

## **1.ÖZET**

### **İnsan Amniyotik Sıvısının Tek Başına ve İnsan Amniyotik Membranı İle Birlikte Uygulanmasının Ratlarda Kırık İyileşmesi Üzerine Etkileri (Deneysel Çalışma )**

Dr.Alper GÜLTEKİN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Balçova-İZMİR

Kemik kırıkları; ortopedi ve travmatoloji pratiğinde sık karşılaştığımız yaralanmalardan biri olup bu kırıkların yaklaşık %10 kadarlık bir bölümü kaynama sorunları nedeniyle cerrahi müdahale gerektirmektedir. Çok uzun zamanlardır kullanılan kırık tedavi yöntemlerinin(alçılı tespit, traksiyon vb.) yanı sıra, gerek kırık iyileşmesinin biyolojisinin gerekse de biyolojik faktörler ve matris komponentlerinin iyileşme üzerine etkilerinin anlaşılır hale gelmesiyle, iyileşme süresini kısaltmak ve kaynama oranlarını en üst düzeye çıkarmak için kırık tedavisinde bir takım yenilikler gündeme gelmiştir. Yaptığımız bu çalışmada, kırık iyileşmesinde olumlu etkileri gösterilen faktörleri içeren insan amniyotik sıvısının ve amniyotik membranının rat tibialarında oluşturulan kırık modelinin iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırıldı.

Klinik ve hayvan etik kurul onayları alındıktan sonra ağırlıkları 250–300 gr arasında değişen normal aktiviteye sahip, 36 adet Wistar erkek ratın 72 adet tibiası araştırmaya alındı. Deneklerin her iki tibialarında cerrahi disseksiyon sonrası tek transvers kırık hattı oluşturuldu ve intramedüller olarak tespit edildi. Denekler; tedavi uygulanmayanlar (kontrol grubu/grup 1), insan amniyotik sıvısı uygulananlar (grup 2), insan amniyotik sıvısı ile birlikte insan amniyotik membranı uygulananlar (grup 3) olarak üç gruba ayrıldı. Tüm hayvanların sakrifikasyon sonrası radyolojik grafileri çekildi. Tibiaların bir bölümü üçüncü hafta (n=34),

diğer bölümü ise altıncı hafta sonunda (n=32) histopatolojik olarak Modifiye Lane-Sandhu iyileşme kriterlerine göre puanlandı. Histolojik değerlendirmelerden sonra elde edilen veriler Mann Whitney U testi ve Wilcoxon testleriyle istatistiksel olarak değerlendirildi.

Uygulanan tedaviler, birbirleri arasında ve kendi dönemlerine ait kontrol grupları ile iyileşme potansiyeli açısından karşılaştırıldığında; üçüncü haftada kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken, tek başına amniyotik sıvı uygulanan grup (grup 2) kombine tedavi uygulanan gruptan (grup 3) istatistiksel olarak anlamlı şekilde iyi bulunmuştur(p=0,021). Altıncı haftada ise tek başına amniyotik sıvı uygulanan grubun (grup 2) sonuçları hem kontrol grubundan hem de amniyotik membran ve sıvının kombine uygulandığı gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha iyi bulunmuştur (sırasıyla p=0.036 , p=0.019). Amniyotik membran ve sıvının kombine uygulandığı grup (grup 3) ile kontrol grubu arasında altıncı hafta sonunda da anlamlı bir farklılık saptanmadı. Her üç grubun da kendi içlerindeki altıncı hafta sonuçlarının üçüncü hafta sonuçlarından daha iyi olduğu ve bunun kontrol grubu dışında iki deney grubunda da anlamlılık gösterdiği bulundu (sırasıyla p=0.037 ,p=0.041).

Sonuç olarak; yaptığımız çalışma amniyotik membranın kırık iyileşmesini uyarda etkisinin çok sınırlı olduğunu buna karşılık amniyotik sıvının tek başına lokal uygulanmasının ratlarda kırık iyileşmesinin uyarılmasında olumlu etkilerinin olabileceğini göstermiş ve bunun bir ön çalışma olarak ileride daha çok sayıda denekle yapılacak geniş çalışmalar için umut verici olduğunu düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kırık iyileşmesi, insan amniyotik sıvısı, insan amniyotik membranı

## **2.ABSTRACT**

### **The Effects of Human Amniotic Fluid Injection and Combined Application with Human Amniotic Membrane on Fracture Healing in Rats (An Experimental Study)**

Alper Gultekin,MD

Dokuz Eylul University,School of Medicine

Department of Orthopaedics and Traumatology

Izmir,Turkey

Fractures are among common injuries in orthopedics and traumatology practice.10% of these require surgical intervention due to healing problems. Besides the classical treatment methods (cast application, traction etc.), alternative treatment modalities are considered by understanding the biology of fracture healing and the availability of biological factors and matrix components to shorten the time required for healing and to maximize the union rates. Its shown that human amniotic fluid and human amniotic membrane contain factors that enhancing fracture healing. The purpose of this study was to determine the effects of human amniotic fluid and human amniotic membrane on fracture healing model in rats.

72 tibiae of 36 Wistar rats with normal activity weighing between 250-300 grs were included in the study following approval of both Animal Eperimental and Clinical Experimental Ethics Committee.Transverse fracture lines are created surgically in both tibiae of rats, then stabilized intramedullary. The samples were divided into three groups. The first group was left untreated following intramedullary fixation (control/group 1), human amniotic fluid was injected to the second group (group 2), human amniotic membrane wrapping and human amniotic fluid injection was both applied to the last group (group 3). X-Rays of all

samples were taken after they were sacrificed. Some of the tibiae were scored histopathologically using modified Lane-Sandhu Grading Scale at 3rd week (n=34) and the rest (n=32) at 6th week. The results were statistically analysed by Mann Whitney U and Wilcoxon tests.

There were no significant differences in the quality of healing between the control and treatment groups at 3rd week, but second group (amniotic fluid injection) has statistically better scores than combined therapy group (group 3) at 3rd week ( $p=0.021$ ). The results of second group (amniotic fluid injection) were statistically better than control (group 1) and combined therapy (group 3) groups at 6th week (respectively  $p=0.036$ ,  $p=0.019$ ). No statistically significant differences were detected between combined therapy group (group 3) and the control (group 1) at 6th week. The mean results of all groups at 6th week were better than 3rd week however this was statistically significant for two groups except the control (resp.  $p=0.037$ ,  $p=0.041$ )

We conclude that local injection of human amniotic fluid is effective but human amniotic membrane wrapping has very limited effect on fracture healing in rats. We suggest that, the results of this study are promising for further studies with larger sample groups.

Key words: Fracture healing, human amniotic fluid, human amniotic membrane

### **3.GİRİŞ VE AMAC**

Kemik kırıkları, ortopedi ve travmatoloji pratiğinde yaşlı ve genç tüm popülasyonda sık karşılaşılan bir durumdur. Kırık; sadece kemiğin değil çevre yumuşak dokuların da değişik oranlarda hasar gördüğü bir olaydır. Kırık iyileşmesi, kompleks birtakım hücrel ve biyokimyasal süreçler sonunda gerçekleşir. Bu süreçler birçok faktör tarafından uyarılarak kırık iyileşmesi olumlu ya da olumsuz yönde etkilenebilir.

Gerek cerrahi gerekse konservatif tedaviden sonra kırık iyileşmesi skar dokusu kalmadan orjinaline en yakın anatomik ve fonksiyonel özelliklerde olmaktadır. Tüm bu tedavi yöntemlerine rağmen kırıkların yaklaşık onda birlik kısmında kaynama ile ilgili sorunlar görülmektedir. Morbidite artışı,işgücü kaybı ve yüksek tedavi maliyetleri nedeniyle; kırık iyileşmesinin hızlandırılması ve kaynama oranının en üst düzeye çıkarılması için uygulanabilecek değişik tedavi yöntemleri araştırılmış ve bir kısmı kullanıma girmiştir. Kırık iyileşmesinin hücrel ve moleküler biyolojisinin açıklığa kavuşturulması ile beraber bu süreçlerde etkili birçok biyolojik büyüme faktörünün varlığı da ortaya konmuş ve çeşitli çalışmalarla kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri gösterilmiştir.

Hyaluronik asidin, gerek tek başına gerekse büyüme faktörleri ile birlikte taşıyıcı olarak kırık iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmak için deney hayvanları üzerinde birçok araştırma yapılmış ve olumlu etkileri bildirilmiştir.

İnsan amniyotik sıvısının (ikinci trimesterde alınan) yüksek miktarlarda büyüme faktörleri ve sitokinler içerdiği bilinmektedir. Ayrıca yüksek oranda da hyaluronik asit (HA) ve hyaluronik asit stimulan aktivatör (HASA ) taşımaktadır. Bu özelliği sayesinde insan amniyotik sıvısının, endojen ve egzogen olarak yarada HA oranını artırarak skar formasyonunu azalttığı ve doku iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir.

İnsan amniyotik membranı, iyileşmeyen yara ve ülserlerin tedavisinde, özellikle göz alanında birçok patolojide kullanılmaktadır. Deneysel olarak sinir ve fleksör tendon iyileşmesi üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir.

Yaptığımız literatür taramasında, insan amniyotik sıvısının ve insan amniyotik membranın ratlarda kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada amacımız, insan amniyotik sıvısının ve insan amniyotik membranının ratlarda kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

## **4.GENEL BİLGİLER**

### **4.1.Kemik dokunun yapısı ve histolojisi**

Kemik dokusu; canlı, oldukça iyi kanlanma ve innervasyona sahip, dinamik, mineralize bir bağ dokusudur. Sert, dirençli, aynı zamanda esnek ve kendine özgü büyüme mekanizması olan, kendi kendini tamir edebilme yeteneğine sahip bir dokudur(1,2).

Organik ve inorganik komponentlerin oluşturduğu matriks içine yerleşmiş hücrelerden oluşan yoğun kompozit bir yapıya sahiptir.Yapısı ve içeriği; yaşa, bulunduğu lokalizasyona ve mekanik özelliklerine bağlı değişiklik gösterebilir. Vücutta sağlam bir destek dokusu olmasının yanında aynı zamanda mineral dengesinin düzenleyicisi ve kan hücreleri rezervuarı olarak da görev alır(1,2,3).

Kemikler şekillerine göre üçe ayrılır(1):

- 1.Kısa kemikler (omurlar, karpal ve tarsal kemikler vs.)
- 2.Uzun (tübüler) kemikler (femur, tibia, humerus vs.)
- 3.Yassı kemikler (kafatası kemikleri, pelvis kemikleri, scapula vs.)

Kısa kemikler göreceli olarak ince korteksli iken, uzun kemikler kalın korteksli tübüler diafizlerin uç kısımlarında yer alan geniş metafiz ve epifiz ile karakterizedir(1,3).

Kemikler mikroskopik yapılarına göre iki tipe ayrılır(1,3,4):

- 1.İmmatür (Woven) kemik
- 2.Matür (Lamellar) kemik

İmmatür kemik embriyolojik hayatta ve hayatın ilk 3-4 yılındaki iskeleti oluşturur. 4-5 yaş üzerinde yerini hemen tamamen matür kemik dokusu almıştır. Ayrıca tendon ve ligaman yapışma yerlerinde, büyüme plaklarında, implantların osteointegrasyon sahasında, kırık iyileşmesi esnasında oluşan kallus yapısında, kemik yapımını uyaran medikal tedavilerde ve bazı metabolik hastalıklarda (Paget Hastalığı, Osteogenesis imperfecta vs.) da immatür kemik dokusu bulunur(1,3). İmmatür kemik lamellar kemiğe göre daha esnek, daha kolay deforme olabilen ve daha güçsüz yapıdadır(1,3,4).

Lamellar kemik doğumdan sonra görülmeye başlar ve gelişme ile beraber immatür kemiğin yerini alır. Lamellar kemikte 3-5 milimikron genişlikte tabakalar halinde paralel dizilimli yoğun kollajen fibrilleri sıkı bağlantı sağlar ve kemik dayanıklılığını artırır(1,3).

Matür kemikler santral yağlı veya hematopoetik kemik iliği, onu çevreleyen kemik doku ve periost ile karakterizedir. Kemik iliği, kök hücre kaynağı ve kemik dolaşımının önemli bir parçası olarak görev alır(1,3,4).

Lamellar kemik yapısal ve fonksiyonel olarak dört lamellar yapı içerir:

- 1.Spongioz kemiğin trabeküler lamellası
- 2.Kortikal kemiğin iç ve dış dairesel lamellası
- 3.İnterstisiyel lamella
- 4.Osteonal lamella

Osteon; lamellar kemiğin bir formu olup matür iskeletteki diafizeal kortekslerin büyük kısmı osteonlardan oluşur. Kemik boyunca uzunlamasına yerleşmiş dallanan ve anastomozlaşan silindirler şeklindedir. Osteonların merkezinde kan damarları, lenfatikler ve sinirleri içeren *havers kanalları* bulunur. Havers kanallarının çevresinde, içlerinde radial dizilimli osteositleri barındıran *lakunalar* bulunur. Lakunaların birbirleriyle ve Havers kanallarıyla olan bağlantılarını ise *kanaliküller* sağlar(1,3). Mineralize kemik matriksinden besin maddelerinin difüzyonu sınırlı olduğundan metabolik gereksinimleri ve kalsiyum dengesindeki rolleri için osteositler perikaryon ve sitoplazmalarını çevreleyen lakunalara ve kanaliküllere bağımlıdır(1,3). Osteonların kemik eksenine uzunlamasına yerleşmiş olmaları, diafizeal korteksin uzun eksenine paralel gelen gerilme ve kompresyon kuvvetlerine neden dayanıklı olduğunu açıklamaktadır. Her osteonun çevresinde osteonların dış sınırını oluşturan ince bir organik matriks tabakası bulunmaktadır. Bu ince tabakaya *sement hattı* denir. Bu tabaka rezorbsiyonun sonlanıp kemik yapımının başladığı sınırdır. Havers kanalları oblik yerleşimli vasküler kanallar aracılığıyla anastomozlaşırlar. Bu vasküler kanallara *volkmann kanalları* adı verilir. Bu intraosseöz kanallar endosteal ve periosteal bağlantıyı da sağlarlar(1).

Kanal ve lakunalar arasında kalan geniş ekstravasküler boşlukta iyon ve sıvı geçişi olur. Kemiğe binen yükler sıvı ve iyon akımı ile elektriksel potansiyel oluşturur(1). Mekanik yükler, elektriksel uyarılara yanıt verebilir özellikte olan kemik hücreleri üzerinde düzenleyici etki oluştururlar(5).

Bütün bu yapılar (osteon,kanalikül,volkmann kanalları,intersitisiyel ve trabeküler lamella) kemik yüzeyini arttırmaktadırlar(1).

Lamellar(matür) kemik yapısal organizasyonuna göre iki tiptir(1,3,6):

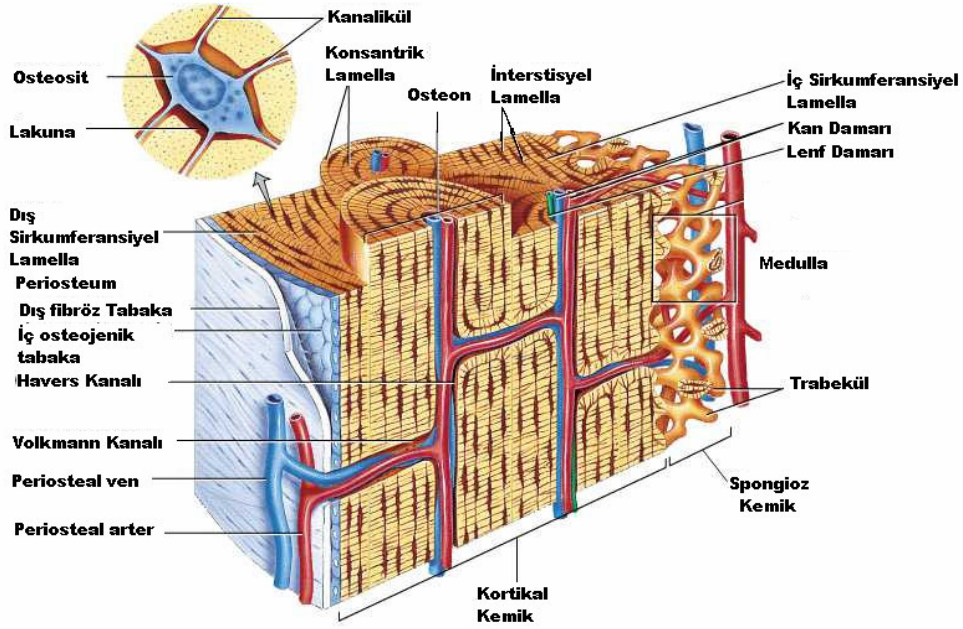
1.Spongioz (kansellöz, trabeküler) kemik

2.Kortikal (kompakt) kemik

Kortikal ve spongioz kemik matriksi içeriği ve yapısı olarak aynıdır. Fakat birim hacime düşen kemik matriks miktarı kortikal kemikte daha fazladır. Bu nedenle kortikal kemik daha yoğun ve daha az poroziteye sahiptir. Elastisite modülü ve kompresif dayanıklılık açısından kortikal kemik spongioz kemiğe göre on kat daha üstündür(1).

Spongioz kemiğin birim hacime düşen yüzey alanı kortikal kemikten yirmi kat daha fazladır. Kortikal kemikte hücreler kemik matriksi ile çevrelenmiş durumda iken, spongioz kemikteki hücreler lamellalar arasında veya trabeküllerin yüzeyinde yerleşmiş durumdadır(1).

Spongioz kemiğin metabolik aktivitesi, remodelasyon yeteneği ve dolayısıyla mekanik yüklerle karşı adaptasyon hızı kortikal kemiğe göre daha üstündür. Matür iskeletin %80'ini kortikal kemik oluşturur. Uzun kemiklerin diafizinde kalın, kısa kemiklerdeki yoğun spongioz kemik çevresinde ise ince bir kortikal tabaka vardır(1).



**Osteonlar(haversian sistem),Kortikal ve Trabeküler kemik yapısı**

© John Wiley & Sons, Inc.

**Şekil 1:Matür Kemik Dokusunun Mimari Yapısı**



## 4.2.Periost

Sinovyal eklem yüzleri ve çevresi dışında kalan kemiklerin dış yüzeylerini çevreleyen, mekanik ve biyolojik öneme sahip bir yapıdır.

Periost genel olarak iki tabakadan oluşur(1,4,7,8,9):

1.Dış tabaka (Fibröz tabaka)

2.İç tabaka (kambiyum veya osteojenik tabaka)

Daha sonra yapılan histolojik çalışmalar periostu zone I-II-III olmak üzere üç katmana ayırmıştır(7,8). Zone II; iç tabaka yani klasik kambiyum tabakasına, Zone III; dış fibröz tabakaya karşılık gelirken, Zone I ise en iç yüzeyde osteoprogenitör hücrelerin yoğun olduğu tabakayı temsil etmektedir(7).

Dış tabaka hücreden fakir, kollajenden ve fibroblastlardan zengin yoğun fibröz bir tabakadır. İç tabaka ise damarsal yapı ve hücrel olarak zengin gevşek bir tabakadır(1,4,7). İç tabaka, osteoblasta dönüşebilme yeteneği olan hücreler içerdiğinden kambiyum veya osteojenik tabaka da denir(1,7). Periosteal hücreler lokal ve sistemik uyarılar sonucu kemik yapımı, yıkımı ve metabolizmasında da rol oynar(1,8,9). Bu hücreler; gelişim sırasında organik matriks üretimi yaparak kemiğin çapının genişlemesinde, kırık iyileşmesi esnasında ise hyalin kıkırdak yapımı sağlayarak ekstraosseöz kallus oluşumunda rol alırlar(1).

Periost yaşa bağlı değişim gösterir. Kambiyum tabakası çocuklarda kalın ve çok aktif iken yaş ilerledikçe periost incelik ve osteojenik kapasitesi azalır(1,4).

## 4.3.Kemik Dokusunun Kanlanması

Birkaç istisna lokalizasyon dışındaki tüm uzun kemiklerin kan dolaşımı aynı yapıda olup esas olarak kemiğin birbiri ile anastomozlaşan iki tip dolaşımı vardır(1):

a.Periosteal-diafizeal-metafizer sistem

b.Epifizeal-fizeal sistem

a.Uzun kemiklerin diafiz ve metafizlerinin kanlanması üç kaynaktan gerçekleşir(10,11):

1.Nutrisyen arterler

2.Epifiz ve metafizi penetre eden arteriyal kompleks

3.Periosteal arterler

Nutrisyen arterler kemiğe diafizden girerler ve proksimal-distal dallara ayrılırlar. Periosteal ve metafizer dallarla beraber medüller vasküler sistemi oluştururlar. Medüller vasküler sistem ve metafizi penetre eden arterler aracılığıyla anastomoz yaptığı periosteal arterler, metafiz ve diafize dual kan akımı desteği sağlarlar(12,13). Bu dual dolaşım sistemi, kemik ve yumuşak doku travmaları sonrası metafiz ve diafizin nasıl canlı kaldığını açıklamaktadır. Aynı zamanda medüller rimerizasyon veya periosteal sıyrıma sonrası kırık iyileşmesinin nasıl gerçekleşebildiğini de açıklayabilir(12,13,14).

Periosteal arterler çevre yumuşak doku ve kas dokusu için de dolaşım desteği sağlar.Kas dokusunun nutrisyen arteri hasar görse bile kas-periost bileşkesi sağlam kaldığı sürece kas kan akımında düşüş görülmez(15).

**b.** Birçok epifizin kan akımı, metafiz-periost-diafiz kan akımına göre daha düşüktür. Fizis kapandıktan sonra damarlar fizikal skarı penetre ederler. Fakat bu damarların o esnadaki fonksiyonel önemi net olarak belli değildir(1,16,17).

#### **4.4.Kemik Hücrelerinin Histofizyolojisi**

Kemikle ilişkili birçok hücre mevcut olup bunlardan kemik üretimi, yıkımı ve yapısını oluşturmada görevli kemiğe spesifik üç ana hücre tipi önem taşımaktadır(1,2,3,18). Bunlar:

- 1.Osteoblastlar
- 2.Osteositler
- 3.Osteoklastlar

Tüm bu hücreler iki farklı kök hücreden gelişir. Farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler çevre yumuşak doku, endosteal ve periosteal yüzeylerde, kanallarda ve kemik iliğinde yerleşmiş olup gerektiği durumlarda gen etkileşimleri ve çeşitli büyüme faktörlerinin uyarısıyla preosteoblast ve osteoblastlara farklılaşırlar(1,2,3,18,19,20). Hematopoetik kök hücre ise preosteoklast ve osteoklast kaynağı olarak bulunur(1,2,3,18,21). Özellikle osteoblastlarca salınan M-CSF(makrofaj koloni stimulan faktör) uyarısıyla osteoklasta farklılaşma görülür(18).

Farklılaşmamış mezenkimal kök hücre dışında vasküler perisitler de preosteoblast kaynağıdır(22,23).

