daha iyi olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak TZP grubu tüm gruplar içinde en hızlı kemik iyileşmesi izlenen gruptu. Büyüme faktörlerinin kemik defekti olan bölgede trombositlerden salınması sonrasında, yarılanma ömürleri dakikalarla ifade edilecek kadar kısadır. Bu etki süresini uzatabilmek için

rekombinant büyüme faktörleri, yavaş salınımlı malzemeler olarak tasarlanmış ve deneysel olarak kullanılmışlardır. Trombosit zengin plazma'da da tüm büyüme faktörlerinin birden salınmadığı muhtemeldir. Ancak bu durumda bile dolaşımdaki ortalama trombosit ömrünün 8-10 gün olması nedeniyle, maksimum etkinin bir hafta civarında olabileceği öngörülebilir. Trombosit zengin plazma'nın etki süresi kısa olduğu için, ilk haftalardaki kemik iyileşmesinin daha hızlı ve kaliteli olacağı, sonraki haftalarda diğer grupların aradaki farkı kapatacağı da güçlü bir hipotez olabilir. Ancak biz çalışmamızda, TZP'nin 4. haftada diğer gruplara oranla kemik iyileşmesinde sağladığı üstünlüğü benzer oranlarda 16. haftada da koruduğunu izledik. Diğer bir deyişle, TZP ile kemik iyileşmesi üzerinde kısa dönemde sağlanan etki, uzun döneme de yansiyabiliyordu. Burada 4. haftada TZP grubunda oluşan ikincil kemik trabekülleri ve kemik iliğinin 16. haftaya kadar olan kemik oluşumunu tetiklediği düşünülebilir. Trombosit zengin plazma grubunda, diğer gruplara göre daha erken kemik iliği oluşumunun osteojenik uyarıyı arttırdığı, böylelikle bu grupta uzun dönemde bağ dokusunun belirgin olarak azaldığı, sekonder kemik trabeküllerinin ise belirgin olarak arttığı ön görülebilir. Bu konu teorik olarak, TZP'nin kemik iyileşme ivmesini arttırdığı, bu ivme artışına bağlı uzun dönemde de erken döneme benzer sonuçlar izlendiği şeklinde yorumlanabilir.

Bu çalışmada FY'nin de kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi olduğu izlendi. Bu etki TZP kadar güçlü olmasa da, iki maddenin kemik iyileşmesi üzerine etkileri açısından birçok parametreye göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı. Sadece 4. haftada ikincil kemik trabekülü ve kemik iliği oluşumunda TZP lehine anlamlı bir artış vardı. Çalışmada kullanılan teknikle, plazma trombosit oranı 3,8 kat arttırılabilirdi. Başka bir çalışmada, daha yüksek konsantrasyonlarda hazırlanabilecek TZP ile düşük konsantrasyonda

hazırlanan TZP ve FY'nin kemik iyileşmesi üzerine etkileri karşılaştırılabilir. Böylelikle TZP ile FY arasında kemik iyileşme üzerine etki açısından saptanan fark, yüksek konsantrasyonlarda istatistiksel anlam kazanabilir.

Bu çalışmada saptanan bir diğer ilginç sonuç da trombinin kemik iyileşmesi üzerine negatif etkisi idi. Bu bulgu istatistiksel olarak net bir biçimde ifade edilemediyse de, radyolojik parametreler açısından, 4. hafta sonunda trombin grubunun daha yavaş bir kemik iyileşmesi sergilediği görüldü. Bu bulgu literatürde yer alan ve trombinin kemik rezorpsiyonu yapabildiğini ifade eden çalışmalarla örtüşüyordu. Biz çalışmamızda trombini TZP uygulamasıyla aynı dozda kullandık. Literatür bilgilerine dayanarak, daha yüksek dozlarda rezorpsiyon etkisinin daha net gözlenebileceği öngörülebilir. Ayrıca çalışmalarda trombinin osteoblastik aktiviteyi arttırdığından da bahsedilmektedir. Ancak biz çalışmamızda, bu yönde bir bulgu elde etmedik.^{42,49,76,90,93,94,95}

Bu çalışma sonucunda, TZP ve FY'nin kemik iyileşme üzerine olumlu etkileri saptanırken, bu iki madde arasında, TZP daha iyi gözükmesine rağmen, net bir fark ortaya konulamamıştır. Kemik iyileşmesi üzerine iki maddenin sağladığı yararlar arasındaki farkın saptanabilmesi için, TZP'nin daha yüksek trombosit konsantrasyonlarıyla hazırlandığı benzer çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Yüksek oranda büyüme faktörleri içeren ve otolog üretilebilen trombosit zengin plazma deneysel çalışmalardaki eksikliklere rağmen hızla klinik kullanıma girmiştir. Bu çalışmanın amacı kritik boyutta kemik defektlerinin iyileşmesine trombosit zengin ve fakir plazmanın etkilerinin karşılaştırılmasıdır.

Bu çalışmada 32 adet Yeni Zelanda tipi tavşan kullanıldı. Tavşanlar 4 gruba ayrılıp, her tavşanın bilateral paryetal kemiğinde birer adet 15 mm çaplı kritik büyüklükte tam kat kemik defekti yaratıldı. Defektlere Grup I'de (n=8) serum fizyolojik, Grup II'de (n=8) trombin solüsyonu, Grup III'de (n=8) trombosit fakir plazma, Grup IV'de (n=8) trombosit zengin plazma uygulandı. Deneklerin yarısı 4. hafta sonunda, diğer yarısı da 16. hafta sonunda sakrifiye edildi. Değerlendirme radyolojik alan ölçümlerinin gruplar arasında 0., 4. ve 16. haftalar için karşılaştırılması, 16. hafta için gruplar arasında yeni oluşan kemik yoğunluğunun karşılaştırılması ve histolojik olarak 4. ve 16. haftalarda gruplar arasında birincil kemik trabekülü, ikincil kemik trabekülü, damarlanma, kemik iliği ve bağ dokusunun karşılaştırılması ile yapıldı.

Radyolojik değerlendirme sonucunda, 4. ve 16. haftalarda Grup III ve IV'te ilk iki gruba göre defektte daha hızlı bir küçülme saptanırken, Grup III ile Grup IV arasında anlamlı fark saptanamadı. 16. haftada yeni kemik yoğunluğu da bu iki grupta daha yüksek saptandı. Histolojik parametreler göz önüne alındığında, 4. ve 16. haftalarda Grup III ve Grup IV'te yeni kemik oluşumunun daha hızlı ilerlediği, ancak bu iki grubun, grup IV lehine artmış olan 4. haftadaki ikincil kemik trabekül ve kemik iliği oluşumu hariç benzer histolojik bulgular verdiği gözlemlendi.

Sonuç olarak trombosit zengin plazma ve fibrin yapıştırıcının kemik iyileşme üzerine olumlu etkileri saptanırken, bu iki madde arasında osteogenezi hızlandırma açısından net bir fark ortaya konulamamıştır. Kemik iyileşme üzerine iki maddenin sağladığı yararlar arasındaki farkın saptanabilmesi için, TZP'nin daha yüksek trombosit konsantrasyonlarıyla hazırlandığı benzer çalışmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

Despite the insufficient number of experimental studies, autologously produced platelet rich plasma including high amounts of growth factors, introduced to clinical use rapidly. Aim of this study is to compare the effects of platelet rich and platelet poor plasma on healing of critical size bone defects.

Bilateral full-thickness critical size bone defects were created in the parietal bones of 32 New Zealand type rabbits which had been studied in 4 groups. In Group I (n=8) saline solution, in Group II (n=8) thrombin solution, in Group III (n=8) platelet poor plasma and in Group IV (n=8) platelet rich plasma were applied to the created defects before closure. Half of the rabbits were sacrificed at the end of the 4th week and the remainings were sacrificed at the end of the 16th week after surgery. Radiological defect area measurement results of 0th, 4th and 16th weeks were compared between the groups. In addition, densities of the newly-formed bones at 16th week were studied. Primary and secondary bone trabecule, neovascularization, bone marrow and connective tissue formation were compared between 4th and 16th week groups histologically.