##### **4.4.1.Osteoblastlar**

Osteoblastlar mezenkimal kök hücre ve perisitlerden köken alan 20-30 µm büyüklüğünde hücrelerdir. Aktif osteoblastlar; polihedral yapılı, oval şekilli, bazofilik

sitoplazma içinde eksantrik yerleşimli nukleus ve golgi cisimciği içeren, büyük granüllü endoplazmik retikuluma sahip hücrelerdir. Kemik yüzeyinde ve birbirleriyle sıkı bağlantılı şekilde yerleşirler(1,3,18). Transmembran proteinler ve integrinler, osteoblastların osteositlerle ve ekstrasellüler matriks ile iletişimini sağlarlar(18).

Osteoblastların; 1-kemik organik matriksindeki kollajen ve kollajen dışı proteinleri sentezlemek, 2-ekstrasellüler matriks fibrillerinin düzenini sağlamak, 3-Alkalin fosfataz(ALP) enzimi sayesinde osteoid materyalin mineralizasyonuna katkıda bulunmak, 4-sentezlediği sitokinler sayesinde osteoklastların rezorbsiyonuna aracılık etmek, 5-büyüme faktörlerini sentezlemek gibi çok önemli görevleri vardır(18).

Osteoblastlar günde ortalama 2-3 µm osteoid materyal ve matriks sentezler. Osteoblastın ortalama ömrü 1-10 hafta arasındadır(18). Parathormon ve lokal sitokinler osteoblastları stimüle ederek, osteoklastları aktive edecek mediatörleri salgılatırlar(1).

Aktif osteoblastların önünde üç farklı yol vardır; 1-kemik yüzeyinde kalarak sentez aktivasyonunu azaltıp yassı şekilli bone-lining hücreleri (kaplama hücreleri) haline almak, 2-etraflarını matriks ile çevreleyerek osteosit haline almak, 3-apoptozis nedeniyle kemik yapım sahasından kaybolmak(1,18).

Bone-lining hücreleri uzamış ve yassı şekilli, iğsi nukleus ve az miktarda organel içeren hücreler olup endosteal yüzeyde yer alırlar(18). Bu hücreler, istirahatteki osteoblastlar veya yüzey osteositleri olarak da adlandırılır(1). Osteoblastik belirteçler olarak bilinen sialoprotein, osteopontin, osteonektin ve ALP açığa çıkarırlar(18). Parathormon etkisiyle bu hücreler kemik yüzeyini osteoklastların yapışması için uygun ortam haline getirerek kemik rezorbsiyonunun başlangıcına aracılık ederler(1,3).

#### **4.4.2.Osteositler**

Matür iskelet dokusunda yer alan kemik hücrelerinin %90'ı osteositlerden oluşur(1). Osteoblast ve osteoklastlar kemik yüzeyinde yer alırken osteositler mineralize matriks içinde yer alırlar. Osteositler aktivitelerine bağlı sitoplazmik organel içeriği farklılık gösteren, tek nukleuslu, sitoplazmik uzantıları olan elipsoid hücrelerdir(1,3,18).

İçerisinde bulunduğu mineralize matriks ile olan ilişkisinden dolayı ekstrasellüler sıvıdaki iyon konsantrasyonuna etki ederek özellikle kalsiyum dengesinde önemli rol oynarlar(1,3).

Osteositler osteoid matriks sentezi ve mineralizasyonunda önemli rol almalarına rağmen esas görevleri; kemik remodelasyonunu kontrol etmek ve kemiğe gelen yüklerin mekanik özelliklerini algılamaktır. Membran reseptörü olan CD44 osteoblast ve lining hücrelerinde negatif iken osteositlerde pozitifdir ve osteosit belirteci olarak düşünülmektedir(18).

#### **4.4.3.Osteoklastlar**

Osteoklastlar, mineral fazı ve kalsifiye dokuları resorbe eden, çok nukleuslu, mitokondri ve vakuolden zengin, ortalama 100 µm büyüklükte dev hücrelerdir(1,3,18). Tartrata dirençli asit fosfataz (TRAP) sayesinde diğer dev hücrelerden ayrılır(3,18,21). Diğer kemik hücrelerinden farklı olarak hematopoetik kök hücrelerden yani GM-CFU (granulosit-makrofaj coloni forming unit)'dan gelişir. Osteoklastlar kalsitonin reseptörlerine sahiptir(18). Mikrofilamanlardan zengin ve integrinler sayesinde mineralize matrikse bağlanmayı sağlayan pürüzsüz bölge ile rezorbsiyon işleminin gerçekleştiği pürüzlü yüzey osteoklast hücre membranının iki önemli bölgesidir(1,18). Kansellöz ve periosteal yüzeylerde osteoklastlar *Howship lakunaları* adı verilen karakteristik çukurları oluştururlar(1,3).

Osteoklastlar kemik yüzeyine yapışarak rezorbsiyonu başlatırlar. Karbonik anhidraz sayesinde asit sekresyonu yaparak pH'ı 7'den 4'e düşürürler ve asit ortam yaratarak mineral fazı rezorbe ederler. Kollajen ve organik matriksi ise proteolitik enzimler (kollajenaz, metalloproteaz, glukuronidaz, katepsin K vb.) ile rezorbe eder(1,3,18). Günde ortalama 50 µm veya daha fazla bir tabakayı rezorbe ederler(3). Osteoklastlar aktiviteleri bittiğinde, gerektiğinde aktif osteoklast haline gelebilecek mononükleer hücrelere dönüşür(1).

#### **4.5.Kemik Matriks Bileşimi**

Kemiğin ekstrasellüler matriksi organik ve inorganik fazlardan oluşan kompozit bir materyaldir(1,2,3,4). Kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %95'ini oluştururlar. Kemiğin yaş ağırlığının %65'ini inorganik komponent, %20'sini organik komponent, %10'unu su, geri kalan %5'ini ise diğer organik moleküller ve amorf inorganik tuzlar oluşturur(1,3). Organik komponent primer olarak kollajenden oluşup kemiğin gerilim direncini oluştururken, inorganik komponent mineral kristallerinden oluşur ve kemiğin kompresyona direncini sağlar(1). Organik ve inorganik faz arasında yakın ilişki mevcuttur(3).

#### 4.5.1.Organik Matriks (organik faz)

Organik matriks; tendon, ligaman ve eklem kapsülü gibi yoğun fibröz dokuların matrikslerine benzer yapıdadır(1). %90'ı kollajenden oluşmaktadır. Diğer %10'luk kısmı ise kollajen dışı proteinlerden oluşmaktadır(1,2,3). Kollajen içeriğinin yaklaşık %95'ini Tip I kollajen oluşturur. Yaklaşık %5'ini Tip V kollajen oluştururken, çok düşük oranda da Sharpey lifleri ile ilişkili olarak Tip III kollajen görülür. Mekanik stres altında Tip XII kollajen de oluşur(1,2). Tip I kollajen kendine has aminoasit içeriği (özellikle hidrosilizin ve hidrosiprolin), göreceli büyük çaplı fibrilleri ve büyük tensil güçlere maruz kalan tendon ve ligamanlarda da yer almasıyla diğer kollajenlerden ayrılır. Miktarında azalma veya yapısında bozulma olması kemik kırılmasını artırır(1). Tropokollajen moleküllerinin birleşme yerlerinde oluşan boşluklar hidroksiapatit kristallerinin depolandığı alanlardır. Kollajen bileşimi; yüksek gerilim dayanıklılığı ve solid yapı olarak kemiğin dış mekanik özelliklerinden sorumludur(3).

Organik matrikste bulunan kollajen dışı proteinler(1,2,3,24):

**a.Proteoglikanlar:** Kollajen dışı proteinlerin %10'unu oluşturur. Osteoid matrikste hyaluronik asit, kondroitin sülfat, biglikan ve dekorin olmak üzere dört tipi mevcuttur.

**b.Gamakarboksiglutamik asit (GKGA) içeren proteinler:** Osteokalsin ve GKGA içeren matriks proteini olmak üzere iki tipi mevcuttur. GKGA içeren matriks proteini sentezi K vitamini gerektirir ve kalsiyum bağlayıcıdır. Osteokalsin (Gla proteini) ise osteoblast ve plateletlerce sentezlenen, sentezi D ve K vitaminine bağımlı olan, kollajen dışı proteinlerin %15'ini oluşturan osteogenezisin biyokimyasal belirteçidir.

**c.Glikoproteinler:** Osteonektin, kollajen dışı proteinlerin %25'ini oluşturur. Matriks ve hücreler arası adezyonda önemli rol oynar. Osteonektin kemik spesifik değildir. Osteopontin, kemik sialoprotein, fibronektin, trombospondin ve vitronektin hücre yüzey reseptörü olarak görev alırlar. Osteopontin kemik spesifik bir proteindir.

**d.Plazma proteinleri:** Albumin ve  $\alpha$ 2-SH glikoprotein bulunur. Osteoid matrikse kalsiyum depolanmasında rol alırlar.

**e.Büyüme faktörleri:** Polipeptid yapıdadırlar. TGF- $\beta$  (transforming growth faktör), PDGF (platelet derived growth faktör), BMP (bone morphogenetik proteinler), IL-1,6 (interlökin), CSF (colony stimulan factor) ve IGF-I,II (insulin like growth faktör) bulunur.

#### **4.5.2. İnorganik Matriks (mineral faz)**

Kemiğin inorganik matriksi yani mineral fazı iki önemli fonksiyona sahiptir; iyon rezervuarı olarak görev görür ve kemiğin sertlik ile dayanıklılığını sağlar(1). Apatit kristalleri şeklindeki kalsiyum, fosfat ve karbonatın yanı sıra daha düşük oranda sodyum, potasyum, manganez ve floridden oluşur(1,2). Normal kemik mineral kristalleri hidroksiapatit kristalleri diye adlandırılmasına rağmen bu adlandırma doğru değildir. Hidroksiapatitte Ca/P oranı 5/3 iken kemikte bu oran 1,37-1,87 olup hidroksil grubu eksikliği vardır(1,2).

Karbonat ve asit fosfat grupları; apatit kristalleri ile ekstrasellüler sıvı ve organik matriks arasında bağlantı rolü oynar. Yaşlanma ile birlikte mineral kristallerinin içeriği değişir. Özellikle asit fosfat ve karbonat gruplarının konsantrasyonu değişir. Bundan dolayı iyon rezervuarlığı, hücreler üzerindeki etkileri ve mekanik özelliğe olan etkileri sadece mineral miktarına değil aynı zamanda mineral kristallerinin yaşına bağlıdır(1).

#### **4.6. Kemik Yapımı (Osteogenesis)**

Osteoblastlar, çeşitli durumlarda kemik matriksi üretirler. Embriyonik gelişim sırasında, kemik büyümesi sırasında, remodelasyon sırasında, yumuşak doku travması sonucu gelişen myozitis ossifikans ve heterotopik ossifikasyonda, kırık iyileşmesinde, neoplazi veya enfeksiyonlara yanıt olarak kemik üretimi yaparlar(25,26,27). Ayrıca kemik greftlemesi, distraksiyon, demineralize kemik matriksi (DBM) ve büyüme faktörleri (growth faktörler), elektriksel alan ve egzersiz gibi uyaranlar kemik yapımını stimüle ederler(25,28,29,30,31,32,33,34,35).

İlk olarak farklılaşmamış mezenkimal hücreler veya preosteoblastların osteoblastlara farklılaşması ve onların ekstrasellüler matriksi sentezlemesiyle başlar. Daha sonra matriks mineralize olarak osteoblastları çevreler ve osteositlere dönüşümünü sağlar. Ardından da osteoklastlar ortaya çıkar ve rezorbsiyon ile remodelasyon oluşur. İmmatür kemik yerini matür lamellar kemiğe bırakır(25).

İskelet sisteminde kemik yapımı üç farklı şekilde olur(3,25):

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

#### **4.6.1.Enkondral Kemik Yapımı**

Mineralize kıkırdağın model olarak kullanılarak kemik dokuya çevrilmesiyle oluşur(3). Embriyolojik hayatta uzun kemiklerin yapımı bu şekilde gerçekleşir(3,25). Uzun kemik, kısa kemik ve epifiz kemikleşme merkezlerinin oluşumundan sonra enkondral kemikleşme iskelet maturasyonuna kadar fizis ve epifizde devam eder(25). Doğumdan sonra stabil olmayan koşullardaki kırık iyileşmesinde rol alır(3,4,25).

Enkondral kemikleşme, önce farklılaşmamış hücrelerin bir araya gelip kondrositlere farklılaşması ve kıkırdak matriksi sentezlemesiyle başlar.Hyalin veya hyalin benzeri kıkırdak oluşumu sırasında diafiz çevresinde periost çevrelemesi görülür. Bazı bölgelerde kıkırdak matriks mineralize olur, kondrositler genişler, damarlar kıkırdağı invaze eder ve kan yoluyla gelen hücreler kıkırdağın merkezini rezorbe ederek medüller boşluğu oluştururlar. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşür ve mineralize kıkırdak üzerinde osteoid matriksi oluşturur. Daha sonra osteoklastlar bu kalsifiye kıkırdak ve immatür kemiği resorbe eder. Osteoblastlar rezorbe olan kalsifiye kıkırdak ve immatür kemik karışımının yerine matür lamellar kemiği oluşturur(25).

#### **4.6.2.İntramembranöz Kemik Yapımı**

İntramembranöz kemikleşmede kıkırdak bir model yoktur. Bağ doku desteğiyle matriksin doğrudan kalsifikasyonu ile oluşur. Yassı kemiklerin embriyolojik gelişiminde rol alır(3,25). Doğumdan sonra, kemik defektlerinin rejenerasyonu ve kırık tamirinde reaktive olur(3). Distraksiyon osteogenezisi sırasındaki kemik yapımı da kıkırdak model olmaksızın vaskülarize kollajen matriksten direkt gerçekleşir(25,32).

Membran veya tabakalar halinde farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin birikmesi ile süreç başlar. Bu hücreler; kan damarları, fibroblastlar ve osteoprogenitör hücreleri içeren gevşek yapılı organik matriksi sentezler. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşür ve osteoblastlar yığınlar halinde daha sonra mineralize olacak organik kemik matriksini biriktirir. Bu matriks adacıklarının yüzeyini osteoblastlar kaplar ve hızla yeni kemik matriksi ilave ederler. Matriksle çevrelenen osteoblastlar, uzun sitoplazmik uzantılara sahip osteositlere dönüşür. Oluşan osteoid matriks mineralize olarak matür kemik halini alır(25).

#### 4.6.3.Apozisyonel Kemik Yapımı

Apozisyonel kemik yapımı, kemiklerin periosteal genişlemesi ve kemik remodelasyonu sürecinde gerçekleşir. Mevcut kemik yüzeyinde osteoblastların dizilimiyle başlar. Bu hücreler üst üste dizilerek kemik lamellalarını oluşturan osteoidi sentezler. İskelet gelişimi ve büyüme sırasında, endokondral veya intramembranöz kemikleşme ile oluşan ilk kemik yapı periost ile çevrelenir. Periosteal osteoblastlar kemiğin dış yüzeyinde osteoid sentezleyerek yeni kemik üretir ve tabaka tabaka kemik çapını genişletir. Aynı zamanda kemik remodelasyonunun formasyon fazında osteoblastlar rezorbsiyon sahasında tabaka tabaka osteoid sentezlerler. Bu da apozisyonel kemik yapımı şeklinde olur(25).

#### 4.7.Kemikte Modelasyon ve Remodelasyon

Normal iskelet sistemi fonksiyonları için sadece kemik dokunun yapılması yeterli değildir. Fonksiyonlara uygun farklı şekillere sahip kemiklerin oluşması gerekmektedir. Kemik şeklinin oluşmasına *modelasyon* adı verilir. Kemiklerin şekilleri değişmeksizin yıkılıp yapılmasına yani kemik turnover'ına ise *remodelasyon* adı verilir. Modelasyon ve remodelasyon, tek bir hücre veya hücrel fonksiyon tarafından değil genellikle birlikte meydana gelir(3,25,36).

Kemiklerin şeklinin normal gelişimi başlangıç olarak gen ekspresyonuna bağlı olmakla beraber hareketlilik ve mekanik güçler de gelişim esnasında etkili faktörlerdir. Gelişim sırasında maruz kalınan radyasyon ve bazı ilaçlar da kemik şekli üzerine etkili dış faktörlerdendir(25).

Modelasyon; iskelet büyümesinde ve kırık malalignment sonrasında görülürken, remodelasyon hayat boyu devam eden bir süreçtir. Remodelasyon; avasküler, nekrotik kemik eliminasyonu ve kemikteki mikrohasarların lokal tamirinin yanı sıra, metabolik olarak kalsiyum ve fosfor homeostazı için de gerekli bir süreçtir(3,25,36,37,38).

Remodelasyon sayesinde her yıl kortikal kemiğin ortalama %5'i, trabeküler kemiğin ise %20'si yenilenmektedir. Total kemik dokusunun ise yılda yaklaşık %5-10'luk kısmı yenilenir(36). Hayat boyu devam eden bir süreç olmasına rağmen yaşa bağlı değişiklikler gösterir. Adolesan dönemde pik yapar ve 5.dekada kadar küçük değişikliklerle devam eder. Bu dönemden sonra ise rezorbsiyon dominant hale gelir ve 8.-9. dekadlarda maksimum kemik



miktarının yarısına düşer(25,36). Kadınlarda erkeklere göre %30 daha fazla kemik kaybı olur. Trabeküler kemik kaybı, trabekül kalınlığındaki azalmadan ziyade trabekül sayısında azalma şeklinde olur. Kemik yoğunluğu azalır. Kortikal kemik ise daha poroz bir hal alır. Sonuç olarak kemik kırılabilirliği artar(25).

Mikroskopik düzeyde remodelasyonun gerçekleştiği küçük kortikal ve trabeküler yüzey birimlerine ve buradaki hücre paketlerine BMU (basic multicellular units) adı verilir(3,25,36,37,38). İskelet dokusunda yaklaşık 30-35 milyon BMU bulunur ve her yıl ortalama 3-4 milyonu aktive olarak kemik dokunun %10'unu yeniler(36).

Remodelasyon çeşitli lokal ve sistemik faktörler tarafından düzenlenen hücresel bir döngüdür.Bu döngü temel olarak dört fazdan oluşmakla beraber çeşitli ara fazlarla birlikte (istirahat-aktivasyon-rezorpsiyon-geçiş-formasyon-mineralizasyon) oldukça organize bir süreçtir(25,36,37,38).

#### **4.8.Kırık ve kırık iyileşmesi**

Kırık; yalnızca kemiği değil beraberinde çevre yumuşak dokuları da etkileyen, kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasını ifade eden bir tanımdır(4,39).

Kırıklar; kuvvetin geliş yönüne, kemik doku sağlığına, kırık çizgisine, kırık fragman sayısına, travmanın derecesine, bulunduğu anatomik bölgeye, cilt ve çevre dokularda oluşan hasara göre çeşitli tiplere ayrılmıştır(39).

Kırık iyileşmesi; diğer dokuların iyileşmelerinden farklı olarak, kemiğin skar dokusu bırakmadan şekil ve fonksiyon olarak orijinaline en yakın şekilde kendini tamir etmesiyle oluşur. Bu tamir süreci oldukça kompleks ve aynı zamanda oldukça düzenli basamaklardan meydana gelmektedir. Bu süreçteki birçok biyokimyasal ve hücresel basamak; gelişim sırasında büyüme plaklarındaki basamaklarla paralellik göstermekle beraber, kırık iyileşmesinde bu süreç iyileşme ile sınırlıdır ve devamlılık göstermez(40).

Kırık iyileşmesinin temelde 2 tipi vardır(40,41 ,42):

1-Primer (direkt) kırık iyileşmesi

2-Sekonder (indirekt) kırık iyileşmesi

Primer kırık iyileşmesi anatomik redükte edilmiş ve rijid tespit uygulanmış durumlarda gerçekleşmekle beraber sekonder tipe göre daha nadirdir. Sekonder kırık iyileşmesi ise anatomik olmayan redüksiyonlar ve rijid olmayan tespit sonrası spontan oluşmakta olup kırık iyileşmesinin çok büyük bir bölümünü oluşturmaktadır.

Kırık iyileşmesi klasik olarak 3 basamakta gerçekleşir(40,43):

1-İnflamasyon dönemi

2-Onarım dönemi

3-Remodelasyon dönemi

Bu süreç; kesin sınırlarla ayrılmayıp birbiri içine giren basamaklar şeklinde gerçekleşir. Dönemler kendi içlerinde gerçekleşen hücresel aşamalara göre: Hematom oluşumu-inflamasyon-anjiogenez-yumuşak ve sert kallus gelişimi-remodelasyon şeklinde daha ayrıntılı basamaklarda da tanımlanabilir(41).

Kırık iyileşmesinde; medüller kanal-kırık uçları arasındaki interkortikal alan-periost ve subperiosteal alan-çevre yumuşak dokular oldukça önemli dört bölgeyi oluşturur(40,41). Periost ve çevre yumuşak dokular intramembranöz kemikleşme ile kırığı çevreleyen sert kallusu oluştururken, eş zamanlı olarak medüller kanal ve interkortikal alan ise encondral kemikleşme için öncü olan yumuşak kallusu oluştururlar(41).

#### **4.8.1 Rijid Fiksasyon Yapılmamış Kırıklarda Tamir**

İndirekt veya sekonder kırık iyileşmesi olarak da adlandırılmaktadır.

Kemik iliği, periost ve çevre dokularda travma sırasında zarar gören damarlardan olan kanama kırık çevresinde hematom oluşumuna yol açar. Bu hematoma organizasyonu iyileşmenin ilk basamağını oluşturur(4,40). Açık kırıklar ve açık redüksiyon yapılan kırıklarda hematom zarar görür ve bu iyileşme sürecini yavaşlatır. Hematom, fibrin skafold görevi görerek tamir hücrelerinin migrasyonuna neden olur. Trombositler ve zarar gören hücrelerden salınan inflamatuvar mediatörler kırık çevresinde ödem ve inflamatuvar hücrelerin bölgeye göç etmesini sağlarlar. Bu hücrelerin ve trombositlerin saldıdığı sitokinler ve büyüme faktörleri; progenitör hücrelerin farklılaşması, çoğalması ve anjiogenezin sağlanması gibi birçok basamakda rol alırlar(4,40).

Kırık sonrasında vasküler dilatasyon ve proliferasyona bağlı olarak kırık bölgesinde kan akımı bir miktar artar. Erken dönemde periosteal damarlardan kapiller tomurcuklanma ile oluşan damarlanma artışı belirginken, geç dönemde medüller nutrisyen arterler ön plana çıkar. Anjiogenez için fibroblast growth faktör (FGF) önemli bir mediatör olarak görülmele beraber bunun nedeni tam olarak açıklanamamıştır(4).

Kırık sonrası kırık uçları kan akımı bozulması sonucu nekroze olur ve ardından nekroze dokular rezorbe olur. Bu rezorbsiyonu; kan ve medulladan gelen monositik öncü hücrelerden gelişen osteoklastlar gerçekleştirir. Osteoblastlar ise kırık hattına göç eden farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile oluşur(1,25).

Periostun kambiyum tabakasındaki hücreler erken dönem kemik oluşumunu sağlar. Periosteal hücreler çocuk kırıklarında etkin rol oynar, çünkü periost kalın ve çok hücrelidir. Yaşla birlikte periost incelik ve kırık iyileşmesindeki etkinliği azalır. Kırık iyileşmesinde osteogenezisi sağlayan hücrelerin çoğunluğu hematomun yerini alan granülasyon dokusunda bulunur. Bunların bir kısmı yaralanma bölgesinden bir kısmı da dolaşım yoluyla periferden gelen farklılaşmamış öncü hücrelerden gelişir(4).

Kırık hattındaki mezenkimal hücreler çoğalıp farklılaşır ve fibröz doku, kırıkta, immatür kemik içeren kırık kallusunu üretirler. Tamir sırasında oluşan yumuşak ve sert kallus kırık bölgesini doldurur ve çevreler. Kallusun periferinde periost ve çevre yumuşak dokuların etkisiyle intramembranöz kemikleşme sonucu oluşan sert kallus yer alır. Santralde oksijen yoğunluğunun düşük olduğu bölgede ise, interkortikal alan ve medullanın etkisiyle kırıkta ve fibröz dokudan oluşan yumuşak kallus gelişir. Burada da kırıktağın yerini immatür kemik olarak endokondral kemikleşme olur ve kırık fragmanlarının stabilitesi artar. Bu safha kırık çevresinde yeni kemik köprülerin oluşması ve kortikal kemik uçlarının bütünlüğünün sağlanması ile devam eder(4).

Trombositler ve diğer hücrelerden salınan büyüme faktörleri ve diğer lokal mediatörler tamir hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlerler. FGF ve transforming growth faktör (TGF- $\beta$ ) kondrosit ve osteoblast proliferasyonunu sağlayarak, kırıkta ve kemik üretimini uyarıcı etki gösterirler. Dokunun oksijen içeriği kemik veya kırıkta üretimini belirlemede önemlidir. Oksijen yoğunluğunun düşük olduğu alanlarda kırıkta oluşurken, yeterli oksijene sahip olan bölgede mekanik ve elektriksel uyarının da etkisiyle kemik oluşumu görülür(4).

Kallus birtakım hücresel aktiviteler sonucunda mineralize olur. Hücreler önce yüksek konsantrasyonda Tip 1 kollajen fibrilleri içeren matriksi sentezler ve sonrasında hidroksiapatit kristallerinin depolanması için uygun ortam hazırlarlar. Mineralizasyonla beraber, oluşan internal ve eksternal kallusun etkisiyle kırık fragmanlarının stabilitesi giderek artmakta ve klinik kaynama oluşmaktadır. Yani ağrısız ve stabil hal almıştır. Radyolojik iyileşme ise klinik iyileşmeden daha geç görülür. Kırık uçları arasında trabeküler ve kortikal kemik köprüleşmesi şeklinde görülür(3,4).

Kırık iyileşmesinin final aşaması tamir dokusunun remodelasyonudur. İmmatür kemiğin yerini matür lamellar kemik alır ve kallusun fazlalık kısmı rezorbe olur. Remodelasyon klinik ve radyolojik kaynama sonrasında uzun süre devam eder. Elektriksel alan remodelasyonu etkiler. Strese maruz kaldığında konveks yüzeyde elektropozitivite, konkav yüzeyde ise elektronegativite oluşur. Elektropozitivite osteoklastik aktiviteyi, elektronegativite ise osteoblastik aktiviteyi uyarır(4,44). Remodelasyonun en önemli sonucu ise kemiğin mekanik stabilitesinde oluşan artıştır.

#### **4.8.2 Rijid Fiksasyon Yapılmış Kırıklarda Tamir**

Direkt veya primer kırık iyileşmesi olarak da adlandırılmaktadır.

Kırık uçlarının anatomik redüksiyonu ve rijid olarak tespiti yani mutlak stabilite sağlanması sonucu kortikal veya kansellöz kemikte kallus oluşumu olmaksızın gerçekleşen kırık iyileşmesine *primer (direkt) kırık iyileşmesi* adı verilir(3,4,40,42,43).

Anatomik redüksiyon ve rijid stabiliteye rağmen kırık uçları arasında temas alanları yanı sıra boşluk alanları da yer alır. Bu temas alanları ve boşluk alanlarında iyileşme, farklı şekillerde eş zamanlı olarak gerçekleşir(3).

Temas eden, komprese alanlarda; kırık uçlarının direkt teması sonucu kırık hattında direkt lamellar kemik oluşumu görülür. Kırık hattını kateden osteoklastların açtıkları tünellerde yeni damar oluşumları belirir. Bunların çevresindeki mezenkimal hücreler ve endotelyal hücreler osteoblastlara dönüşecek osteoprogenitör hücre kaynağını oluştururlar. Osteoblastlar kemiğin uzun eksenine paralel bu tünellerde ve iki kırık ucu arasında osteoid sentezler. Depolanan yeni kemik matriksi, içindeki osteositler ve yeni damarlar remodelasyon birimlerini oluşturur. Sonuçta haversien sistem kurulmuş olur.Osteonal migrasyon da denebilir(3,4,42,45).

Boşluk alanlarında ise kısa süre içinde mezenkimal hücreler ve yeni damarlar belirir. Osteoblastlar farklılaşarak osteoklastik rezorbsiyon olmaksızın kırık uçları arasında osteoid depolamaya başlar. Bu tamir apozisyonel kemik yapımı ile olur. Büyüme esnasında ve küçük kortikal defekt tamirindeki apozisyonel kemik yapımı ile sıkı benzerlik gösterir. 150-200 µm boyutlu küçük boşluklar konsantrik lamellar kemik ile doldurulur. Daha büyük boşluklar ise önce immatür kemikle doldurulup daha sonra konsantrik lamellar kemiğe dönüşür. İmplant çıkarıldıktan sonra vida deliğinin tamiri de bu şekilde gerçekleşir. Boşluk dolduktan sonra oluşan yeni kemiğin mekanik ve morfolojik özelliklerinin orijinale yakın hale gelmesi,

fragman uçlarının dolaşımının düzenlenmesi için ikinci aşama olan haversian remodelasyon gerçekleşir. Tamir dokusu yeni osteonlara dönüşür(3,4).

Direkt kırık iyileşmesinde baskın olan boşluk alanların tamiridir. Osteonal (haversian) remodelasyon yavaş ilerleyen bir süreçtir. Primer osteonal remodelasyon için anatomik redüksiyon ve rijid komprese tespitin yanı sıra intakt kan damarları gereklidir. Beslenmesi çevre yumuşak dokuya değil intramedüller vaskularizasyona bağlıdır(3,42).

### **4.8.3 Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler**

#### **4.8.3.1.Yaralanmaya Bağlı Faktörler**

**A)Yaralanmanın Şiddeti:** Yüksek enerjili yaralanmalarda, segmental ve açık kırıklarda; yumuşak doku hasarı, kemik ve yumuşak doku kaybı, kırık uçlarının deplasmanı ve kırık bölgesinin beslenme bozukluğu sık karşılaşılan sorunlardır. Tüm bu doku hasarları kırık bölgesinde nekrotik materyal hacminin artmasına neden olur. Ayrıca mezenkimal hücre göçüne ve vasküler invazyona engel olarak lokal kan akımının da azalmasına neden olur. Tüm bu koşullar kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Açık kırıklar da; hem kırık hematomunun zarar görmesi hem de yüksek enfeksiyon riski nedeniyle kırık iyileşmesini olumsuz etkiler(4,46).

Segmental kırıklarda intramedüller kan akımı da bozulacağından özellikle yumuşak doku desteğinin az olduğu tibiada sıklıkla distal fragmanda kaynama yokluğu ile kendini gösterir(47).

**B)Eklem içi Kırıklar:** Enzim içeriği yüksek sinovyal sıvı ile sürekli temas olması, anatomik redüksiyon ve genellikle bunun için gereken cerrahinin lokal kan akımını bozması, yüksek transartiküler kuvvetlere maruz kalınması gibi bir takım faktörler eklem içi kırıklarda iyileşme potansiyelini olumsuz etkilemektedir(4,46).

**C)Yumuşak Doku İnterpozisyonu:** Kırık fragmanları arasına; kas, fascia, tendon hatta damar ve sinir girmesi kırık iyileşmesini engelleyebilir. Kapalı redüksiyonda düzgün dizilimin sağlanamamasına neden olabilir ve açık redüksiyon gerektirebilir(4).

**D)Kan Akımının Zarar Görmesi:** Aşırı cerrahi disseksiyon, parçalı deplase kırıklar ve femur başı, skafoid, talus gibi kanlanması sınırlı bölgelerin kırıkları kaynama gecikmesi ve kaynama yokluğu için predispozisyon oluştururlar(4,46).

#### 4.8.3.2.Hastaya Bağlı Faktörler

**A)Yaş:** İskelet maturitesi tamamlanana kadar ki süreçte yaş kırık iyileşmesini önemli ölçüde etkiler. İnfantlarda kırık iyileşmesi en hızlı iken adolesanda infanta göre daha yavaştır. Maturite tamamlandıktan sonra ise yaşın anlamlı bir etkisi yoktur. Çocukta hem farklılaşmamış mezenkimal hücre sayısı fazla hem de farklılaşma daha hızlıdır. Remodelasyonun da hızlı olması deformitelerin korreksiyonunu sağlamakta önem taşımaktadır(4,46).

**B)Beslenme:** Kırık iyileşmesi sırasında kollajen, proteoglikan ve diğer makromoleküllerin sentezi için protein ve karbonhidrat gereksinimi doğar. Travma ve cerrahi, malnutrisyon ve immünitenin bozulmasına yol açar. Tek uzun kemik kırığı metabolik gereksinimi %20-25 arttırmaktadır(48). Leung ve ark. tavşanlarda iki haftalık kırık kallusundaki ATP içeriğinin normal kemikten 1000 kat fazla olduğunu göstermişlerdir(49). Deneysel bir çalışmada diyetel protein eksikliğinde kallusun dayanıklılığında ve enerji depolama kapasitesinde azalma gösterilmiştir(50). Bu nedenlerle travmalı hastanın tedavisine nutrisyonel destek mutlaka eklenmelidir.

#### **C)Sistemik Hormonlar:**

*Kortikosteroidler;* mezenkimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını inhibe ederek ve organik matriks komponentlerinin sentezini engelleyerek, kırık iyileşmesini olumsuz etkiler(46,51,52).

*Büyüme hormonu;* kırık iyileşmesi üzerine olan etkisi konusunda bir fikir birliği yoktur. Theyse ve ark.'ları yaptıkları deneysel çalışmada sürekli infüzyon şeklinde uygulanan büyüme hormonunun kemik defekt tamirinde uyarıcı etkisinin olduğunu, lokal uygulamanın ise kemik iyileşmesi üzerine etkisi olmadığını belirtmişlerdir(53).

*İnsülin ,tiroid hormonu, kalsitonin ve anabolik steroidler* de kırık iyileşmesi üzerine etki eden sistemik hormonlardır(4,46).

**D)Nikotin ve İlaçlar:** Nikotin kırık iyileşmesini olumsuz etkiler. Tavşanlarda tibial osteotomi sonrası nikotin verilen grupta kırık iyileşmesi çok daha yavaş gelişmiş ve nonunion daha fazla görülmüştür(54). Yorgancıgil ve ark.'ları nikotinin ratlarda kırık iyileşmesini geciktirdiğini göstermişlerdir. Bu etkinin de; vazokonstrüksiyon ve osteoprogenitör hücrelerin direkt tahribine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir(55).

*Non-steroidal antiinflammatory drugs* konusunda çok sayıda çalışma mevcut olup, bir kısmı kırık iyileşmesi üzerine anlamlı etkilerin olmadığını(56), bir kısmı ise olumsuz etkileri olduğunu(57) bildirmektedir.

*Düşük moleküler ağırlıklı heparin* için de bir kısım araştırmacılar kırık iyileşmesini olumsuz etkilediğini(58), bir kısım ise anlamlı etkisi olmadığını(59) bildirmektedir.

#### **4.8.3.3 Dokuya Bağlı Faktörler**

**A)Kemiğin Yapısal Tipi:** Spongioz ve kortikal kemik kırıklarının iyileşmeleri farklılık gösterir. Burada yüzey alanları, sellülarite ve vaskülarite farklılıkları önemlidir. Karşılıklı gelen spongioz kemik uçları kortikal kemiğe oranla daha hızlı kaynar. Temas yüzey alanının genişliği, kan ve hücre bakımından zenginliği spongioz kemiğe avantaj sağlar. Kortikal kırık uçları arası temas alanı dar ve kanlanması daha zayıftır(4,46).

**B)Kemik Patolojileri:** Patolojik kemikte kırık oluşumu çok daha düşük kuvvetlerle gerçekleşir. Primer ve sekonder malign kemik tümörleri, benign kemik tümörleri, osteogenesis imperfekta, osteomalazi, osteoporoz, fibröz displazi ve Paget gibi birçok kemik patolojisinde kırık gelişebilir. Malignite zemininde gelişen patolojik kırıklarda patoloji tedavi edilmeden kırık iyileşmesi gerçekleşemez. Kallus ve subperiosteal yeni kemik yapımı olsa da malign hücreler buna zarar verirler ve kaynamayı engellerler. Paget ve kist gibi benign patolojilerde ise kırık sorunsuz iyileşebilir. Osteoporozun kırık iyileşmesi üzerine olumsuz bir etkisi yoktur. Fakat azalmış kemik kitlesine bağlı temas yüzeyi azalacağından , iyileşme daha uzun sürede gerçekleşir. Ayrıca kemik kitlesinin azalmasına bağlı olarak internal fiksasyonda da stabilite sorunları oluşabilir(4,46).

**C)Enfeksiyon:** Enfekte kemiğin kırılması veya kırık sonrası oluşan enfeksiyon kırık iyileşmesini yavaşlatır ve engeller. Hücreler, kırığı tamir ve enfeksiyonu elimine etmeye çalışacaklarından enerji gereksinimi de oldukça artar.Ayrıca enfeksiyon; dokuda nekroz, ödem ve damarlarda tromboza yol açarak kırık iyileşmesini engeller. Enfekte kırıklarda yapılan cerrahi debridman da doku hasarını artırır(4).

#### **4.8.3.4. Tedaviye Bağlı Faktörler**

**A)Redüksiyonun Başarısı:** Kırık fragmanları arası mesafe ne kadar yakın olursa gereken tamir dokusu miktarı da o kadar az olur. Kırık fragmanlarının apozisyonu, özellikle yumuşak doku interpozisyonu da varsa oldukça önem taşır. Periost ve yumuşak dokular intakt

ise veya orjinaline yakın redüksiyon yapılmışsa kaynama olumsuz etkilenmez. Redüksiyon manevralarının sayısının artması; kırık uçları arası damar ağızlaşmalarını, kırık hematomunu ve çevre yumuşak dokuyu bozarak onarımı olumsuz etkiler(4,46).

**B)Stabilizasyonun Başarısı:** Redüksiyon sonrası uygulanan alçı, traksiyon, eksternal veya internal tespitler tamir dokusunu tekrarlayan hasarlardan korumayı sağlar. Yeterli tespit sürelerine uyulması gerekir. Özellikle yumuşak doku yaralanmasının fazla olduğu kırıklarda, kanlanmanın kritik düzeyde olduğu durumlarda ve sinovyal eklem içindeki kırıklarda stabilite daha da önem kazanır. Yetersiz stabilizasyona sekonder oluşan aşırı hareket, tekrarlayan manipulasyonlar ve aşırı yüklenme kaynamayı olumsuz etkiler. Eksternal tespitlerde; eklem hareketlerinde kısıtlanma ve osteopeni riski mevcuttur(4,46).

Rijid yani mutlak stabilite sonucu primer kallussuz kırık iyileşmesi oluşur. Rijid tespitin avantajları yanı sıra dezavantajları da mevcuttur. Kemikten çok daha sert ve elastisite modülü yüksek metallerin tespit materyali olarak kullanımı sonucu, kemiğe kalkan görevi görerek kemik kitlesinde lokal azalma ve implant çıkarılması sonrası tekrarlayan kırık riskinde artışa yol açar. Kesit alanı daraltılmış ve elastisite modülü daha düşük, sertliği daha az materyal kullanımı ile kemik dansitesindeki azalmanın önüne geçilebilir(4).

Ayrıca internal tespit için gereken cerrahi açılımlar hasarlı yumuşak dokudaki hasarı daha da artıracak ve kan akımını olumsuz etkileyecektir. Kırık uçları arasında kompresyon değil de distraksiyon oluşursa, bu pozisyondaki internal tespit kırık uçlarında rezorbsiyona ve minimal kallus oluşumu ile kaynama sorunlarına yol açacaktır. Tüm bu nedenlerle rijid internal tespit her kırığa uygulanmamalı ve gerektiği durumlarda iyi planlanarak ve cerrahi tekniğe bağlı kalınarak uygulanmalıdır(4,46).

**C)Yüklenme ve Mikrohareket:** Kırık iyileşmesinde yüklenme etkilidir. Kırık hattına yük vermek tamiri stimüle ederken, yükü azaltmak ise kırık iyileşmesini yavaşlatır(60). Deneysel ve klinik çalışmalarda göstermiştir ki erken ve kontrollü yüklenme, ekstremitte egzersizi kırık iyileşmesini uyarıcı etki gösterir(61,62,63,64). Buna rağmen uygun zaman, miktar ve kırıklara özel yüklenme paternleri net olarak bilinmemektedir. Tüm bunların kırığa değil hastaya özel olabileceği düşünülmektedir(4).

Kırık bölgesindeki fazla hareket ve oluşan özellikle periosteal kallus dokusunun boyutu arasında doğru orantı olmasına karşın oluşan aşırı kallus her zaman kaliteli olmamaktadır(46).



#### **4.9.Kırık İyileşmesinin Uyarılması**

Kırıkların büyük çoğunluğu problemsiz bir şekilde iyileşirler. Kırıkların sadece %10' unda kaynamama veya kaynama gecikmesi nedeniyle cerrahi girişim gerekmektedir(65,66).

Kırık iyileşmesini olumsuz etkileyen çeşitli risk faktörlerinin varlığında ve bazı kaynaması sorunlu bölgelerin taze kırıklarında kırık iyileşmesini hızlandırmak için, kaynama gecikmesi ve kaynamama durumlarında iyileşmeyi uyarmak için kullanılan birtakım fiziksel ve biyolojik yöntemler mevcuttur. Bunların bir kısmı geniş klinik uygulama alanı bulmuşken bir kısmı henüz araştırma aşamasındadır(65).

##### **4.9.1.Biyofiziksel Yöntemler**

Kırık iyileşmesinde mekanik koşullar oldukça önemli rol oynar(43,45,67). Redüksiyon sonrası instabilite veya aşırı distraksiyon kırık iyileşmesini olumsuz etkilerken, buna karşın kontrollü mikrohareket veya kontrollü ritmik distraksiyon kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilemektedir(61,65,68,69).

Tüm bunlardan yola çıkılarak kırık iyileşmesinin uyarılmasında mekanik koşulların uygun hale getirilmesinin etkileri araştırılmış ve klinik uygulama alanı bulmuştur. Ayrıca kaynamama durumlarında elektriksel veya elektromanyetik stimülasyonun, taze kırıklarda ise ultrasonun kırık iyileşmesini uyarıcı etkileri araştırılmış ve kontrollü klinik çalışmalar uygulanmıştır(65).

##### **4.9.1.1.Mekanik Uyarma**

Kırık iyileşmesinde oluşan kallus dokusunun kalite ve kantitesi uygulanan tedavi şekline etkilenir. Kırık hattında hareket varlığında kallus oluşur(65). Eğer kırık hattındaki bu hareket aşırı miktarda olursa o zaman da hipertrofik nonunion gelişir(70).

Kırık iyileşmesi sırasında ekstremiteye yük vermenin etkileri hakkında birçok araştırma yapılmıştır. Sarmiento ve ark. ratlarda femur kırığı iyileşmesinde yük vermenin olumlu etkilerini bildirmişlerdir(64). Meadow ve ark.'ları köpeklerde tibiada oluşturulan kortikal defekt iyileşmesinde yük vermenin etkisini araştırmışlar ve bu çalışma sonunda yük vermenin kemik tamiri sürecinde kemik yapımını arttırabileceğini bildirmişlerdir(71). Kershaw ve ark.'ları unilateral eksternal fiksator ile tedavi edilen tibia kırıklarında kontrollü yük vermenin iyileşme üzerine olumlu etkilerini bildirmişlerdir(62).

Kırık iyileşmesinde dört temel yeni kemik oluşum süreci vardır: 1-Endokodral kemikleşme 2-İntramembranöz kemikleşme 3-Apozisyonel yeni kemik yapımı 4-Osteonal migrasyon (creeping substitution). İyileşmenin hangi yolla, hangi miktarda olacağı; kırığın tipi, tespitin rijiditesi, kırık uçları arası boşluk, biyolojik ve mekanik koşullara bağlıdır(45,72). Farklı mekanik yüklenmelerin oluşan tamir dokusunda yol açtığı farklılaşmalar da önemli bir araştırma konusu olmuştur. Carter ve ark.'ları yaptıkları çalışma sonucunda immatür tamir dokusu üzerine farklı mekanik yüklenmelerde farklı tiplerde iyileşme dokusunun oluşacağını göstermişlerdir. 1-yüklenme ve gerilimin çok az olduğu durumda; direkt intramembranöz kemikleşme 2-düşük ve orta derecede aralıklı tensil gerilim;intramembranöz kemikleşme 3-aşırı tensil gerilim; fibröz doku oluşumu 4-aralıklı hidrostatik kompresyon ;endokodral kemikleşme 5-sürekli hidrostatik kompresyon; kırık oluşumu 6-kötü kanlanma; kondrogenesis, iyi kanlanma ise osteogenesis ile yakın ilişkilidir(73). Claes ve ark.'larının yaptığı çalışma da bu sonuçları destekler niteliktedir(67). Distraksiyon osteogenesisi de aralıklı, kontrollü ve ritmik tensil gerilim uygulanması sonucu gelişen intramembranöz kemikleşme sayesinde olur.

Bir diğer mekanik yöntem ise kontrollü mikrohareket uygulamaktır. Goodship ve ark.'ları koyunlarda oluşturdukları tibia diafiz kırığının tedavisinde kontrollü mikrohareketin kırık iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bir gruba sadece rijid eksternal tespit, diğer gruba ise rijid eksternal tespit ile birlikte günde 17 dakika aksiyel mikrohareket (500 siklus-0,5 hertz) uygulamışlar ve mikrohareketin kırık iyileşmesi üzerine olumlu etki gösterdiğini bildirmişlerdir(68). Kenwright ve ark.'ları ise sadece eksternal fiksasyon uyguladıkları 41 tibia kırığı ile eksternal fiksasyon ve kontrollü mikrohareket uyguladıkları 39 tibia kırığını karşılaştırmışlar. Mikrohareket uyguladıkları hasta grubunda kırık iyileşme süresinde anlamlı kısalma tespit etmişlerdir. İki grup arasında komplikasyon oranları açısından anlamlı bir fark bulunmamış ve süreler arasındaki farkın tedaviye bağımlı olduğunu bildirmişlerdir(69).