After radiological examination, more rapid diminish in defect size was observed in Group III and Group IV than Group I and Group II both in 4th and 16th weeks, but there was not a statistically significant difference between Groups III and IV. Newly-formed bone densities were also found to be higher in these two groups at the end of the 16 weeks. New bone formation was detected to be more rapid considering histological parameters, in Group III and IV at 4th and 16th weeks. But these two groups have shown similar histological results except for increased secondary bone trabecula at the end of 4th week in group IV.

As a result, this study demonstrates that platelet rich plasma and platelet poor plasma might have favorable effects on bone healing but cannot reveal any difference between these two substances considering osteoinductive potential. In order to determine the difference between the beneficial effects of platelet rich and platelet poor plasma, similar studies using platelet rich plasma that have higher platelet concentrations are required.

KAYNAKLAR

1. Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A: Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials*. 23: 3023-3031, 2002
2. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG: Investigation of Platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 60: 1176-1181, 2002
3. Altmeyden J, Hansen E, Bonnländer GL, Horch RE, Jeschke MG: Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *J Surg Res* 117: 202-207, 2004
4. Anderson KW, Baker SR: Advances in facial rejuvenation surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11:256-260, 2003
5. 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
6. Aspenberg P, Virchenko O: Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 75(1): 93-99, 2004
7. Aybar Odstreil A, Territoriale E, Missana L: An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontol Latinoam*. 18: 63-7, 2005
8. Babbush CA, Kevy SV, Jacobson MS: An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent* 12: 24-34, 2003
9. Bancroft JD, Stevens A: *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork, Chapter 15, page 309-339, 1996
10. Banoth S, Alex JC: Current applications of platelet-gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 18:27-32, 2002

11. Beck LS, Amento EP, Xu Y, Deguzman L, Lee WP, Nguyen T, Gillett NA: TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J Bone Miner Res.* 8: 753-61, 1993
12. 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
13. 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
14. Boden SD: Bioactive factors for the bone tissue engineering. *Clin Orthop.* 367: 84-94, 1999
15. Bosch C, Melsen B, Vargervik K: Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 9: 310-6, 1998
16. 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
17. Brond AR, Rubin TC: Fracture Healing. *Surgery of the Musculoskeletal System.* 2nd ed. Churchill Livingstone, New York, page 93-114, 1990
18. Brown DM, Hong SP, Farrell CL, Pierce GF, Khouri RK: Platelet-derived Growth Factor-BB induces functional vascular anastomoses in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 92: 5920-5924, 1995
19. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, von Fraunhofer A, Schultz GS: Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β . *Ann Surg* 208: 788-794, 1988

20. Brown GL, Curtsinger LJ, Jurkiewicz MJ, Nahai F, Schultz G: Stimulation of healing of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plast Reconstr Surg* 88: 189-, 1991
21. 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
22. 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
23. Castro FP: Role of activated growth factors in lumbar spinal fusions. *J Spinal Disord Tech* 17: 380-384, 2004
24. Colville-Nash PR, Willoughby DA: Growth factors in angiogenesis:current interest and therapeutic potential. *Mol Med Today* 3:14-23, 1997
25. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: Robbin's pathologic basis of disease. 6th ed. WB Saunders Co, London, 1999
26. 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
27. Cruess RL. Healing of bone,tendon and ligament : Fractures. 2nd ed. Lippincott Co, Philadelphia, page 147-167, 1984
28. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R: The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: A Review. *Plast Reconstr Surg* 108(6): 1713-1726, 2001

29. Dodde R 2nd, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT: Spontaneous bone healing in the rabbit. *J Craniofac Surg.* 11: 346-9, 2000
30. 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
31. Frame JW: A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 38: 176-80, 1980
32. Freymiller EG, Agbaloo TL: Platelet –Rich Plasma: Ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 62: 484-488, 2004
33. Gartner LP, James LH: *Color Atlas of Histology*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Chapter 4, page 73, 2000
34. 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
35. 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
36. 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
37. 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
38. 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