#### **4.9.1.2.Elektriksel Uyarma**

Kemik iyileşmesini uyarmak amacıyla 19.yüzyılda kullanılmaya başlanmasına rağmen gelişmeler 1950 li yıllardan sonra artmıştır(65,70).

Elektriksel uyarı oluşturmak için 3 farklı alternatif mevcuttur:

- a) Sabit doğru akım stimülasyonu (invaziv, direkt elektrik akımı sağlar.)
- b) Zaman değişkenli indüktif akım (non-invaziv, elektromanyetik alan oluşturur.)
- c) Zaman değişkenli kapasitif akım (non-invaziv, elektromanyetik alan oluşturur.)

Elektromanyetik alan etkisiyle osteoblastlar in vitro BMP 2-4, TGF- $\beta$  ve ILGF I-II gibi büyüme faktörlerini salarlar(74). İndirekt etki olarak ısı artışı yapar. Ancak bu konu hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır(75).

Kaynamama ve kaynama gecikmesi vakalarında sık klinik kullanım alanı bulmuştur. Scott ve King, kaynamama sorunu olan 23 uzun kemik kırığı vakasında kapasitif elektriksel alanın kırık iyileşmesini uyarıcı etkisini araştıran çift kör çalışma yapmışlar ve vaka sayısı az olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı iyileşme saptamışlardır(76). Bassett ve ark.'ları; kaynama gecikmesi ve kaynamama sorunu olan 125 hastanın 127 tibia diafiz kırığının tedavisinde uyguladıkları elektromanyetik alanla %87 başarı oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir(44).

Mammi ve ark.'ları yaptıkları çift kör, plasebo kontrollü, prospektif çalışmada dejeneratif artroz nedeniyle tibial osteotomi yaptıkları ve staple ile internal fiksasyon uyguladıkları 40 hastada elektromanyetik alanın kemik iyileşmesini uyarıcı etkisini araştırmışlardır. 37 hasta çalışmayı tamamlamış, elektriksel uyarı uygulanan 18 hastanın 13'ünde kaynama saptanırken, plasebo grubunda 19 hastanın 5'i bu kaynama düzeyine ulaşabilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bu sonuç, elektromanyetik alanın taze kırık iyileşmesini de olumlu etkilediğini belirterek aynı zamanda diğer yayınları da desteklemektedir(77).

#### **4.9.1.3.Ultrasonik Uyarma**

Düşük şiddette ritmik ultrasonun klinikte kırık iyileşmesini uyarmak için kullanımı 1990 yılından itibaren önem kazanmıştır. Canlı dokuya akustik basınç dalgaları şeklinde iletilen bir mekanik enerjidir(66). İçinden geçtiği dokular tarafından oransal olarak absorbe edilir. Bu oransal absorpsiyon; hematoma, yağ ve kas dokusundan daha yoğun olan kemik dokudaki kırık hattının hedef seçilmesinde kritik role sahiptir(78). Bu basınç dalgaları biyolojik dokularda mikromekanik gerilim oluşturarak kırık iyileşmesini düzenleyen biyokimyasal süreçleri etkiler. Günde 20 dakika süreyle, maksimum 30mW/cm<sup>2</sup>'lik şiddette ve 200 $\mu$ s frekansla uygulanmaktadır(66).

Düşük şiddetli ultrason tedavisinin kan akımını arttırarak, gen ekspresyonu ile hücrel aktiviteyi düzenleyerek kırık iyileşme sürecini hızlandırdığını gösteren birçok hayvan çalışması temel kanıt olarak mevcuttur(78).

Kristiansen ve ark.'ları distal radius kırıklı 61 olguda yaptıkları çalışmada, ultrasonun kırık iyileşmesini hızlandırıcı etkisini destekler sonuçlara ulaşımlardır(79). Busse ve ark.'ları yaptıkları metaanaliz sonucunda, düşük şiddetli ritmik ultrason uygulamasının kırık iyileşmesinin süresini kısaltabileceğini ancak bu konuda çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir(80).

#### **4.9.2.Biyolojik Yöntemler**

Kemik iyileşmesinin hücrel ve moleküler aşamalarının daha iyi anlaşılır hale gelmesi ile ve teknolojiye gelişmelerle, kemik iyileşmesini uyarmak için kullanılan materyallerde çeşitlenmektedir(70).

Farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin, çoğalarak osteoprogenitör hücrelere farklılaşmasını ve bu şekilde kemik yapımının uyarılmasını sağlamaya *osteoinduktif etki* adı verilir. Poröz yapı iskelesi olarak, fibrovasküler doku ve osteoprogenitör hücrelerce invaze edilip üzerinde yeni kemik dokusu oluşumuna *osteokonduktif etki* adı verilir. İçerisinde kemik yapımındaki hücreleri barındıran yapı iskelesinin konakçı doku ile uyum içinde yeni kemik oluşumu sağlamasına ise *osteojenik etki* adı verilir(65,70,75).

Bu amaçlarla otojenik veya allojenik kemik greftleri, otojenik kemik iliği, demineralize kemik matriksi, osteokonduktif biomateryaller ve osteoinduktif büyüme faktörleri kullanılmaktadır(65,75,81).

İdeal bir kemik grefti şu 3 özelliğe sahip olmalıdır(81):

- 1-)Yeni kemik gelişimi için iskele görevi görece bir osteokonduktif matriks
- 2-)Kemik tamirinin farklı basamaklarını uyuracak osteoinduktif faktörler
- 3-)Farklılaşarak kemiğin yenilenmesinin farklı aşamalarına katkı sağlayan osteojenik hücreler

#### 4.9.2.1.Kemik Greftleri

Kemik greftleri; kemik defektlerinin onarılması, kırık iyileşmesini desteklemek ve artrodez oluşumunu uyarmak amacıyla ortopedide kullanılmaktadır(82). Kemik greftleri mekanik ve biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Kemik greftleri; osteoindüktif etkili birçok büyüme faktörünü (BMPs, TGF- $\beta$ , ILGFs, FGFs, PDGF, ILs, G-CSF ve GM-CSF gibi) içerir. Buna ek olarak da osteokondüktif etki gösterirler. Kemik greftleri uygulandıktan sonra; hemoraji, inflamasyon, revaskularizasyon, yerini yeni kemiğin alması ve remodelasyon süreçlerinden geçer(82).

**Otojenik kansellöz kemik greftleri:** Greftlemede altın standart olarak kabul edilmektedir. Hidroksiapatit ve kollajenden oluşan düzenli bir osteokondüktif yapı, içerdiği çok sayıda stromal hücre ile osteojenik potansiyel ve büyüme faktörleri ile osteoindüktif özellik sayesinde ideal kemik grefti niteliklerini sağlamaktadır(81). Hacminin %80'inin boşluk, %20'sinin doku içermesinden dolayı mekanik dayanıklılığı kortikal kemiğin %4'ü kadardır(82). Bu poröz yüzey osteointegrasyon ve revaskularizasyonu daha hızlı kılmaktadır(81).

Uygulandıktan hemen sonra çevresinde hemoraji ve inflamasyon başlar. Trabeküler lakunlardaki çok sayıda osteosit ölürken yüzey osteoblastları canlılığını koruyarak erken yeni kemik üretimine başlarlar. Kansellöz kemiğin poröz yapılı mimarisi; 48 saat içinde konağa ait damar, osteoblast ve öncü hücrelerin içine girerek yerleşmesine olanak sağlar. Eş zamanlı olarak osteoklastlarda içine girerek greftte rezorbsiyona başlar. Boşalan trabeküllere yerleşen osteoblastlar osteoid sentezlemeye başlarlar. Greft rezorbe olurken yerini yeni kemik dokusuna bırakır ve sonrasında Wolf kanununa göre kemiğe gelen stress hattı doğrultusunda, aylar boyunca süreçte remodelasyon başlar(81,82,83).

Donör saha morbiditesi, cerrahi sürenin uzaması ve alınabilecek greft miktarının sınırlı olması otojenik greftlerin dezavantajlarıdır(70,82).

**Otojenik kortikal kemik greftleri:** Vaskülarize veya vaskülarize olmayan greftler kullanılabilir. Kansellöz kemiğe göre revaskularizasyonu ve osteointegrasyonu oldukça yavaştır. Periferden başlayan osteoklastik rezorbsiyon aylar sürer ve grefti zayıflatır. Osteojenik etkisi kansellöz kemiğe göre çok daha zayıf olmasına rağmen mekanik destek gücü çok daha fazladır. Rezorbsiyona bağlı olarak radyolusensi görülür(82). Rezorbsiyon ve remodelasyon sonucu, 6-18 ay içinde dayanıklılığının 1/3 ünü kaybeder(84).

Vaskülarize kortikal greft de ise osteojenik etki güçlü olup, osteointegrasyon daha hızlı gerçekleşir. Greftte belirgin bir zayıflama olmazken, radyolusensi de görülmez(82).

Otojen kemik greftlerinin immunojenik olmamaları ve doku uyumluluğuna sahip olmaları önemli avantajlarındandır(81).

**Allojenik kemik greftleri:** Aynı türden farklı genetik özellikli bireyden sağlanan greftlerdir(82). İmmunojenite ve enfeksiyon taşıma riski dezavantajı olup, bunu minimuma indirmek için çeşitli işlemlerden geçirilir. Taze, dondurulmuş ve dondurulup kurutulmuş allogreft seçenekleri mevcuttur(70,81,82). Dondurulmuş allogreftler; mekanik dayanıklılığını azaltmaksızın immunojenitesini azaltmak ve enzimlerce yıkılmasını engellemek amacıyla -60°C'nin altında saklanırlar. Dondurulmuş kemiğin su içeriğinin ortadan kaldırılması, kurutularak vakumlu paketlenmesi işlemine *liyofilizasyon* adı verilir ve bu greftler beş yıl süreyle kullanılabilir(70,81). Liyofilizasyon işlemi ve sterilizasyon için uygulanan gama ışınları greftin mekanik dayanıklılığını azaltıcı etki gösterir(70,81,82).

Esas kullanım amacı mekanik destek sağlamaktır. Özellikle artroplasti ve onkolojik cerrahi de oluşan boşlukları doldurmak amacıyla parçalanmış kortikal ve kansellöz allogreftler kullanılabilir(70,81). Allogreftlerin osteointegrasyon mekanizması, otogreftler ile hemen hemen aynı şekilde ancak çok daha yavaş gerçekleşir. Sınırsız kullanım imkanı ve donör saha morbiditesi olmaması avantajları iken, immunojenik olması ve enfeksiyon riski önemli dezavantajlarıdır(82).

**Allojenik demineralize kemik matris (DBM):** Kemiğin mineral fazının uzaklaştırılarak; kollajen,non-kollajen proteinler ve büyüme faktörlerini barındıran organik matrisin bırakılmasıdır. Yapısal dayanıklılığı yoktur. Klinikte diğer greftlere destek olarak kullanılır. Osteoindüktif etki ile kemik yapımını uyarır(81,82,83). Hızla revaskülarize olarak hücresel süreçlerin ardından rezorbe olarak yerini yeni kemik dokusuna bırakır(83). Enjektabl jel formu, macunsu formu ve kollajen liflerinin örgüsel dizilmiş formu kullanılmaktadır(81,82).

**Otojenik kemik iliği:** Zengin osteoprogenitör hücre kaynağı olarak önemli osteojenik etkiye sahiptir. İliak krestten aspire edilerek kırık hattına enjekte edilebilir(82). Tek başına kullanımı bile kırık iyileşmesi ve kemik yapımını uyarmada önemli etkiye sahiptir(65). Connolly ve ark.'ları tavşanlarda peritoneal boşluk ve kaynama gecikmesi sahasına uyguladıkları kemik iliği çalışmasında, santrifugasyon ile konsantre edilen kemik iliğinin kemik yapımını hızlandırdığını göstermişlerdir(85). İçeriğinde özellikle yapı iskelesi ile taşınabilen ve konak dokuda kemik yapan hücrelere farklılaşabilen kemik iliği stromal

fibroblastları bulunur. Bu hücreler in vitro doku kültürlerinde çoğaltılarak taşıyıcı ile implante edilebilir. Taşıyıcı yapı iskelesi olarak kollajen, alginat, polilaktik ve poliglikolik asid polimerleri veya kalsiyum fosfat seramikleri kullanılabilir(75,86). Bruder ve ark.'ları hidroksiapatit-trikalsiyum fosfat taşıyıcısına yüklenen, izole edilip kültür ortamında çoğaltılmış kemik iliği hücrelerini köpekte oluşturdukları 6 mm kemik defektine uygulamışlar ve kemik iliği hücrelerini içermeyen taşıyıcıya göre kemik yapımında artış göstermişlerdir(87).

#### **4.9.2.2.Osteokonduktif Biyomateryaller**

Üzerinde yeni kemik yapılmasına imkan sağlayan, poröz yapı iskelesi olarak görev yapan kemik grefti benzeri, seramik türevi materyallerdir. Hidroksiapatit (HA), Trikalsiyum fosfat (TCP), bunların bileşimleri, kalsiyum sülfat ve mercanlar bu amaçla kullanılan biyomateryallerdir(75,81). Deniz mercanlarına; hidrotermal etkiyle kalsiyum karbonat içeriği kalsiyum fosfata dönüştürülerek, kansellöz kemiğe benzer yapı kazandırılır. *Gonipora* cinsi mercanlar daha geniş porlu ve spongios kemikle benzerken, *Porites* cinsi ise daha sıkı mikromimariyle kortikal kemiğe benzemektedir(75,81). Seramiklerde por çapı 150-500µm arasındadır. Rezorbsiyon oranları biokimyasal içeriklerine bağlıdır. TCP, HA'e göre çok daha hızlı rezorbe olur. HA dev hücreler tarafından rezorbe edilir. Yüzey alanı ne kadar genişse o kadar çok rezorbe olur. Seramikler mekanik olarak dayanıksız ve kırılındır. O nedenle yük taşıma amaçlı değil rijid fiksasyonla beraber kullanılmalıdır. Birçok boyut, şekil ve formda kullanım imkanı vardır. Seramikler ayrıca kollajen ve kemik iliği hücreleri ile birlikte komposit greft olarak da kullanılabilir(81).

#### **4.9.2.3.Büyüme Faktörleri**

Kırık iyileşmesi süreci lokal ve sistemik faktörlerce düzenlenir. Moleküler biyolojideki gelişmelerle büyüme faktörlerinin kırık iyileşmesi üzerine olan etkileri hakkında özellikle son 20 yılda çok sayıda hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar yapılmıştır. Osteoindüktif etkilidirler(81,88). Otokrin, parakrin ve endokrin etkileşimlerle kırık hattındaki mezenkimal kök hücrelerin migrasyon, proliferasyon ve farklılaşmalarını sağlarlar(81,89). Hedef hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak etki ederler(89).

***Bone Morfogenetik Proteinler (BMP):*** TGF-β üstalesinin üyeleri olup, yaklaşık 20 farklı formu izole edilmiştir. Ancak bunlardan sadece bir kısmı yeni kemik yapımını uyarıcı

etki gösterir(90,91). Kemik matriksteki kollajen liflerinde, özellikle BMP-2,4,7 kemik iyileşmesinde önemli izoformlardır. Mezenkimal hücrelerin kondrosit ve osteoblastlara farklılaşmasını uyararak özellikle erken intramembranöz kemikleşme üzerine önemli ölçüde etki ederler(88,89,92). Genetik mühendislikteki gelişmelerle beraber BMP'ler rekombinant DNA teknolojisi ile üretilebilir hale gelmiştir(89,93). Yapılan hayvan çalışmaları(94,95) ve klinik çalışmalarda(96) BMP'in kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir.

***Transforming Growth Faktör-Beta (TGF-β):*** TGF-β üstailesinin alt grubunu oluşturur. 5 farklı izotipi mevcuttur. Hücrenin büyüme, farklılaşma ve ekstrasellüler matriks sentezi gibi farklı aktiviteleri üzerine etkilidir. Birçok dokuda bulunmasına rağmen; kemik, kırık ve trombositlerde daha fazla bulunur(89). Mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını uyarır. TGF-β kırık sonrası özellikle hematomdaki trombositlerden salgınır(82,97). Osteoblast ve kondrositlerde TGF-β reseptörlerinin olması kırık iyileşmesinin tüm aşamalarında etkili olduğu düşüncesini desteklemektedir(89). Endokondral kemikleşme sırasında osteoblast ve kondrositlerden de salgınır(82). Fibroblast ve makrofajlar için güçlü kemotaktik etki yapar. Kollajen sentezi ve mezenkimal hücre farklılaşmasını uyarır(82,97). Mezenkimal hücreler aracılığıyla anjiogenez ve ekstrasellüler matriks yapımını uyarır(82,88). TGF-β hücresele proliferasyonda etkili olmasına rağmen çalışmaların geneline bakıldığında kemik tamirini uyarıcı etkisi sınırlıdır(89).

***Fibroblast Growth Faktörler (FGF):*** Birbirine benzer yapıda 9 polipeptidin olduğu gruptur. Erişkinde en çok görülen ve üzerinde en çok çalışılanlar; asidik FGF (FGF-1 veya  $\alpha$ -FGF) ve bazik FGF (FGF-2 veya  $\beta$ -FGF)'dir(82,88). Monosit, makrofaj, kondrosit ve osteoblastlarca sentezlenir(98). Kök hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması, morfolojisi ve fonksiyonları üzerine etkilidir(82). FGF-1 ve 2 aktivitesi kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde gösterilmiştir. Özellikle FGF-2 osteoblast, kondrosit ve fibroblast proliferasyonu ile anjiogenezisi uyarıcı etki gösterir(82,99). FGF-1'in kemikte yüksek konsantrasyonda bulunup osteoblastlara etki etmesi kırık iyileşmesinde etkili olduğunu düşündürmektedir(65). FGF reseptörlerindeki defektler, endokondral ve intramembranöz kemikleşme anomalileri ile ilişkilidir(89). Trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinde FGF bulunur ve kırık esnasında salgınır(88). Hayvan çalışmalarında FGF'nin kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir(99,100).

***İnsulin-like Growth Faktörler (IGF):*** IGF ailesinin iki polipeptid yapılu üyesi vardır.IGF-1, erişkinde osteojenik etkili form olup growth hormon bağımlıdır. IGF-2 ise



kemikte çok daha fazla miktarda bulunmasına rağmen özellikle fetüs ve embriyodaki gelişimde etkilidir(89,101). Dolaşımda IGF bağlayıcı proteinler tarafından taşınırlar. Osteoblast ve kondrosit fonksiyonları üzerine etki ederler(101). Daha çok IGF-1 üzerinde çalışmalar yapılmıştır. İn vivo çalışmalar; IGF-1 in kemik iyileşmesi sürecinde hem endokondral hem de intramembranöz kemikleşme üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir(101). Tek başlarına uygulandıklarındaki etkilerinin yanı sıra diğer growth faktörlerle birlikte uygulanımında ve growth hormon uygulanımındaki etkileri konusunda da çalışmalar mevcuttur(53,102).

Ayrıca growth hormon'un da kemik iyileşmesinde IGF'ler üzerinden etkili olduğu, lokal uygulanmasının değil sürekli infüzyon şeklinde uygulanımının etkili olduğu gösterilmiştir(53).

***Platelet-Derived Growth Faktör (PDGF):*** PDGF-AA, BB ve AB olmak üzere üç izoformu vardır. Hasarlanmış damar duvarı ile karşılaşan plateletlerin  $\alpha$ -granüllerinden salınır(88). Plateletler, monositler ve endotelial hücreler tarafından sentezlenir. Mezenkimal kök hücreler üzerinde mitojenik etki gösterir(82). Ayrıca mezenkimal öncü hücreler ve osteoblastların migrasyonunu uyarır. Yapılan çalışma sayısı yetersiz olmasına rağmen kırık iyileşmesi ve kemik tamirindeki rolü tam olarak açıklanamamıştır(89,103).

***Vaskuler Endotelial Growth Faktör (VEGF):*** Osteoblastlar ve endotelial hücrelerce salınıp depolanır. Kırık iyileşmesi sürecindeki anjiogenezisi uyarıcı etki gösterir(104,105). Prostaglandin E2, kemik yapımını uyarıcı bir faktör olup VEGF sekresyonunu ve gen ekspresyonunu artırır. Sadece hayvan çalışmaları yapılmıştır(105). VEGF homoloğu olan *placental growth faktör(PIGF)* de mezenkimal hücre proliferasyonunu ve osteojenik hücrelere dönüşümünü uyararak kırık iyileşmesinde rol oynamaktadır(106).

***Nerve Growth Faktör (NGF):*** Pek çok dokuda sentezlenerek periferik sensoriyel ve postganglionik sempatik sinir gelişiminde önemlidir. Kırık iyileşmesinde lokal uygulanımı deneysel aşamadadır(46).

***Gen Terapisi:*** Özellikle virüsler gibi çeşitli taşıyıcılar kullanılarak hedef hücreye taşınan genin, hedef hücre DNA'sını etkileyerek üzerinde kodlanan proteinin hedef hücre tarafından sentezlenip salınmasını sağlar. Growth faktörlerin şu an olduğu gibi dışarıdan uygulanımı yerine kodlanan gen tarafından hücrelerce sentezinin artırılması ve daha efektif sonuçlar elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu konuda yoğun araştırmalar sürdürülmektedir(89).

#### 4.10. Hyaluronik Asit

Hyaluronik asit, lineer bir polisakkarit ve glikozaminoglikandır. İçeriğinde N-acetylglukozamin ve  $\beta$ -1,4-glukuronik asit içeren ortalama 12,500 disakkarit ünitesi mevcuttur. Moleküler ağırlığı, ortalama 4–5 milyon daltondur. Hyaluronik asit sentezi, hücre zarında meydana gelir. Diğer glikozaminoglikanlar gibi sentezi golgi aparatında olmaz. Hücre zarının içinde başlayan sentez işlemi, molekül büyüdükçe ekstraselüler alana doğru devam eder(107). Fetal gelişim ve doku morfogenezinde rol oynar(100). Mezenkimal hücre farklılaşması ve migrasyonunu uyararak osteoblastik kemik yapımını artırır(108). Kırık iyileşmesinde büyüme faktörleri ve greftlerle birlikte taşıyıcı olarak kullanıldığı ve kırık iyileşmesini etkilediği belirtilmiştir(100,108).

Anjiogenezi artırdığı için damar hastalıklarında, derideki yara iyileşmesini stimüle ettiği için dermatolojik hastalıklarda, intraoküler cerrahi ve osteoartrit üzerine de tıpta kendine kullanım alanı bulmuştur(107,109).

#### 4.11. İnsan Amniyotik Sıvısı

Gebelik esnasında insan amniyotik sıvısının miktarı ve içeriği dönemlere göre değişiklik göstermektedir. İkinci trimester esnasında amniosentez ile elde edilen insan amniyotik sıvısının yüksek oranda, yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit içerdiği gösterilmiştir. İnsan amniyotik sıvısındaki hyaluronik asit miktarları 16–20. haftalarda 20 mg/L iken, bu değer 30. hafta sonrasında 1 mg/L değerlerine düşmektedir(110,111). Hyaluronik asidin; lenfosit migrasyonu, proliferasyonu ve kemotaksisini, granulosit fagositozunu ve makrofaj mobilitesini inhibe ederek skar ve fibrosis oluşumunu azaltıp rejenerasyon ve büyümeyi artırdığı bilinmektedir(112). Yine aynı dönemdeki insan amniyotik sıvısının çok sayıda büyüme faktörleri içerdiği gösterilmiştir. Bu faktörler; NGF, IGF-I ve II, FGF'ler (asidik ve bazik FGF ), fibronektin ve laminin gibi ekstraselüler makromoleküllerdir(111,113,114).

Hyaluronik aside ek olarak insan amniyotik sıvısı, hyaluronik asit stimulan aktivatörü (HASA) de taşımaktadır. HASA'nın önemi uygulanan yarada endojen hyaluronik asit sentezini artırmasıdır. Bu sebeple insan amniyotik sıvısının, uygulanan alanda hem endojen hem de ekzojen hyaluronik asit miktarını artırarak skar formasyonunu azalttığı ve doku iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir(111,115,116). Yine literatürde, insan amniyotik sıvısının deneysel olarak periferik sinir(117) ve tendon iyileşmesini artırdığı, çevre dokularda

meydana gelen peritendinöz adezyonları azalttığı(118) ve perikondral fleplerdeki kıkırdak doku gelişimini arttırdığı(119) gösterilmiştir.

#### **4.12.İnsan Amniyotik Membranı**

İnsan amniyonu ilk olarak embriyo gelişiminin 7–8. günlerinde görülür. Amniyotik membran esnek olmakla beraber tüm fetal zarların tensil gücünü sağlayacak kadar dayanıklıdır. Fetal membranların en iç tabakasıdır ve amniyotik sıvıyla temas halindedir. Avasküler bir yapısı vardır. Amniyon zarının beş farklı tabakası mevcuttur. Amniyotik sıvı ile temasta olan en iç tabakası tek tabaka halinde *küboïd epitel* hücrelerinden meydana gelir ve embriyonik ektoderm tabakasından oluşur. Bu epitelin sıkıca bağlı olduğu tabaka *bazal membran* tabakasıdır. Bazal membran tabakası asellüler bir *kompakt tabakaya* bağlıdır. Bu tabaka primer olarak interstisyel tip I, III ve V kollajenlerden meydana gelmiştir. Kompakt tabakanın dışında bir sıra halinde fibroblast-benzeri *mezenkimal hücreler* yer alır, bu hücreler embriyonik diskin mezoderm tabakasından oluşur. Amniyonun en dış tabakası göreceli olarak asellüler olan *zona spongiosa*dır ve koryon laeva ile komşuluk gösterir. İnsan amniyotik membranında düz kas hücreleri, sinir, lenf ve kan damarları yoktur(120).

***Amniyon Epitel Hücreleri:*** Amniyon zarının en iç tabakasını oluşturur. Epitel hücrelerinin apikal yüzeyi gelişmiş mikrovilluslarla doludur ve amniyon ile amniyotik sıvı arasındaki transferden sorumludur.

Yukarıda bahsedilen özellikleri nedeniyle amniyon zarı, amniyotik sıvıyı taşıyan basit avasküler bir zar değil, taşıdığı su ve çözeltilerin transportunda aktif rol alarak amniyotik sıvının homeostazisini sağlayan, vazoaktif peptidler, büyüme faktörleri ve sitokinler üreten aktif bir dokudur(120).

***Amniyon Mezenkim Hücreleri:*** Amniyonun fibroblast tabakasının mezenkim hücreleri, major amniyon fonksiyonlarından sorumludur. Amniyonun kompakt tabakasını oluşturarak tensil gücü sağlayan interstisyel kollajen sentezi, mezenkimal hücreler tarafından meydana getirilir. Bu hücrelerin yüksek oranlarda IL–6, IL-8 ve MCP-I (monosit kemoakraktan protein) sentezleme kapasitesi vardır. Sentezlenen bu sitokinler sayesinde amniyotik membran ve amniyotik sıvının bakteri enfeksiyonlarına karşı direnci oluşur(120).

İnsan amniyotik membranının deneysel olarak sinir(121) ve tendon iyileşmesi(122) üzerine etkileri gösterilmiştir. Ayrıca, klinikte kalça tüberkülozu sonrasında uygulanan amniyotik artroplastide eklem yüzeyi oluşturmak amaçlı kullanımı bildirilmiştir(123).

## **5.GEREC VE YÖNTEM**

Çalışmamız deneysel bir çalışmadır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığı'na 22.02.2005 tarihinde başvuruldu ve 13 protokol numarası ile Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu'nda görüşülerek onay alındı. Çalışmada insan kaynaklı doku örnekleri kullanılacağı için Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'na da başvuruldu ve 31 protokol numarası ile onay alındı. Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

### **5.1.Amniyotik Sıvı Toplama**

İnsan amniyotik sıvısı, Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu onayı ve hasta onamı alındıktan sonra, enfeksiyon açısından seronegatif olduğu bilinen, gebeliğin 16–24. haftalarındaki normal gebelerden; steril şartlarda, DEUTF Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından yapılan amniyosentezlerden elde edildi. Toplanan sıvı literatürde tariflendiği şekilde -20 derecede muhafaza edildi ve en geç bir hafta içinde kullanıldı(117,118,119).

### **5.2.Amniyotik Membran Hazırlama**

Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu onayı ve hasta onamı alındıktan sonra daha önceden enfeksiyon açısından seronegatif olduğu bilinen annelerin, DEUTF Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından uygulanan sezeryen ameliyatlarını takiben amniyotik membranları alındı. Amniyotik epitel tabakası steril koşullarda, altındaki koryon tabakasından dikkatlice ayrıldı. Bu steril amniyotik membran literatürde tarif edildiği şekilde, steril salin solüsyonu ile yıkanarak kanlarından temizlendi. %10'luk gentamisin sülfat solüsyonunda +4 derecede bekletilip dört saat içerisinde kullanıldı(121).



**Şekil 2:** İnsan Amniyotik Membranının Temizlenip Kullanıma Hazırlanmış Hali

### **5.3.Denekler ve Anestezi**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen normal aktiviteye sahip, 36 adet Wistar erkek ratın 72 adet tibiası çalışmaya alındı. Denekler, ortama alışmaları için çalışmaya başlamadan önce, bir hafta boyunca standart laboratuvar koşullarında ( 12 saat gündüz - 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20–22 derece oda ısısı, % 50–60 nem) tutularak ortama alışmaları sağlandı ve ihtiyaçları kadar su ve yem verildi. Tüm hayvanlar bilateral opere edilerek, her iki tibiası çalışmaya alındı. Hayvanlara intraperitoneal 80mg/kg ketamin ( *Ketalar*, Eczacıbaşı İlaç San. Ve Tic. A.Ş. Lüleburgaz- Türkiye) verilerek genel anestezi uygulandı. Sonra her grupta 12 tibia bulunacak şekilde, randomize olarak üç deneysel gruba ayrıldı.

#### 5.4.Cerrahi İşlem

Yukarıda anlatıldığı şekilde ratlara anestezi uygulandıktan sonra diz ile ayak bileği arası ön yüzü traş edildi. Batikon ile temizlendikten sonra steril koşullar altında anteriordan longitudinal insizyonla girilerek cilt, ciltaltı geçildi. Kas ve periost sıyrılarak tibia diafizer bölgeden kesici motor yardımıyla kesilerek tek transvers kırık hattı oluşturuldu. Daha sonra diz eklemi açılmadan proksimalden 20G (0,9mm) çapında enjektör iğnesi ile intramedüller fiksasyon yapıldı. Fiksasyon yeterliliği kırık hattından görülerek ve elle bakılarak kontrol edildi. Uygulama ardından kas fasciası 5.0 vicryl, cilt ise 4.0 prolen ile kapatıldı. Tüm ratlar rastgele üç gruba ayrıldı. Her bir grupta 12 hayvanın 24 tibiası bulunacak şekilde dağıtıldı. Her gruptaki hayvanlar 3. hafta ve 6. haftada olmak üzere iki ayrı dönemde sakrifiye edilerek değerlendirilmeye alındı.

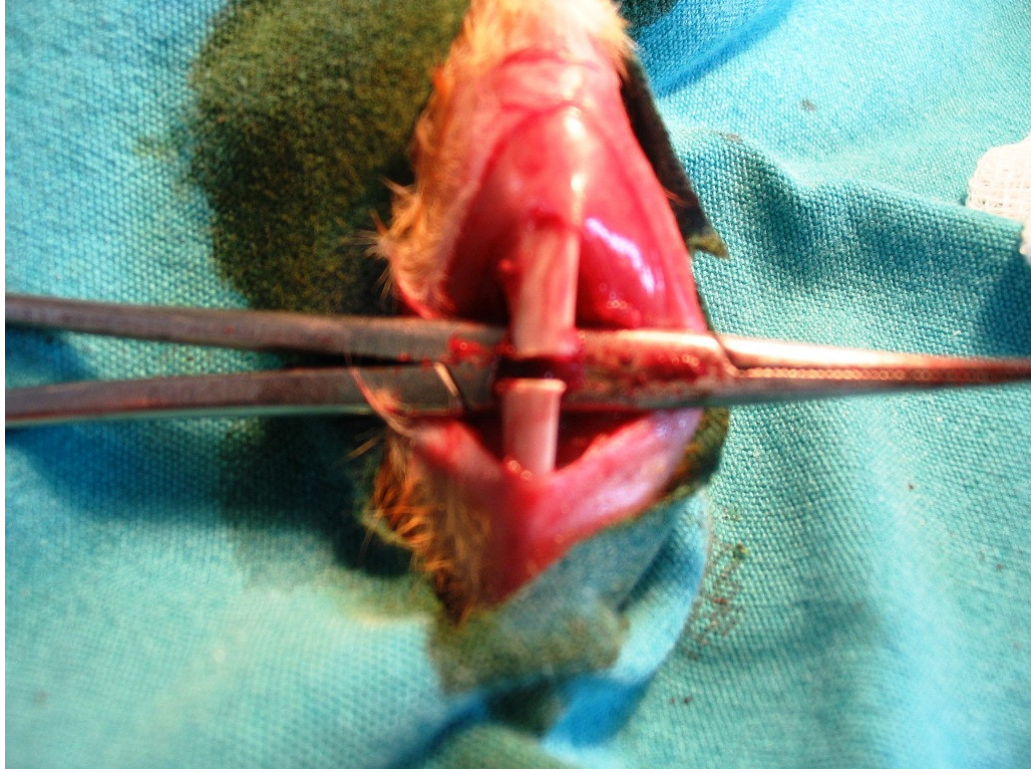
**Grup 1 (kontrol):** Oluşturulan kırık intramedüller olarak tespit edildikten sonra herhangi bir madde verilmeden kapatıldı.

**Grup 2:** Oluşturulan kırık intramedüller olarak tespit edildikten sonra cilt kapatılarak kırık bölgesine 0.3 ml amniyotik sıvı enjekte edildi.

**Grup 3:** Oluşturulan kırık intramedüller olarak tespit edildikten sonra hazırlanan amniyotik membran kırık hattını 360 derece saracak şekilde uygulanarak tibia önünde birleşen uçları proximal ve distalde 5.0 vicryl ile sütüre edildi. Cilt kapatıldıktan sonra kırık bölgesine 0.3 ml amniyotik sıvı enjekte edildi.



**Şekil 3:** Cerrahi işlem sonunda kas fasciası ve cilt kapandıktan sonraki görüntüler



**Şekil 4:** Cerrahi işlem esnasında osteotomize edilmiş tibiannın görünümü

<b>Opere Edilen Tibia Sayısı</b>		
	Üçüncü hafta	Altıncı hafta
<b>Grup 1 (Kontrol)</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
<b>Grup 2 (AS)</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
<b>Grup 3 (AS+AM)</b>	<b>12</b>	<b>12</b>

**Tablo1:** Opere Edilen Tibiaların Gruplara Göre Dağılımı

Cerrahi işlem sonrası, tüm hayvanların kafeste atel olmaksızın yürümelerine izin verildi.

Her deneğe enfeksiyon profilaksisi amacıyla preoperatif bir doz ve postoperatif iki gün boyunca 50 mg/kg/gün dozda 1. kuşak sefalosporin (sefazolin sodyum) IM olarak uygulandı.

Deney süresince; bir hayvan yara yerinde pürülan akıntı ve enfeksiyon, bir hayvan her iki tibia da fiksasyon kaybı, bir hayvan da 2.haftada kafesinde ölü bulunduğu için çalışmadan çıkarıldı.

Çalışmaya alınan denekler, 3. ve 6. hafta sonunda yüksek doz eter kullanılarak sakrifiye edildi.

### **5.5.Histopatolojik Değerlendirme**

Çalışmaya alınan 66 tibiyanın, 34 tanesi 3. hafta (erken), 32 tanesi de 6. hafta (orta)'larda kırık iyileşmesi açısından histolojik olarak Modifiye Lane-Sandhu histolojik skorlama kriterlerine göre değerlendirildi. Bu skorlama sisteminde kaynama (proksimal ve distal), spongioz kemik, korteks ve kemik iliği ayrı ayrı değerlendirilerek, toplamda 0-20 aralığında skorlandı.

Sakrifiye edilen her bir denekten çevre yumuşak dokular temizlendikten sonra alınan tibialar, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda % 10'luk nötral formolin solüsyonu içinde 48 saat saklandı. Daha sonra spesmenler % 10'luk formik asit solüsyonu içinde dekalsifiye edildi. Yaklaşık 2-3 günde dekalsifiye olan tibialar; ototeknikonda dehidrasyon, şeffaflama ve parafinizasyon aşamalarından geçirildikten sonra parafin içine gömülerek bloklandı. Kırık hattına dik geçen ve kallus merkezine yakın 5-6 µm kalınlığında kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eosin boyasıyla boyandı. Bu şekilde hazırlanan preparatların histolojik değerlendirmesi polarize ışık mikroskopunda değerlendirildi. Değerlendirme Modifiye Lane-Sandhu iyileşme skalasına(124) göre yapıldı.



### 5.6.Modifiye Lane-Sandhu Histolojik Kemik İyileşme Skorlaması:

---

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

### Her kategori için olabilecek toplam puanlar

Proksimal kaynama	4
Distal kaynama	4
Spongioz	4
Korteks	4
Kemik iliği	4
<b>Maksimum Skor</b>	<b>20</b>

---



**Şekil 5:** Kırık fiksasyonunu takiben amniyotik membranın kırık hattı etrafına uygulanması

### 5.7.Radyolojik Değerlendirme

Opere edilen tüm hayvanların sakrifikasyon sonrası direkt grafileri çekilerek radyolojik olarak kaynamaları ve kallus oluşumları değerlendirildi.

Radyolojik değerlendirmede kantitatif bir yöntem kullanılmadı.

### **5.8.İstatistiksel Analiz Yöntemi**

Çalışmaya alınan her bir spesmeden elde edilen histopatolojik puanlar, istatistiksel olarak nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi ve uygulanan her bir tedavinin etkisi ve birbirine göre istatistiksel farklılıkları belirlendi. Son analizde her bir yöntemin üçüncü hafta ve altıncı hafta histolojik değerleri Wilcoxon Testi kullanılarak hesaplandı. Data analizleri, bilgisayarda SPSS ( version 11.0 for Windows, Chicago, IL, USA) programı yardımıyla yapıldı.

P değeri 0,05 veya daha düşük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

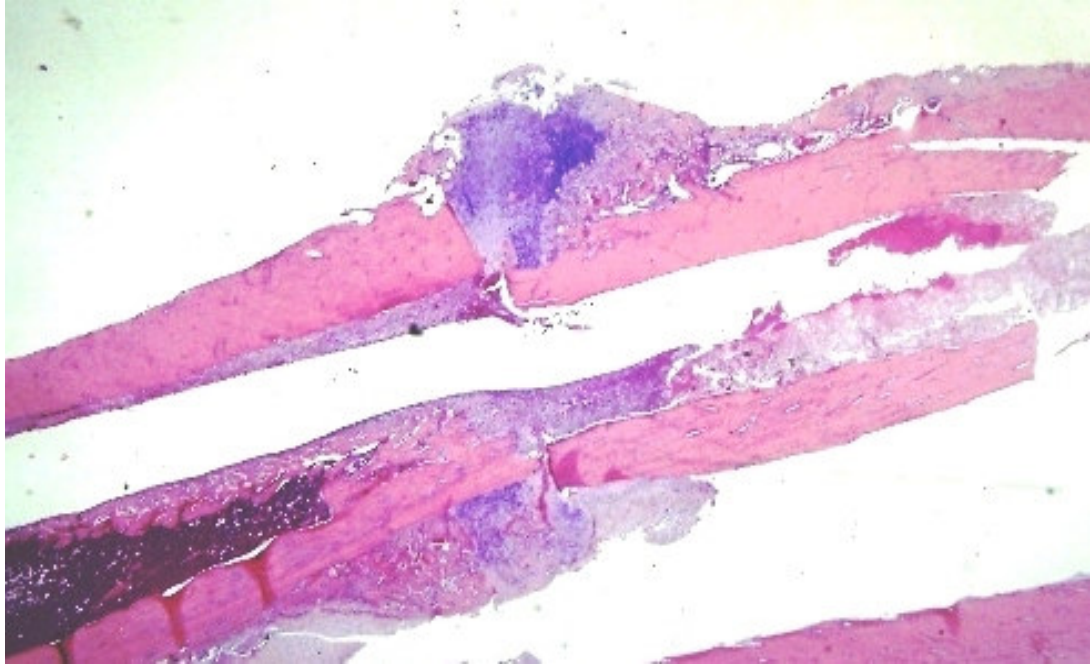
## **6.BULGULAR**

Çalışmaya alınan 66 spesmenin her birine Modifiye Lane-Sandhu iyileşme kriterlerine göre puanlar verildi. Çalışmamızda iki ayrı dönemde (üçüncü ve altıncı hafta) histopatolojik olarak değerlendirilmiş üçer grup (toplam altı) mevcuttur. Bu grupların biri kontrol (grup 1), diğer ikisi amniyotik sıvı (grup2) ve amniyotik sıvı ile beraber amniyotik membran (grup 3) tedavi grubudur. Elde edilen histolojik puanlar hem uygulanan her bir tedavinin kendi dönemine ait kontrol grubu ile hem de diğer benzer tedavi yöntemiyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu nedenle her grubun ortalama puanları ve standart sapmaları hesaplandı ve grupların birbirinden farkını ortaya koymak için non-parametrik istatistiksel testlerden Mann Whitney U Testi kullanıldı. Grup içinde üçüncü hafta ve altıncı hafta histolojik iyileşme farkını ortaya koymak için ise Wilcoxon Testi kullanıldı. İstatistiksel sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

İlk olarak üçüncü hafta histolojik sonuçları ile altıncı haftanın histolojik sonuçları Wilcoxon Testi kullanılarak karşılaştırıldı. Genel olarak bakıldığında her üç grupta da altıncı hafta sonuçları üçüncü haftaya göre daha iyi olarak bulunmuştur. Kontrol grubu dışındaki her iki deney grubunda da, altıncı hafta sonuçları üçüncü hafta sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sonuçlar sırasıyla,  $p= 0,937$  ;  $p=0,037$ ;  $p=0,041$  dir.

GRUPLAR	3.Hf.Histoloji	6.Hf.Histoloji	p
KONTROL (grup1)	8,833±2,329	9,583±4,294	0,937
A. SIVI (grup2)	9,750±2,895	13,800±3,705	0,037*
AM+AS (grup3)	7,500±1,649	10,100±1,911	0,041*

**Tablo 2 :** Grupların her birinin kendi içinde üçüncü hafta ve altıncı hafta histolojik sonuçlarının karşılaştırılması



**Şekil 6:** Üçüncü hafta sonunda osteokondral kaynama olarak değerlendirilen bir spesmenin 2x büyütmedeki görünümü

Tablo 3'te üçüncü haftaya ait üç grubun tibia sayıları, Modifiye Lane-Sandhu Skorları ve ortalama değerleri, Tablo 4 de ise bu skorların ayrıntılı çözümleri verilmiştir.

GRUPLAR	TİBİA NUMARASI	MODİFİYE LANE-SANDHU SKORU	ORTALAMA±SS
<b>KONTROL</b> <b>(grup 1)</b>  <b>(3.HAFTA)</b> <b>n=12</b>	1	6	<b>8,833±2,329</b>
	2	11	
	3	10	
	4	12	
	5	8	
	6	8	
	7	10	
	8	9	
	9	10	
	10	11	
	11	4	
	12	7	
<b>AMNİYOTİK</b> <b>SIVI</b> <b>(grup 2)</b>  <b>(3.HAFTA)</b> <b>n=12</b>	13	9	<b>9,750±2,895</b>
	14	10	
	15	9	
	16	16	
	17	10	
	18	13	
	19	7	
	20	10	
	21	10	
	22	4	
	23	9	
	24	10	
<b>AMNİYOTİK</b> <b>MEMBRAN&amp;</b> <b>AMNİYOTİK</b> <b>SIVI</b> <b>(grup 3)</b>  <b>(3.HAFTA)</b> <b>n=10</b>	25	11	<b>7,500±1,649</b>
	26	8	
	27	9	
	28	5	
	29	7	
	30	8	
	31	6	
	32	7	
	33	7	
	34	7	

**Tablo 3:** Üç grubun üçüncü haftaya ait histopatolojik skorlarının gruplara göre dağılımı ve ortalama skorları

Grup	Tibia no	Kaynama (total)	spongioz	korteks	Kemik iliği	Toplam puan	Ort.puan
<b>Kontrol (grup 1)</b>  <b>3.hafta n=12</b>	<b>1</b>	2	2	1	1	<b>6</b>	<b>8,833</b>
	<b>2</b>	4	3	3	1	<b>11</b>	
	<b>3</b>	4	2	3	1	<b>10</b>	
	<b>4</b>	4	3	3	2	<b>12</b>	
	<b>5</b>	4	2	1	1	<b>8</b>	
	<b>6</b>	4	2	1	1	<b>8</b>	
	<b>7</b>	4	1	3	2	<b>10</b>	
	<b>8</b>	3	3	2	1	<b>9</b>	
	<b>9</b>	4	2	3	1	<b>10</b>	
	<b>10</b>	4	3	2	2	<b>11</b>	
	<b>11</b>	2	1	1	0	<b>4</b>	
	<b>12</b>	4	2	1	0	<b>7</b>	
<b>A.S. (grup 2)</b>  <b>3.hafta n=12</b>	<b>13</b>	4	1	3	1	<b>9</b>	<b>9,750</b>
	<b>14</b>	4	2	3	1	<b>10</b>	
	<b>15</b>	4	2	3	0	<b>9</b>	
	<b>16</b>	8	4	3	1	<b>16</b>	
	<b>17</b>	4	3	2	1	<b>10</b>	
	<b>18</b>	6	3	3	1	<b>13</b>	
	<b>19</b>	4	1	2	0	<b>7</b>	
	<b>20</b>	5	2	3	0	<b>10</b>	
	<b>21</b>	4	1	3	2	<b>10</b>	
	<b>22</b>	2	1	1	0	<b>4</b>	
	<b>23</b>	3	3	2	1	<b>9</b>	
	<b>24</b>	4	3	2	1	<b>10</b>	
<b>A.M &amp; A.S (grup 3)</b>  <b>3.hafta n=10</b>	<b>25</b>	4	2	3	2	<b>11</b>	<b>7,500</b>
	<b>26</b>	4	1	2	1	<b>8</b>	
	<b>27</b>	4	1	2	2	<b>9</b>	
	<b>28</b>	3	1	1	0	<b>5</b>	
	<b>29</b>	3	1	2	1	<b>7</b>	
	<b>30</b>	4	2	1	1	<b>8</b>	
	<b>31</b>	3	1	1	1	<b>6</b>	
	<b>32</b>	4	1	1	1	<b>7</b>	
	<b>33</b>	4	2	1	0	<b>7</b>	
	<b>34</b>	4	2	1	0	<b>7</b>	

**Tablo 4:**Üçüncü haftaya ait spesmenlerin histolojik skorlarının ayrıntılı görünümü

Tablo 5’de altıncı haftaya ait üç grubun tibia sayıları, Modifiye Lane-Sandhu Skorları ve ortalama değerleri, Tablo 6’da ise bu skorların ayrıntılı çözümleri verilmiştir.