39. Green DM, Klink B: Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg* 101(4): 1161-1162, 1998
40. 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
41. Gruber R, Karreth F, Frommlet F, Fischer MB, Watzek G: Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. *J Orthop Res* 21:941-948, 2003
42. Gustafson GT, Lerner U: Thrombin, a stimulator of bone resorption. *Biosci Rep.* 3: 255-61, 1983
43. Hollinger JO, Kleinschmidt JC: The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1: 60-8. 1990
44. Hsu C, Alto P, Chang J: Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg* 29A(4): 551-563, 2004
45. Huang LH, Neiva EF, Soehren SE, Giannobile WV, Wang HL: The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: a pilot human trial. *J Periodontol* 76: 1768-1777, 2005
46. 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
47. Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter 8, page: 144-146, 2003

48. 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
49. Karp JM, Tanaka TS, Zohar R, Sodek J, Shoichet MS, Davies JE, Stanford WL: Thrombin mediated migration of osteogenic cells. *Bone*. 37: 337-48, 2005
50. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol* 74(6): 858-864, 2003
51. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM: Bone growth factors. *Orthop Clin North Am*. 31: 375-388, 2000
52. Kierszenbaum AL: *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*, 1st ed. Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 131, 2002
53. 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
54. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Schumetherth 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
55. Krupski WC, Reilly LM, Perez S, Moss KM, Crombleholme PA, Rapp JH: A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors for treatment of chronic nonhealing wounds: Apreliminary report. *J Vasc Surg* 14(4): 526-536, 1991

56. 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
57. Kulber AD, Bacilious N, Peters E, Gayle LB, Hoffman L: The use of fibrin sealant in the prevention of seromas. *Plast Reconstr Surg* 99(3): 842-851, 1997
58. Landesberg R, Roy M, Glickman RS: Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich Plasma Gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 297-300, 2000
59. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ: Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone*. 19(1 Suppl): 1S-12S, 1996
60. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN: Growth factors in wound healing. *J Clin Invest* 84:640-646, 1989
61. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE: Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: *Tissue Engineering, Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Ed: Carol Stream, Quintessence Publishing Co, Illinois, 1999:71-83
62. 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
63. 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

64. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod* 85: 638-646, 1998
65. Marx RE: Quantification of growth factor levels using a simplified method of Platelet-Rich plasma gel preparation: Discussion. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 300-301, 2000
66. Mathes SJ: Repair and grafting of bone. In: *Plastic surgery*. 2nd ed. Saunders Elsevier Inc, Philadelphia, 639-718, 2006
67. Matras H: Fibrin seal: the state of the art. *J Oral Maxillofac Surg* 43:605-611,1985
68. 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
69. McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, Barbour R, Demetriou AA: Recombinant Basic Fibroblast Growth Factor accelerates wound healing. *J Surg Res* 45: 145-153, 1988
70. McGee GS, Broadley KN, Buckley A, Aquino A, Woodward SC, Demetriou AA, Davidson JM: Recombinant Transforming Growth Factor Beta accelerates incisional wound healing. *Curr Surg* 46: 103-106, 1989
71. Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, Tanaka K, Kumegawa M: Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology*. 131: 1075-80, 1992
72. 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

73. Nall AV, Brownlee RE, Colvin CP, Schultz G, Fein D, Cassisi NJ, Nguyen T, Karla A. Transforming Growth Factor- β 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122(2): 171-177, 1996
74. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 74(6): 849-857, 2003
75. Oliver DW, Hamilton SA, Figle AA, Wood SH, Lamberty GH: A prospective, randomized, double-blind trial of the use of fibrin sealant for face lifts. *Plast Reconstr Surg* 108(7): 2101-2107, 2001
76. Pagel CN, Sivagurunathan S, Loh LH, Tudor EM, Pike RN, Mackie EJ: Functional responses of bone cells to thrombin. *Biol Chem*. 387: 1037-41, 2006
77. Partsafas AW, Bascom DA, Jorgensen SA, Wax MK: Effects of Tisseel and FloSeal on primary ischemic time in a rat fasciocutaneous free flap model. *Laryngoscope* 114: 301-304, 2004
78. 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
79. 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

80. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J: Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes. *Blood* 96(10): 3334-3342, 2000
81. Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules’ constituents, secretion and functions. *Platelets* 12(5): 261-273, 2001
82. Roesel JF, Nanney LB: Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. *J Surg Res* 58: 449-459, 1995
83. 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
84. 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
85. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 205: 299-308, 1986
86. 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
87. 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
88. 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

89. Snyder EL, Calhoun BC: Topical platelet growth factor therapy: of lotions and potions. *Transfusion* 41: 1186-1189, 2001
90. Song SJ, Pagel CN, Pike RN, Mackie EJ: Studies on the receptors mediating responses of osteoblasts to thrombin. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 206-13, 2005
91. Spindler KP, Nanney LB, Davidson JM: Proliferative responses to Platelet-Derived Growth Factor in young and old rat patellar tendon. *Connect Tissue Res* 31(2): 171-177, 1995
92. Steed DL: Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. *J Vasc Surg* 21: 71-81, 1995
93. Stern PH, Stathopoulos VM, Shankar G, Fenton JW 2nd: Second messengers in thrombin-stimulated bone resorption. *J Bone Miner Res.* 5: 443-9, 1990
94. Tatakis DN, Dolce C, Dziak R. Thrombin's effects on osteoblastic cells. I. Cytosolic calcium and phosphoinositides. *Biochem Biophys Res Commun.* 164: 119-27, 1989
95. Tatakis DN, Dolce C, Dziak R, Fenton JW 2nd: Thrombin effects on osteoblastic cells. II. Structure-function relationships. *Biochem Biophys Res Commun.* 174: 181-8, 1991
96. Thorn JJ, Sørensen H, Wels-Fogh U, Andersen M: Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:95-100, 2004
97. Valbonesi M: Fibrin glue and cryo-platelet gel for surgical application in Italy. *Transfus Apher Sci* 30:137-138, 2004

98. 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
99. Vibe P, Pless J: Anew method of skin graft adhesion. *Scand J Plast Reconstr Surg* 17: 263-264, 1983
100. Vikjær D, Blom S, Hjørtning-Hansen E, Pinholt EM: Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci* 105: 59-66, 1997
101. Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G: The Harvest Smart PReP™ system versus the Friadent-Schütze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Impl Res* 14:233-239, 2003
102. Weiler A, Förster C, Hunt P, Falk R, Jung T, Unterhauser FN, Bergmann V, Schmidmeier G, Haas NP: The influence of locally applied Platelet-Derived Growth Factor-BB on free tendon graft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 32(4): 881-891, 2004
103. 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* 55: 1294-1299, 1997
104. Yavuzer R, Sari A, Kelly CP, Tuncer S, Latifoglu O, Celebi MC, Jackson IT: Management of frontal sinus fractures. *Plast Reconstr Surg*. 115:79-93, 2005
105. Yazawa M, Ogata H, Kimura A, Nakajima T, Mori T, Watanabe N: Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. *J Craniofac Surg* 15(3): 439-446, 2004

106. Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC: Growth factors and flap survival. *Microsurgery* 24(3): 162-167, 2004
107. Zhang F, Fischer K, Timek EK, Guo M, Cui D, Martin WD, Buncke HJ, Lineaweaver WC: Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg* 46: 314-319, 2001
108. Zhang F, Richards L, Angel MF, Zhang J, Liu H, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC: Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. *Br J Plast Surg* 55: 59-63, 2002
109. Zhang F, Oswald T, Linb S, Caib Z, Leia M, Jonesa M, Angela MF, Lineaweaver WC: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. *Br J Plast Surg* 56: 653-659, 2003
110. 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