GRUPLAR	TİBİA NUMARASI	MODİFİYE LANE-SANDHU SKORU	ORTALAMA±SS
<b>KONTROL</b> <b>(grup 1)</b>  <b>(6.HAFTA)</b>  <b>n=12</b>	35	8	<b>9,583±4,294</b>
	36	7	
	37	14	
	38	4	
	39	11	
	40	7	
	41	6	
	42	12	
	43	7	
	44	6	
	45	17	
	46	16	
<b>AMNİYOTİK SIVI</b> <b>(grup 2)</b>  <b>(6.HAFTA)</b>  <b>n=10</b>	47	16	<b>13,800±3,705</b>
	48	9	
	49	12	
	50	16	
	51	14	
	52	17	
	53	15	
	54	17	
	55	6	
	56	16	
<b>AMNİYOTİK MEMBRAN&amp; AMNİYOTİK SIVI</b> <b>(grup 3)</b>  <b>(6.HAFTA)</b>  <b>n=10</b>	57	7	<b>10,100±1,911</b>
	58	10	
	59	11	
	60	13	
	61	12	
	62	12	
	63	9	
	64	8	
	65	9	
	66	10	

**Tablo 5:** Üç grubun altıncı haftaya ait histopatolojik skorlarının gruplara göre dağılımı ve ortalama skorları

Grup	Tibia no	kaynama	spongioz	korteks	Kemik iliği	Toplam puan	Ort.puan	
Kontrol (grup 1)	35	4	2	1	1	8	9,583	
	36	4	1	1	1	7		
	37	6	3	3	2	14		
	38	2	1	1	0	4		
	39	5	2	2	2	11		
	40	3	1	2	1	7		
	6.hf N=12	41	2	2	1	1		6
		42	5	2	4	1		12
		43	4	1	1	1		7
		44	3	1	1	1		6
45		7	3	4	3	17		
46		7	3	3	3	16		
A.S. (grup 2)	47	8	3	3	2	16	13,800	
	48	3	2	2	2	9		
	49	5	3	3	1	12		
	50	8	2	4	2	16		
	51	7	3	3	1	14		
	52	8	3	4	2	17		
	6.hf n=10	53	5	4	3	3		15
		54	8	3	4	2		17
		55	3	1	1	1		6
		56	8	3	4	1		16
A.M & A.S (grup 3)	57	4	1	1	1	7	10,100	
	58	5	2	2	1	10		
	59	6	2	2	1	11		
	60	6	2	3	2	13		
	61	5	3	2	2	12		
	62	6	2	3	1	12		
	63	4	2	2	1	9		
	64	4	1	2	1	8		
	6.hafta n=10	65	4	1	3	1		9
		66	4	2	2	2		10

Tablo 6: Altıncı haftaya ait spesmenlerin histolojik skorlarının ayrıntılı görünümü



<b>KONTROL (grup 1)</b>	<b>AMNİYOTİK SIVI (grup 2)</b>	<b>P</b>
<b>8,833±2,329</b>	<b>9,750±2,895</b>	<b>0.630</b>
<b>KONTROL (grup 1)</b>	<b>AMNİYOTİK MEMBRAN&amp; AMNİYOTİK SIVI (grup 3)</b>	<b>P</b>
<b>8,833±2,329</b>	<b>7,500±1,649</b>	<b>0.123</b>

**Tablo 7:** Tedavi Uygulanan Grupların Üçüncü Hafta Histolojik Sonuçlarının Kontrol Grubuyla Karşılaştırılması

Uygulanan tedavilerin üçüncü hafta sonuçları, kendi dönemlerine ait kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, amniyotik sıvı ile tedavi edilen grupta ( grup 2 ) elde edilen histolojik puan ortalamaları (9,750±2,895), kontrol grubunun ( grup 1) histolojik puan ortalamalarından (8,833±2,329) bir miktar yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.(p=0.630) Diğer taraftan amniyotik membran ve amniyotik sıvının birlikte kullanıldığı grubun ( grup 3 ) histolojik puan ortalamaları (7,500±1,649) kontrol grubunun gerisinde kalmasına rağmen burada da istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı.(p=0.123)

<b>AMNİYOTİK SIVI (grup 2)</b>	<b>AMNİYOTİK MEMBRAN&amp; AMNİYOTİK SIVI (grup 3)</b>	<b>P</b>
<b>9,750±2,895</b>	<b>7,500±1,649</b>	<b>0.021*</b>

**Tablo 8:** Tedavi Uygulanan Grupların Üçüncü Hafta Histolojik Sonuçlarının Kendi Aralarında Karşılaştırılması

Kontrol grubu dışarıda bırakılarak, üçüncü hafta sonunda amniyotik sıvı (grup 2) uygulanan grubun histolojik puan ortalaması (9,750±2,895) ile amniyotik sıvı ve amniyotik membranın birlikte uygulandığı grubun (grup3) puan ortalaması (7,500±1,649) karşılaştırıldı. Tek başına amniyotik sıvı uygulanan grubun sonuçları, amniyotik membran ve amniyotik sıvının kombine uygulandığı grubun sonuçlarından yüksek bulundu. Bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi. ( $p < 0,05$ )

<b>KONTROL (grup 1)</b>	<b>AMNİYOTİK SIVI (grup 2)</b>	<b>p</b>
<b>9,583±4,294</b>	<b>13,800±3,705</b>	<b>0.036*</b>
<b>KONTROL (grup 1)</b>	<b>AMNİYOTİK MEMBRAN&amp; AMNİYOTİK SIVI (grup 3)</b>	<b>p</b>
<b>9,583±4,294</b>	<b>10,100±1,911</b>	<b>0.418</b>

**Tablo 9:** Tedavi Uygulanan Grupların Altıncı Hafta Histolojik Sonuçlarının Kontrol Grubuyla Karşılaştırılması

Uygulanan tedavilerin altıncı hafta sonuçları, kendi dönemlerine ait kontrol grubunu sonuçları ile karşılaştırıldı. Tek başına amniyotik sıvı uygulanan grubun(grup 2) histolojik puan ortalaması (13,800±3,705), kontrol grubunun(grup 1) histolojik puan ortalamasından (9,583±4,294) belirgin şekilde yüksek bulundu. Grup 1 ve 2 arasındaki bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi. ( $p < 0,05$ ) Amniyotik sıvı ve amniyotik membranın kombine uygulandığı grubun (grup 3) histolojik puan ortalaması (10,100±1,911), kontrol grubunun histolojik puan ortalaması (9,583±4,294) ile karşılaştırıldığında, kontrol grubunun sonuçları AM&AS grubunun gerisinde kalmasına rağmen arada istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. ( $p>0,05$ )

AMNİYOTİK SIVI (grup 2)	AMNİYOTİK MEMBRAN& AMNİYOTİK SIVI (grup 3)	p
13,800±3,705	10,100±1,911	0.019*

**Tablo 10:** Tedavi Uygulanan Grupların Altıncı Hafta Histolojik Sonuçlarının Kendi Aralarında Karşılaştırılması

Son olarak; altıncı hafta sonunda kontrol grubu dışarıda bırakılarak tek başına amniyotik sıvı uygulanan grubun (grup 2) histolojik puan ortalaması (13,800±3,705) ile amniyotik sıvı ve amniyotik membranın kombine uygulandığı grubun (grup 3) histolojik puan ortalaması (10,100±1,911) karşılaştırıldığında, tek başına amniyotik sıvı uygulanan grubun (grup 2) sonuçlarının AM&AS grubunun (grup 3) sonuçlarına göre belirgin şekilde yüksek olduğu ve bu farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptandı. ( $p < 0,05$ )

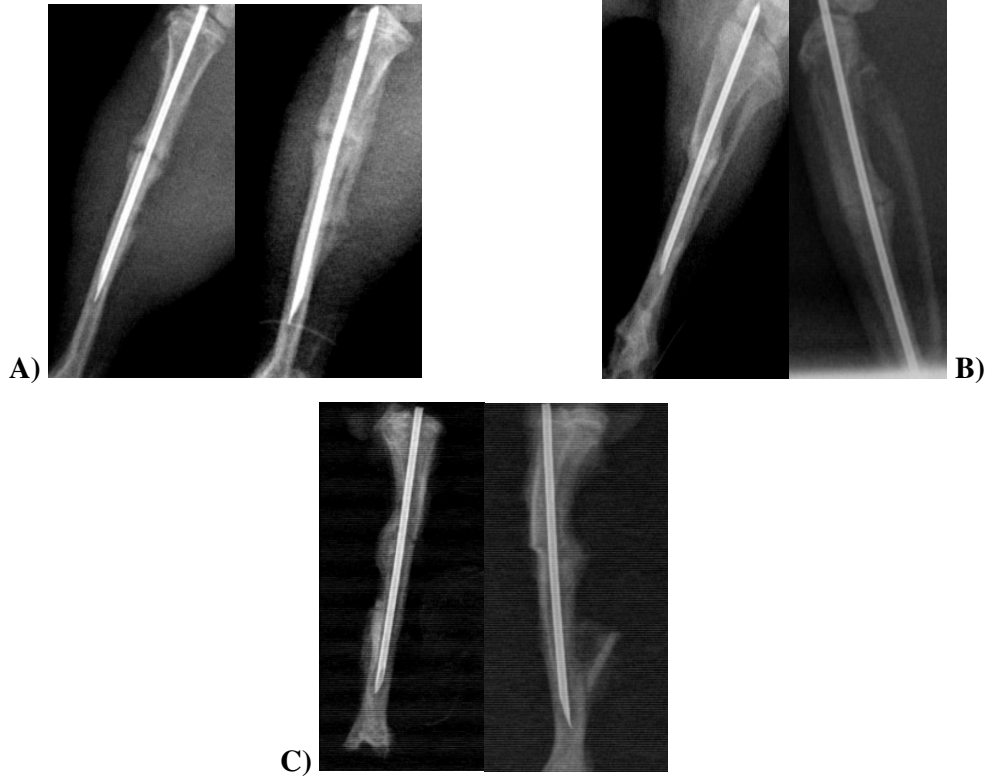
### ***Radyolojik Bulgular***

Tüm hayvanların sakrifiye edildikten sonra iki yönlü direkt grafileri çekilerek radyolojik olarak kırık uçları arasındaki köprüleşme, kallus oluşumu ve remodelasyon değerlendirildi. Tüm kortekslerde köprüleşme varsa tam, birden fazla korteksde varsa tam olmayan köprüleşme, hiçbir korteksde yoksa köprüleşmeme olarak değerlendirildi. Radyolojik değerlendirmede kantitatif herhangi bir yöntem kullanılmadı ve istatistiksel analiz yapılmadı.

Üçüncü hafta sonunda radyolojik olarak tüm gruplarda kırık uçları arasında tam olmayan köprüleşme hakim olup sadece 33 tibiyanın 6'sında tam köprüleşme görüldü. Bunlardan ikisi kontrol grubu, üçü amniyotik sıvı grubu (grup 2), biri ise AM+AS (grup 3) grubundandı. Dört tibiada ise köprüleşme görülmedi. Bunlardan ikisi kontrol (grup 1), biri AS (grup 2) ve biri AS+AM (grup 3) grubundandı. Bu dönemde remodelasyon hiçbir tibiada görülmezken, tamamında kırık hatları görülmekteydi.

Altıncı hafta sonunda ise radyolojik olarak her üç grupta da kırık uçları arasında tam köprüleşme hakim olup kontrol grubunda iki, AS grubunda (grup 2) üç ve AS+AM grubunda (grup 3) bir tibiada remodelasyon görüldü. Köprüleşmeme 32 tibiyanın sadece iki tanesinde

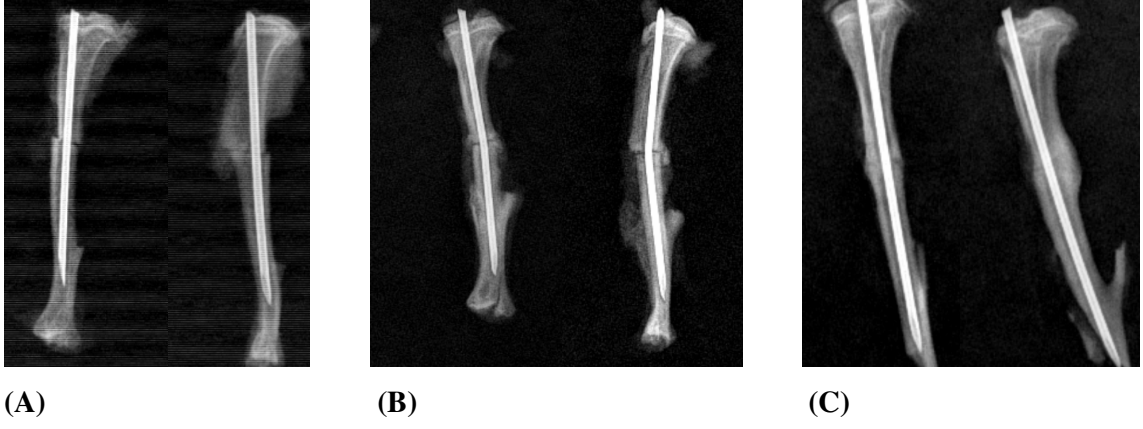
görüldü. Bunlardan biri kontrol, diğeri ise AS+AM (grup 3) grubundandı. Kontrol ve AS grubunda kırık hatları genel olarak kaybolmuşken, AS+AM grubunda kırık uçları arasındaki köprüleşmeye rağmen kırık hatları belirgin şekilde fark edilmekteydi.



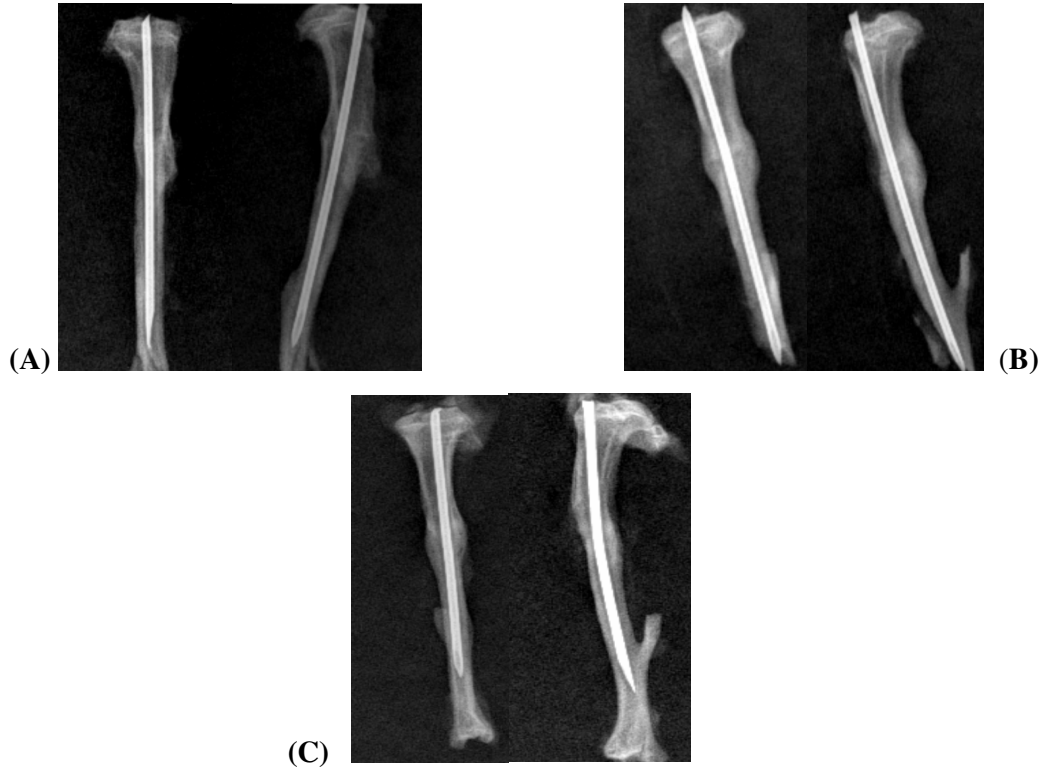
**Şekil 7 :**Üçüncü hafta sonunda kontrol(A), Amniyotik sıvı(B) ve AM+AS(C) gruplarına ait grafi görüntüleri



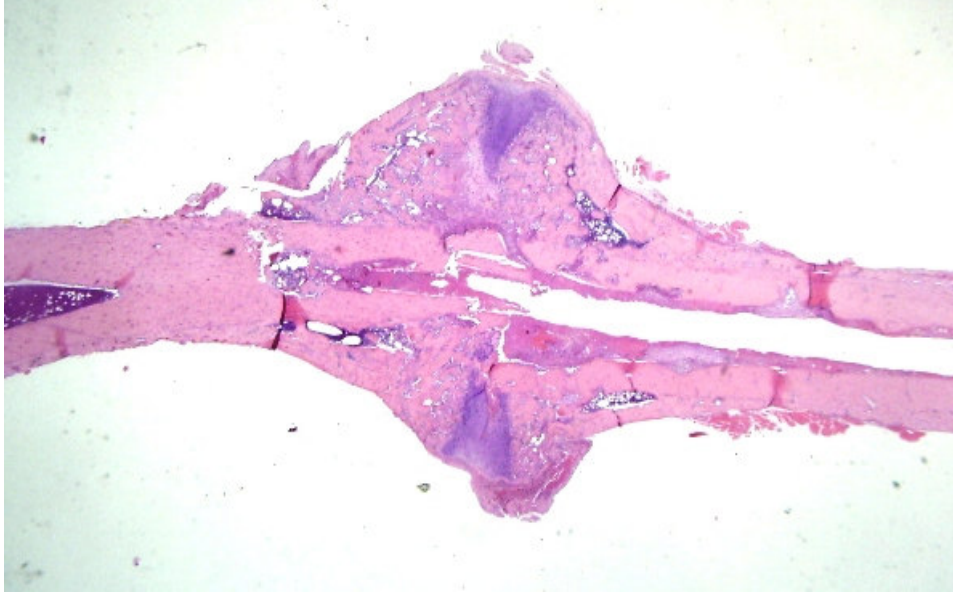
**Şekil 8:**Altıncı hafta sonunda remodelasyonun görüldüğü grafi örnekleri



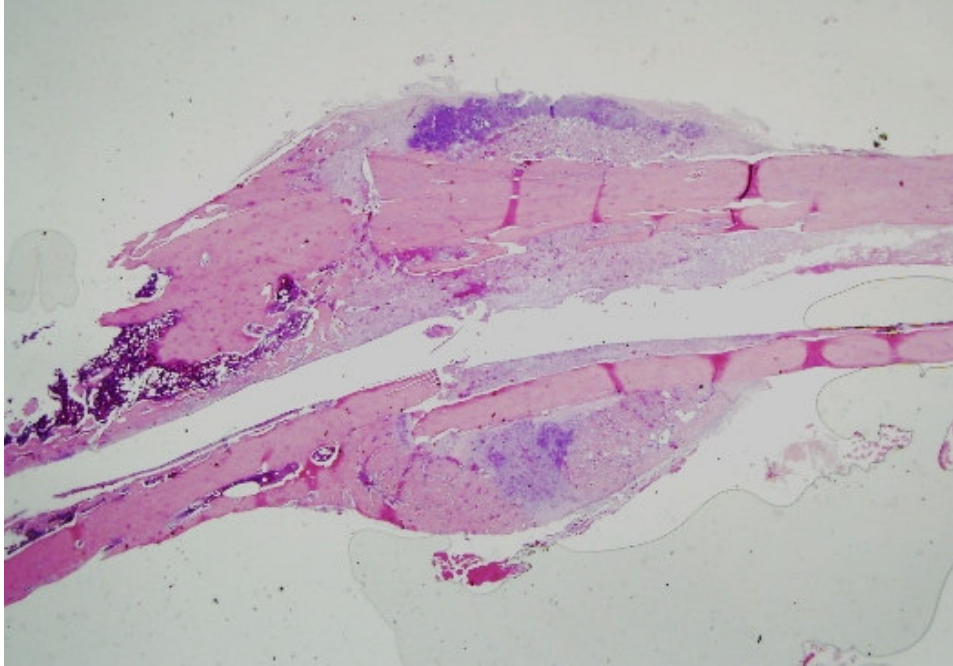
**Şekil 9:**Kırık Uçları Arasında Köprüleşmeme (A), Tam Olmayan Köprüleşme (B) ve Tam Köprüleşme (C)'ye Ait Radyolojik Örnekler



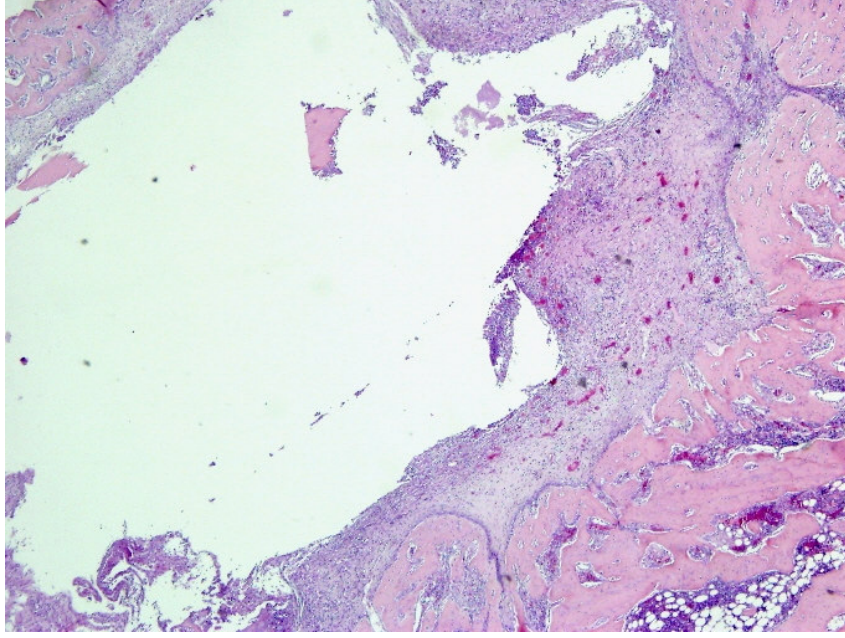
**Şekil 10 :**Altıncı Hafta Sonunda Kontrol(A), Amniyotik sıvı(B) ve AM+AS(C) Gruplarına Ait Radyolojik Görüntüler



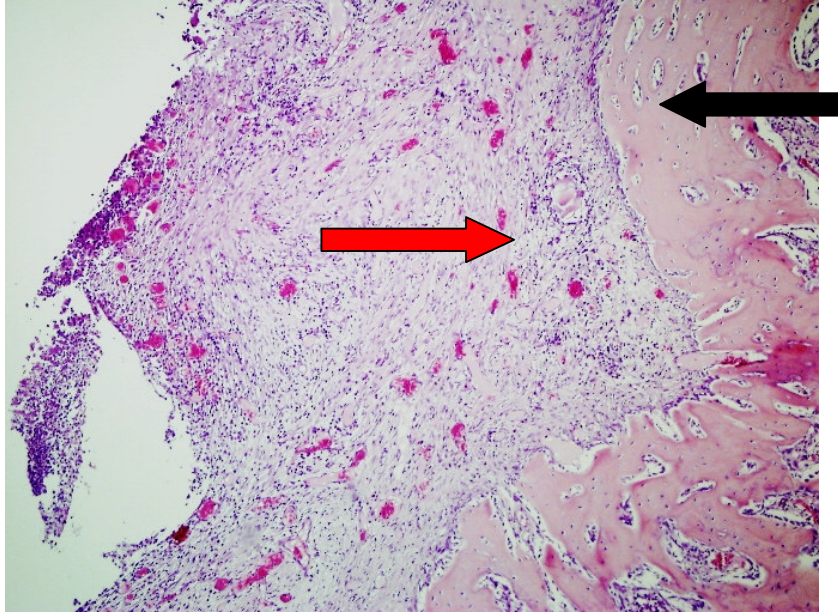
**Şekil 11:** Üçüncü Hafta Sonunda Kontrol Grubuna Ait Bir spesmende x2 büyütmede Osteokondral Kaynama Görünümü



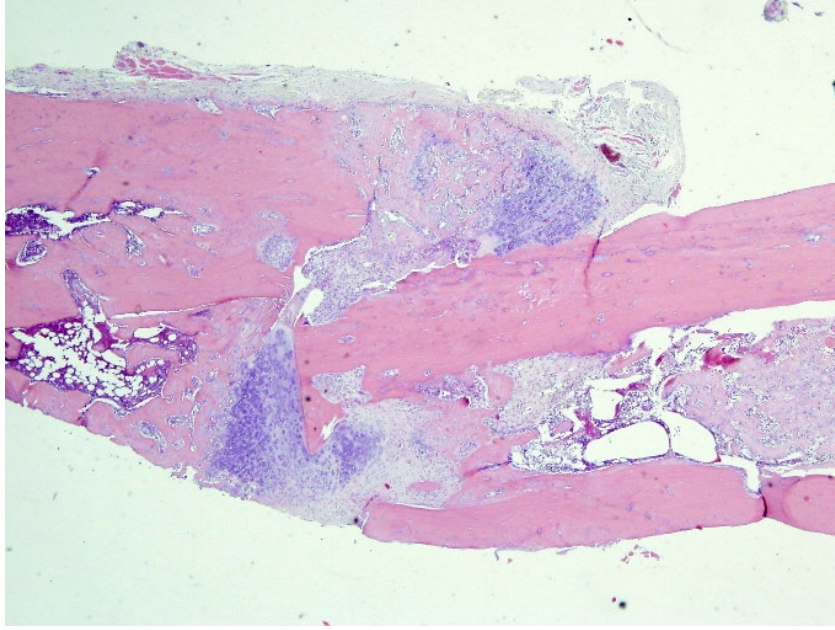
**Şekil 12:** Altıncı Hafta Sonunda Amniyotik Sıvı Grubuna Ait Bir Spesmende x2 Büyütmede Kemiksel Kaynama Görünümü



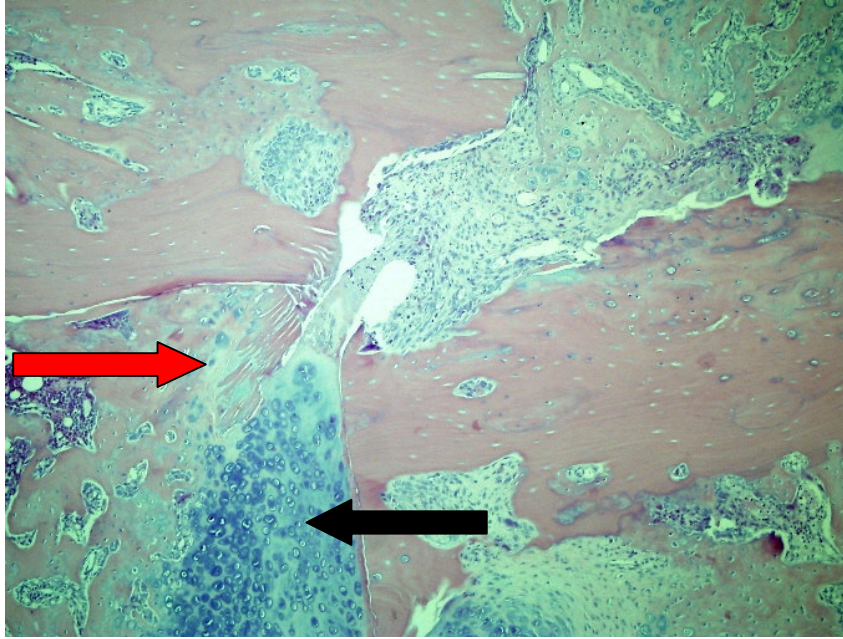
**Şekil 13:** Fibröz Kaynama Olarak Değerlendirilen Bir Spesmenin x4 Büyütmedeki Görünümü



**Şekil 14:** Fibröz kaynamanın görüldüğü yukarıdaki spesmenin x10 büyütmedeki görünümü (siyah ok kemik dokuyu gösterirken, kırmızı ok yoğun fibröz kallus dokuyu göstermektedir)

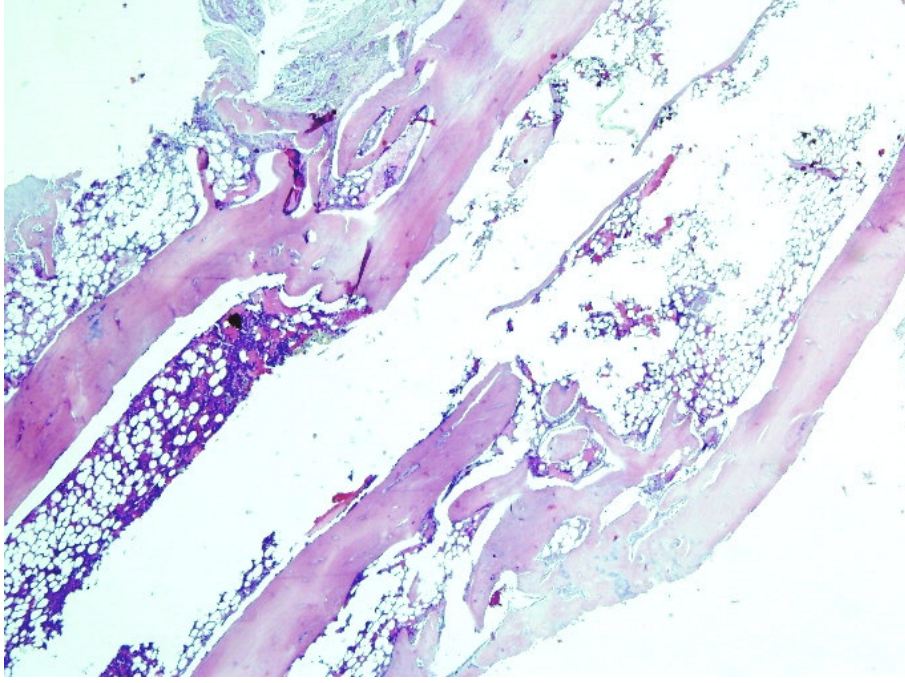


**Şekil 15:** Osteokondral Kaynama Olarak Değerlendirilen Bir Spesmenin x4 Büyütmedeki Görünümü

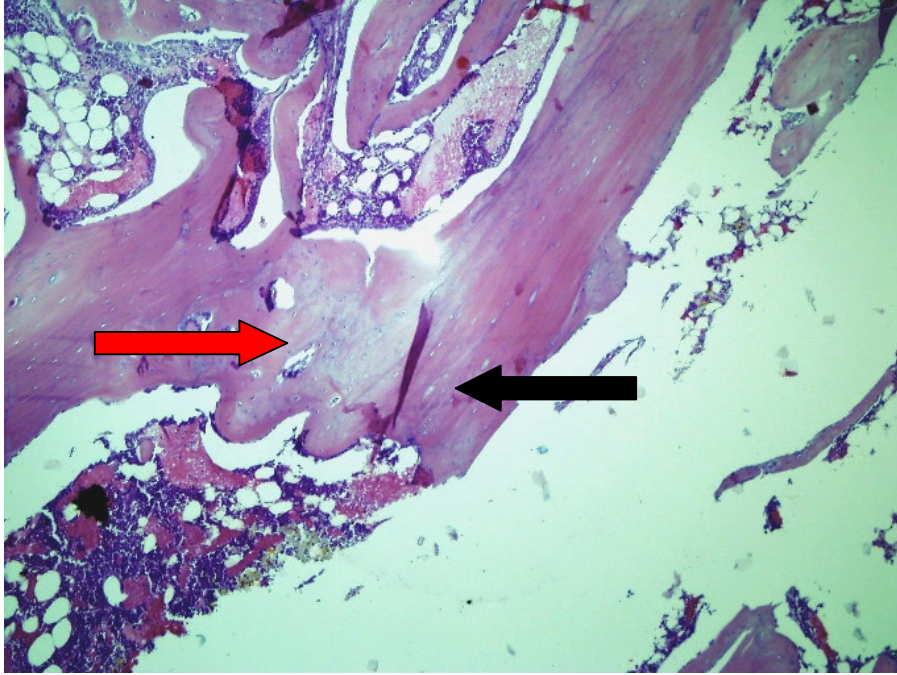


**Şekil 16:** Osteokondral Kaynama Görülen Yukarıdaki Spesmenin x10 Büyütmedeki Görünümü  
(kırmızı ok kırık hatunda kemik gelişimini gösterirken siyah ok kırık dokuyu göstermektedir)

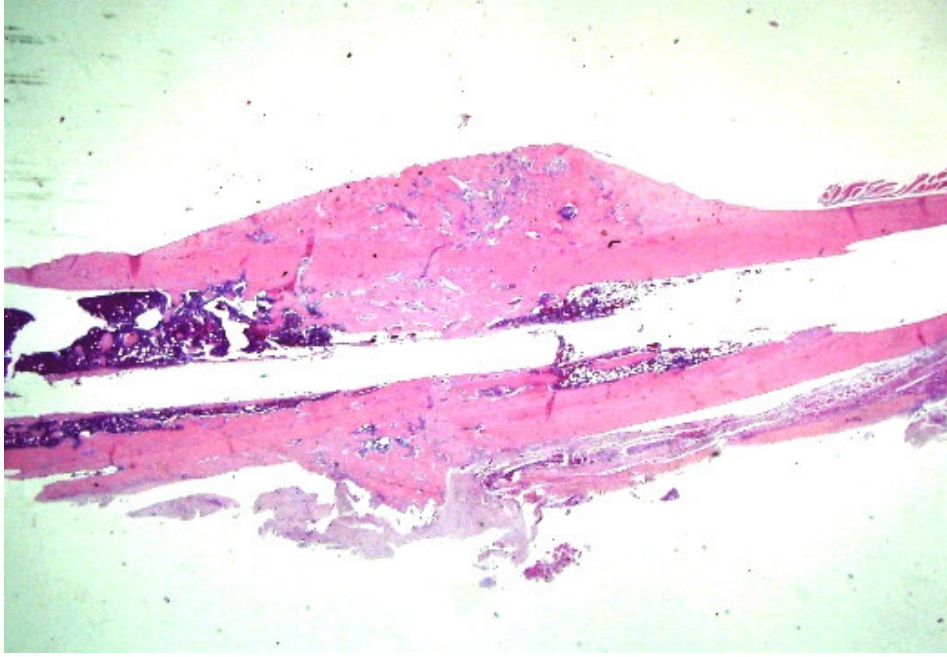




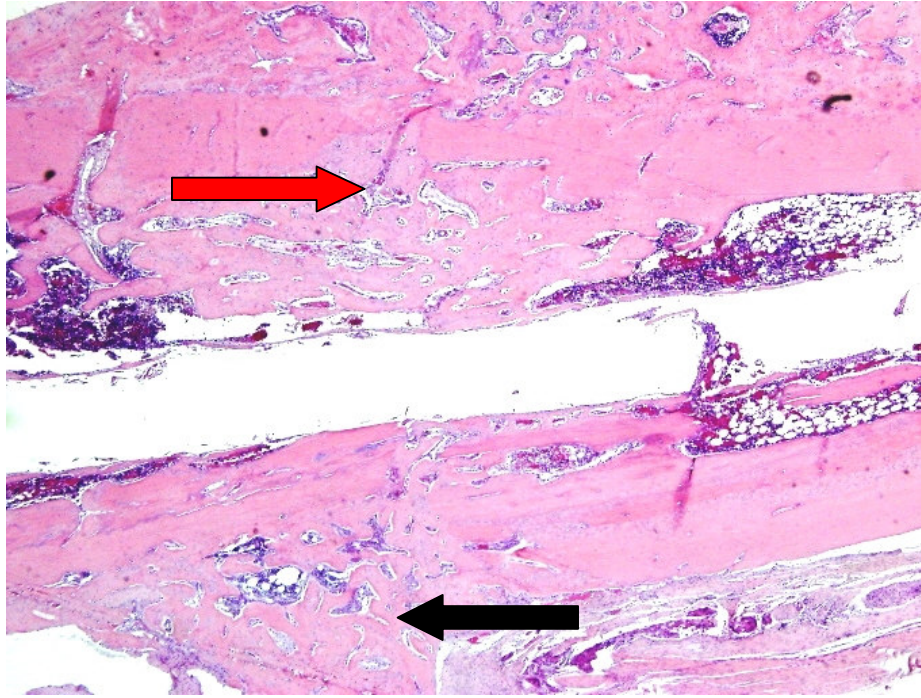
**Şekil 17:** Kemiksel Kaynama Olarak Değerlendirilen Bir Spesmenin x4 Büyütmedeki Görünümü



**Şekil 18:** Kemiksel Kaynama Görülen Yukarıdaki Spesmenin x10 Büyütmedeki Görünümü  
(siyah ok kırık ucundaki matür kemik dokusunu kırmızı ok ise iki kırık uçları arasında gelişen kemiksel köprüleşmeyi göstermektedir)



**Şekil 19:** Bölgenin Komplet Kemiksel Kaynaması Olarak Değerlendirilen Bir Spesmenin x2 büyütmedeki görünümü



**Şekil 20:** Komplet Kemiksel Kaynama Görülen Yukarıdaki spesmenin x4 büyütmedeki görünümü (hem siyah hem de kırmızı ok bölgesinde kaynama dokusunun tamamı kemiksel özellik göstermektedir.)

## **7.TARTIŞMA**

Kemik; vücudun iskelet desteğini oluşturan, hayat boyunca sürekli kendini yenileyen, metabolik olarak aktif ve dinamik bir dokudur(1,2). Travmatik, patolojik ve stres gibi birçok nedenlerle kemiğin anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulduğu kırıklar ortopedi ve travmatoloji pratiğinde sık rastlanan yaralanmalardandır. Kırık sadece kemiği değil aynı zamanda çevresini saran periost ve yumuşak dokuları da ilgilendiren bir olaydır(39,40,43). Kırık iyileşmesi kemik dokunun remodelasyon yeteneği sayesinde diğer doku iyileşmelerinden farklı olarak skar dokusu bırakmadan şekil ve fonksiyon olarak orjinaline en yakın şekilde gerçekleşir(40,65,75,82).

Travmanın şekli ve şiddeti, çevre yumuşak dokularda oluşan hasarın derecesi, kapalı ya da açık tedavi edilmesi, kırığın tespit biçimi, sistemik sorunlar gibi birçok faktörün kırık iyileşme süreci üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir(42,43,46,82). Kırıklar çok büyük oranda konservatif veya cerrahi tedavi yöntemleriyle sorunsuz olarak iyileşirler. Kırıkların sadece %5-10'luk bir bölümü tedavi gerektirecek şekilde kaynamama veya geç kaynama gibi iyileşme sorunları gösterirler(65,66,89,94). Tekrarlayan tedavi gereksinimleri, işgücü kaybı, morbidite artışı ve tedavi maliyetlerinin artması nedeniyle kırık iyileşme sürecini hızlandırmak, kaynama oranlarını en üst düzeye çıkararak kişiyi en kısa sürede normal hayatına döndürmek için birçok yöntem denenmiş ve bir kısmı klinikte kullanım alanı bulmuştur(65,75,89).

Kırık iyileşmesi; inflamasyon, onarım ve remodelasyon olmak üzere temelde üç dönemde gerçekleşir(4,43). Kırık iyileşmesi sadece kemik dokunun değil; periost, çevre yumuşak doku ve medullanın da etkin rol oynadığı oldukça kompleks hücrel ve biyokimyasal süreçler sonucunda gerçekleşir(40,41,43). Özellikle kırık iyileşmesindeki hücrel ve biyokimyasal olayların açıklığa kavuşturulması bu süreçlerde etkili birçok biyofiziksel ve biyolojik faktörlerin kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırılmasında yol gösterici olmuştur(65,75,89,98).

Biyofiziksel olarak; elektrik stimülasyonu, ultrason stimülasyonu ve mekanik stimülasyon gibi yöntemler gerek deneysel gerekse klinik olarak kırık iyileşmesinde uygulanmış ve klinikte kullanım alanı bulmuştur(44,60,61,62,66,73,76,77,79,80). Biyolojik olarak ise otojenik ve allojenik kemik greftleri, sentetik greftler, otojen kemik iliği ve birçok büyüme faktörleri araştırılmış, ancak bunların bir bölümü klinik kullanım alanı bulurken

özellikle son dönemlerde üzerinde sıkça çalışılan büyüme faktörleri genel olarak henüz araştırma aşamasındadır(33,65,81,82,83,84). Kemik ve kırık iyileşmesinde etkili olduğu düşünülen BMP(90,92,94,95,96), TGF- $\beta$ (97,102), FGF(99,100), IGF ve GH(53,102,125), PDGF(126), VEGF(104,105) ve NGF(127) ile ilgili literatürde çok sayıda araştırma mevcuttur. Ancak bunların büyük çoğunluğu hayvan çalışması aşamasındadır.

Kırık iyileşmesi üzerine çeşitli yöntemlerin etkilerinin araştırıldığı hayvan çalışmalarında ratlar, fareler, tavşanlar, köpekler, koyunlar, babunlar, ve domuzlar gibi çok geniş yelpazede hayvan çeşidinin kullanılabilmesi literatürde belirtilmiştir(128). Biz proje aşamasında çalışmayı cerrahisi ve modellemesi daha gerçekçi olacağı düşüncesiyle tavşanlarda yapmayı planlamıştık. Ancak bundan önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda gerek izogenetik hayvan bulmada gerekse de bulduğumuz hayvanların laboratuvar ortamında çok çabuk ölmeleri şeklinde yaşadığımız sorunlar bizi laboratuvarımızda üretilen, izogenetik olduklarına güvendiğimiz ve yeterli sayıda elde edebildiğimiz ratları deney hayvanı olarak kullanmaya yöneltti. Literatürdeki kırık iyileşmesi ile ilgili birçok çalışmanın da ratlar üzerinde yapılmış olması bu konuda bize cesaret verdi(102,126,129,130).

Kırık iyileşmesi üzerine büyüme faktörleri ve diğer moleküllerin etkilerini araştıran çalışmalarda oluşturulan kırık modelinin de oldukça önemli olduğu belirtilmiştir(103,128,131). Kapalı basit kırık, açık osteotomi şeklinde oluşturulan kırık, kaynamama modeli ve segmental kırık modelleri kullanılabilir. Kırığın şekli ve koşullar; ortamdaki hücrelerin çeşitliliği, endojen büyüme faktörlerinin konsantrasyonu ve hücrelerdeki reseptör oranı üzerinde oldukça etkilidir(103,132). Kapalı kırık modeli literatürde birçok çalışmada kullanılmış olmasına rağmen açık osteotomi ile oluşturulan kırıkta kaynamanın geç olması ve kaynamamaya yatkınlık oluşturması nedeniyle kullanılacak tedavi yönteminin etkinliğini göstermede daha başarılı olabileceği belirtilmiştir(131). Biz de bu doğrultuda çalışmamızda cerrahi diseksiyon sonrası, periostu sıyrarak kesici motorla osteotomi uyguladık, bu aynı zamanda amniyotik membranı uygulayabilmemiz için de gerekli olan bir yöntemdi.

Literatürde kırık modeli sonrası tespit yöntemleri olarak intramedüller tespit, plaklı tespit ve eksternal fiksator kullanıldığı görülmektedir(95,102,128,133). Biz çalışmamızda kırık oluşturduktan sonra diz eklemine açmadan kapalı olarak tibia proksimalinden girerek enjektör iğnesi ile intramedüller tespit uyguladık. Hem temin etme ve uygulama kolaylığı açısından, hem de rijid olmayan tespit yapıp kallus dokusu ile sekonder kırık iyileşmesi

sağlamak amacıyla bu yöntemi tercih ettik. Rat tibiası çok küçük olduğundan ratlarda tespit yöntemi olarak literatürde sıklıkla intramedüller tespitin tercih edilmiş olması da bunu desteklemekteydi(94,102,128,129). Cerrahi sonrası hayvanlara dışarıdan ekstra bir tespit ve immobilizasyon uygulamadık

Literatürde kırık iyileşmesinin histolojik değerlendirmesi bazı çalışmalarda puanlama olmaksızın gross olarak kalitatif şekilde yapılırken(94,133), bazı çalışmalarda ise Allen ve ark'nın tarif ettiği değerlendirme skalası(130) kullanılmıştır. Bu skala iyileşme dokusunun yani kallusun hangi aşamada olduğunu gösteren 0-4 arası puanlanan bir değerlendirme yöntemidir. Literatürde ayrıca Modifiye Lane-Sandhu histolojik değerlendirme skalası da kullanılmıştır(129). Bu skalada iyileşme kriteri olarak kırık hattının proksimal ve distal tarafında oluşan iyileşmenin şekli, korteks, spongios kemik ve kemik iliği ayrı ayrı değerlendirilerek, 20 puan üzerinden skorlanmaktadır. Biz çalışmamızda histolojik değerlendirme yöntemi olarak; iyileşmeyi daha detaylı değerlendirebileceğimizi düşündüğümüz, Modifiye Lane-Sandhu histolojik değerlendirme skalasını kullandık(124,129).

Literatürdeki benzer çalışmalarda kırık iyileşmesinin radyolojik değerlendirilmesinde çok farklı yöntemlerin kullanıldığını gördük. Direkt grafiler ile kırık uçları arasındaki köprüleşmenin durumu değerlendirilmiş(102). Çeşitli ölçüm teknikleri ile kallus boyutları ölçülmüş ve puanlama sistemleri kullanılmış(100).Ancak tüm bu radyolojik değerlendirmelerin kırık iyileşmesini değerlendirme de çok da objektif olmadığı ve değerlendirmenin kişiden kişiye farklılık gösterdiği yönünde bilgiler mevcuttur.Bu nedenle biz de literatürde birtakım çalışmalarda olduğu gibi, çalışmamızda uyguladığımız radyolojik incelemeler üzerinde kantitatif bir ölçüm ve puanlama uygulamayıp histolojik değerlendirmemize bir destek olarak kullandık(59,130,134).

Literatürü araştırdığımızda kırık iyileşmesinin çeşitli dönemlerinde ve hücre fonksiyonlarında rolü olduğu belirtilen birçok faktörün dışarıdan kırık hattına verilmesinin etkileri hakkında çok sayıda çalışmanın olduğunu gördük. Bu faktörlerin; lokal veya sistemik olarak, tek başına veya taşıyıcı eşliğinde, enjeksiyon veya açık uygulama şeklinde uygulanabileceği belirtilmiştir(103). Sistemik uygulamanın nadiren hormon ve ilaç etkilerini araştırmak için(59,125,129,130), açık uygulamanın ise daha çok kemik defektlerinde greft ile birlikte uygulanımda kullanıldığını(96,133) gördük. Literatürde sık uygulanan yöntem olarak erken dönemde tek enjeksiyon ve taşıyıcı eşliğinde uygulama göze çarpmaktadır(94,99,

100,131,134). Biz de çalışmamızda amniyotik sıvıyı erken dönemde kırık hattına tek doz lokal enjeksiyon şeklinde uyguladık. Hyaluronik asidin viskosuplementasyon amacıyla kullanımının birden fazla enjeksiyonlar şeklinde uygulanıyor olması ve bu nedenle amniyotik sıvının da birden fazla kez yapılmasının uygun olabileceği düşünülse de, gerek literatürdeki diğer amniyotik sıvı çalışmaları(118,121,122) gerekse de modelleme olarak aldığımız büyüme faktörü ve hyaluronik asit kombinasyonlarının(95,99,100) tek doz enjeksiyon şeklinde uygulanmış olması bizi bu yönde uygulamaya yöneltti.

Çalışmamızda tek başına amniyotik sıvı uygulaması ile amniyotik membranla kombine olarak amniyotik sıvı uygulamasının kırık iyileşmesi üzerine etkilerini araştırdık.

İlk olarak tek başına amniyotik sıvı enjeksiyonu uyguladığımız tedavi şeklini inceleyecek olursak, bu tedaviyi literatürde büyüme faktörlerinin ayrı ayrı, bir arada veya taşıyıcı ile tek doz enjeksiyon şeklindeki uygulamalarına benzetebiliriz.

Amniyotik sıvı fetal hayatta koryonik villuslar tarafından üretilir ve içeriğinde bol miktarda hyaluronik asit ve büyüme faktörleri içerir. Özellikle ikinci trimaster esnasında amniyotik sıvı yüksek oranda, yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit içerir. Fetal dönemde oluşan bir yaralanma, amniyotik sıvın içeriğindeki faktörlerle erişkinde olduğu gibi skar dokusuyla değil orjinaline eşdeğer biçimde iyileşir(110,111,115,116). Longaker'in yaptığı bir çalışmada, fetal dokulardaki bu rejenerasyon yeteneğinin ortamda bulunan hyaluronik asidin mezenkimal hücreleri uyarmasına bağlı olduğunu söylemiştir(111). Longaker ve ark.'ları yaptıkları bir diğer çalışmada ise, fetal dönemde olan yaralanma ile erişkin dönemde olan yaralanmayı karşılaştırmış ve sonuçta fetal dönemde yara bölgesinde yüksek miktarda hyaluronik asidi stimüle eden faktör (HASA) saptanmıştır. Bu faktör, devamlı hyaluronik asit salgılatarak iyileşmenin rejenerasyonla olmasını sağlamaktadır(116).

Özgenel ve ark.'ları tavşanlar üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada, fleksör tendon cerrahisi uyguladıkları deneklerde tek doz amniyotik sıvı enjeksiyonu uygulamasının tendon çevresindeki adezyonu azalttığını ve tendonun kontrol grubuna göre tensil kuvvetini arttırarak iyileşme üzerine de etkili olduğunu saptamışlardır(118). Yine literatürde, insan amniyotik sıvısının, periferik sinir iyileşmesini arttırdığı ve çevre dokulara olan yapışıklığı azalttığı (117), perikondral fleplerdeki kırık dokuyu gelişimini arttırdığı(119) deneysel olarak gösterilmiştir.

Huang ve ark.'ları ratların kafatasından elde ettikleri mezenkimal hücrelere farklı molekül ağırlığı ve konsantrasyonlarda hyaluronik asit stimülasyonu uygulayarak osteojenik

farklılaşma üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. HA'in mezenkimal hücreler üzerindeki osteoblastik farklılaşmayı stimüle edici etkisinin doza ve molekül ağırlığına bağımlı olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle yüksek moleküler ağırlıklı HA'de bu etkinin daha belirgin olduğuna dikkat çekmişlerdir(135).

Aslan ve ark.'ları tavşan tibialarında oluşturdukları kemik defektini kontrol grubunda sadece spongiöz allogreft ile deney grubunda ise hyaluronik asit ile kombine edilmiş greftle doldurmuşlar. Histolojik karşılaştırmada 20.günde iki grup arasında anlamlı bir fark yokken 30. ve 40. günlerde hyaluronik asit uygulanan grupta kemik iyileşmesinin kontrol grubuna oranla anlamlı şekilde üstün olduğu gösterilmiştir(108).

Radomsky ve ark.'ları babunların fibulasında oluşturdukları kapalı kırık modelinde FGF-2 ile birlikte hyaluronik asidi taşıyıcı olarak kullanmışlar ve bunu tek doz enjeksiyon şeklinde lokal olarak uyguladıklarını bildirmişlerdir. Bu uygulamanın histolojik, radyolojik ve biyomekanik değerlendirmeler sonucunda kontrol grubuna göre kırık hattında kallus oluşumunu stimüle ederek kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Hyaluronik asidin büyüme faktörü için rezervuar görevi görerek koruyucu etki gösterdiği belirtilen yayında FGF-2 nin hücre proliferasyonunu uyarıcı etkisinin yanı sıra hyaluronik asidin de hücre sel süreçler ve iyileşme için uygun lokal fiziksel çevre oluşturduğu belirtilmiştir(100). Aynı yazar bir başka çalışmasında yine FGF-2 ve hyaluronik asit kombinasyonunu ratlarda kafatasında oluşturduğu kemik defekti ve tavşanlarda oluşturduğu fibula kırık modellerinde farklı dozlarda FGF-2 ile uygulamış. Hyaluronik asidin kırık hattında kemik gelişimi için bir matriks görevi gördüğünü ve FGF-2 ile sinerjistik etki gösterdiğini belirtmiştir. Kombinasyonun kırık iyileşmesini olumlu etkilediğini bildirmekle beraber FGF-2'nin ekzojen uygulanmasının kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin doza bağımlı olduğunu belirtmiştir(99).

Eckardt ve ark.'ları tavşan tibiasında oluşturdukları nonunion modelinde rhBMP-2 (rekombinant insan bone morfogenetik protein) ve taşıyıcı olarak hyaluronik asidin tek doz lokal enjeksiyon şeklinde kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmışlar ve olumlu sonuçlar bildirmişlerdir. Kontrol grubuna sadece hyaluronik asit uygulamışlar ve kombine tedavi uygulanan deney grubunda çok daha belirgin iyileşme görmüşlerdir. Yayında; hyaluronik asidin immunojenik olmayan, enfeksiyon riski taşımayan, osteoblast migrasyonu için skafold benzeri matriks oluşturan ve bağlandığı büyüme faktörünün etki süresini uzatan efektif bir taşıyıcı olduğu belirtilmiştir(95).

Hipotezimizde de belirttiğimiz şekilde hyaluronik asit ve HASA yanı sıra IGF(I-II), FGF(I-II), NGF gibi büyüme faktörleri ve fibronektin, laminin gibi ekstrasellüler makromolekülleri içeren insan amniyotik sıvısını, literatürde içeriğinde barındırdığı faktörlerin kırık iyileşmesi üzerine ayrı ayrı ve birlikte olumlu etkilerinin bildirilmesine dayanarak ratlarda oluşturduğumuz kırık modeline tek doz lokal enjeksiyon şeklinde uyguladık. Üçüncü hafta sonunda; kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark olmayıp amniyotik membranla kombine uygulandığı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha olumlu etki göstermiştir (sırasıyla  $p=0.630$ ,  $p= 0.021^*$ ). Altıncı hafta sonunda ise histolojik iyileşme açısından hem kontrol grubu hem de amniyotik membranla kombine uygulandığı gruba göre daha olumlu etkileri gösterilmiş ve bu olumlu etki istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur (sırasıyla  $p=0.036^*$ ,  $p=0.019^*$ ). Literatürle benzer şekilde biz de amniyotik sıvı tedavisi uyguladığımız hayvanlarda belirgin lokal ve sistemik reaksiyon saptamadık.

Amniyotik sıvı tedavisinin kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin; endojen ve ekzojen hyaluronik asidi artırması(110,111,116) ve içerdiği büyüme faktörlerinin bir arada bulunması(111,112,113,114) ile açıklanabileceğini düşünmekteyiz. Hyaluronik asidin mezenkimal hücre farklılaşması ile osteoindüksiyonu uyurabileceği, büyüme faktörleri için taşıyıcı, kırık iyileşme bölgesinde de etkili bir matriks oluşturabileceği(95,99,136) ve büyüme faktörlerinin de kırık iyileşmesi üzerine gösterilen olumlu etkileri(99,100,102,127) doğrultusunda amniyotik sıvının kırık iyileşmesi üzerine özellikle kontrol grubuna göre altıncı haftada olumlu etki göstermesi literatürde bu konuda yapılan çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Amniyotik membranın hyaluronik asit ile birlikte kullanıldığı hayvan çalışmalarında perinöral adhezyonları(121) ve fleksör tendon iyileşmesi sırasında oluşan peritendinöz adhezyonları belirgin ölçüde engellediği(122) gösterilmiştir. Amniyotik membran özellikle oftalmoloji alanında uzun zamandır ilgi alanı oluşturmuş ve günümüzde büllöz keratit, termal ve kimyasal yaralanmalar gibi birçok patolojide amniyotik membran transplantasyonu şeklinde klinik tedavide kendine yer edinmiştir(138,137).

Tejwani ve ark.'ları termal ve kimyasal yaralanma olan 69 hastanın 72 gözüne uyguladıkları amniyotik membran transplantasyonu ile olumlu sonuçlar elde ettiklerini, bu olumlu etkinin amniyotik membranın erken dönemde hem inflamasyonu engelleyerek skar gelişimi ve fibrozisi önlemesi hem de altındaki dokuda epitelizasyonu artırması ile bağlantılı



olabileceğini belirtmişlerdir(137). Benzer şekilde Lee ve ark.'ları büllöz keratopatili hastalarda amniyotik membran uygulamasının olumlu etkilerini bildirmişlerdir. Amniyotik membranın bir mekanik bariyer olarak ve TGF- $\beta$  seviyesini azaltarak altındaki kök hücrelerin fibroblast gibi farklı hücrelere farklılaşmasını engelleyerek fibrozisi önleyebileceği belirtilmiştir(138).

Kalça tüberkülozuna bağlı olarak gelişen eklem dejenerasyonunun tedavisinde, yeni eklem yüzeyi oluşturmak amacıyla kullanımında da (amniyotik artroplasti) başarılı sonuçlar literatürde yer almaktadır(123). Mencucci ve ark.'ları invitro olarak amniyotik membranın antibiyotikli (netilmisin) ortamda antibiyotiği absorbe edebildiğini, antibiyotiksiz ortama alındığında ise bu antibiyotiği ortama salarak antibiyotik için taşıyıcı olabileceğini göstermişlerdir(139).

Gomes ve ark.'ları tavşan kafatasında oluşturdukları kemik defektini kontrol grubunda doldurmayarak üzerine sadece insan amniyotik membranı, deney grubunda ise defekte otojen demineralize dentin matriksi koyarak üzerine yine amniyotik membranı uygulamışlardır. Kılavuz eşliğinde rejenerasyon modeli oluşturarak amniyotik membran kılavuzluğunda defektteki yeni kemik gelişimini histolojik olarak değerlendirmişler ve sonuç olarak sadece amniyotik membran uygulanan grupta kemik gelişiminin deney grubuna göre geri kaldığını ve membranın kemik yapımında etkili olmadığını belirtmişlerdir. Ancak aynı zamanda hiç amniyotik membran uygulanmamış bir grubun olmamasına da çalışmanın eksik yanı olarak dikkat çekilmiştir. Amniyotik membranda dördüncü haftada fagositik rezorbsiyon görülmüş ancak rejeksiyon ve enfeksiyon tespit edilmemiştir(140).

Hem insan çalışmalarında hem de hayvan deneylerinde, immunolojik reaksiyonlara sebep olmaksızın kullanılabilmesinin, amniyotik membranın düşük immünotesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Aslında ideal şartlarda kullanılacak amniyotik sıvı ve amniyotik membranın deneklerden elde edilmesi daha yararlı olabilir. Ancak her ikisinde hem miktar hem de mevcut koşullar nedeniyle teminindeki zorluklar ve daha önce literatürde yayınlanmış, insan amniyotik dokuları kullanılarak yapılan çalışmalarda immunolojik reaksiyonların görülmemesi nedeniyle, çalışmamızı insan dokuları kullanarak yapmayı uygun bulduk(117,118,119,121,122).

İnsan amniyotik membranının, tartışıldığı üzere tıpta kullanıldığı farklı alanlarda oldukça başarılı sonuçlarının bildirilmesi, içerdiği vazoaktif peptidler, büyüme faktörleri ve sitokinler nedeniyle multifonksiyonel oluşu ve bir taşıyıcı matriks olabileceği düşüncesi kırık

iyileşmesi sırasında özellikle amniyotik sıvı ile birlikte uygulananın etkili olabileceği konusunda bizi oldukça umutlandırdı(123,138,139,141).

Çalışmamızda, tibiada açık disseksiyon ile kas geçilerek osteotomi yapılacak yerin proksimal ve distalinde periost sıyrılıp salınle yıkama eşliğinde osteotomi yapıldı ve ardından intramedüller tespit sonrası sıyrılan bölgeyi saracak genişlikte hazırlanmış olan amniyotik membranı kemiğin etrafına sardık. Kas fasciasını ve cildi kapattıktan sonra kırık hattına amniyotik sıvı enjeksiyonu ile prosedürü sonlandırdık. İkinci tedavi yöntemi olarak etkisini araştırdığımız amniyotik membran ve sıvının birlikte uygulanmasının kontrol grubuna göre hem üçüncü hem de altıncı hafta da olumlu etkisi saptanmadı. Hatta üçüncü haftada iyileşme olarak kontrol grubunun gerisinde iken altıncı haftada bir miktar önüne geçmiştir. Ancak her iki dönemde de aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı(sırasıyla  $p=0.123$   $p=0.418$ ). Sadece amniyotik sıvı uygulanan grup ile karşılaştırıldığında ise hem üçüncü hem de altıncı hafta sonunda tek başına amniyotik sıvı enjeksiyonunun (grup 2) istatistiksel olarak anlamlı şekilde üstün olduğu görülmektedir.( $p<0,05$ )

Amniyotik membranın diğer çalışmalarda belirtilen olumlu etkilerinin aksine biz çalışmamızda kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisini saptayamadık Bu sonuçlara bakıldığında amniyotik membranın kırık iyileşmesini hızlandırmak ve olumlu etkilemek açısından kontrol grubuna üstünlük sağlayamaması ve sadece amniyotik sıvı uygulanan grubun gerisinde kalması bize amniyotik membranın literatürde de belirtildiği şekilde gerçekten de etkili bir mekanik bariyer olduğunu düşündürmüştür(137,138).

Çünkü özellikle literatürde de tarif edildiği şekilde kırık iyileşmesinin daha geç oluşması ve uygulanan tedavinin etkinliğinin daha net ortaya konabilmesi için yapılan açık osteotomi, periost sıyrılması ve intramedüller tespit yapıp eksternal tespit uygulanmaması bizim çalışmamızda da belirtildiği şekilde uygulanmış(131,142,143) ve bu şekilde oluşturulan kırık sonrası iyileşme için gerekli temel hücre kaynağının çevre yumuşak doku yani kas dokusunun olduğu belirtilmiştir(131,143). Yine literatürde kırık hattı ile çevre yumuşak dokular arasında konan cerrahi yamanın bariyer görevi görerek kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir(143).

Geriye dönüp baktığımızda amniyotik membranın kullanıldığı ve iyi sonucunun bildirildiği durumların aslında hiçbirinin kırık iyileşmesi kadar kompleks bir süreç olmadığı dikkat çekmektedir. Genelde yüzeyi mekanik bariyer şeklinde örterek altındaki dokuyu çevreden izole edip aynı doku olarak rejenerasyonunu sağladığı(123,137,138) veya

inflamasyonu çeşitli şekillerde engelleyerek sonrasındaki fibrozis ve adhezyonları önlediği(121,122) görülmektedir. Oysa kırık iyileşmesi özellikle de bizim fiksasyon şeklimiz sonucu oluşmasını beklediğimiz sekonder yani kallus dokusu ile iyileşme; tek bir hücre veya hücresel basamak değil bir çok hücre çizgisini (fibroblast, kondrosit, osteoblast, monosit, osteoklast) içeren ve hem endokondral hem de intramembranöz kemikleşmeyi içeren bir süreçtir(40,41,43). Bu süreçte kemik dokusu kadar periost ve çevre yumuşak doku da özellikle kanlanma açısından oldukça önemlidir(143,144,145).

Ve tüm bunları irdeledikten sonra amniyotik sıvının amniyotik membranla birlikte kombine uygulandığı grubun, tek başına amniyotik sıvı uygulamasının hem üçüncü hem de altıncı hafta sonunda anlamlı şekilde gerisinde kalmasının nedeninin; amniyotik membranın, iyileşmede oldukça etkin konumda olan ve büyüme faktörleri tarafından uyarıldığı bilinen mezenkimal farklılaşmamış hücre kaynağı olan kırık çevresi yumuşak dokuyla kırık hattı arasında bariyer görevi görmesiyle açıklanabileceği kanaatindeyiz.

Ayrıca her üç grubun kendi içinde üçüncü ve altıncı hafta sonundaki histolojik iyileşme skorları karşılaştırıldığında; tüm gruplarda altıncı hafta sonuçları üçüncü haftaya göre daha iyi çıkmış olup bu da literatürle korelasyon göstermektedir(100,102,142,144).

Radyolojik olarak ise yaptığımız gross değerlendirmelerde üçüncü haftada ve altıncı haftada gruplar arasında dikkat çekici bir farklılık saptayamadık. Sadece altıncı hafta sonunda amniyotik sıvı ile membranın kombine uygulandığı grupta kaynama olmasına rağmen kırık hatlarının diğer iki gruba göre hala belirgin olarak görüldüğü dikkatimizi çekti. Ancak literatürde bunu kırık iyileşmesinin radyolojik değerlendirmesinde anlamlı bir parametre olarak göremediğimizden ve radyolojik değerlendirmeyi kantitatif olarak değil sadece histolojik değerlendirmeye destek olması amacıyla yaptığımızdan bir değer taşıdığını düşünmemekteyiz.

Sonuç olarak; yaptığımız çalışma insan amniyotik membranının kırık iyileşmesini uyarda etkili bir yöntem olmadığını buna karşılık amniyotik sıvının tek başına lokal enjeksiyon olarak uygulanmasının ratlarda kırık iyileşmesinin uyarılmasında olumlu etkilerinin olabileceğini göstermiş ve bunun bir ön çalışma olarak değerlendirildiğinde ileride daha büyük hayvanlarda , daha çok sayıda denekle ve kırık iyileşmesinin daha çok sayıda parametre ile değerlendirilebileceği geniş çalışmaların yapılabilmesi için umut verici olduğunu düşündürmüştür

## **8.SONUC VE ÖNERİLER:**

1. İnsan amniyotik membranı kullanılacak çalışmalarda, membranı sağlayan bölüm ile çok iyi koordinasyon sağlanmalı ve çalışma süresinin buna bağımlı olduğu unutulmamalıdır.
2. Kırık iyileşmesinin radyolojik değerlendirilmesinde mikrotomografi ve kemik mineral dansitesi gibi daha kantitatif yöntemlerin kullanılmasının objektivite için uygun olacağı ancak uygulama imkanı ve maliyet sorunlarının göz önünde bulundurulması gerektiği kanısındayız.
3. Kemikte iyileşmenin biyomekanik olarak da objektif değerlendirilebileceğini, ancak bu değerlendirme için çalışmada kullandığımız hayvan sayısının belirgin şekilde artırılması ve mümkünse daha büyük hayvanların kullanılması gerektiği kanısındayız.
4. Amniyotik sıvının kırık iyileşmesindeki olumlu etkileri göz önünde bulundurulduğunda, ileride osteoblast hücre kültürlerinde uyarıcı etkisinin araştırılmasının faydalı olacağı düşüncesindeyiz.
5. Kırık iyileşmesinin değerlendirilmesinde çok sayıda parametre kullanılabileceğini belirtmemize rağmen elimizdeki imkanlar doğrultusunda kantitatif olarak sadece histolojik değerlendirme yapıp bunu kalitatif olarak radyoloji ile destekleyebilmemiz bize çalışmamızın zayıf noktasını oluşturduğu kanaatindeyiz.

## **9.KAYNAKLAR**

1. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology-I. In Pritchard DJ (ed). Instructional Course Lectures Volume 45, AAOS, 1996; 371-86
2. Hing KA: Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 2004; 362: 2821-50
3. Schenk RK: Biology of fracture repair. In Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG (ed). Skeletal Trauma Vol 1. Third edition. Saunders Co, Philadelphia 2003; 29-73
4. Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh JL: Bone and joint healing. In Bucholz RW, Heckman JD (ed). Fractures in Adults Vol 1. Fifth edition. Lippincott Co, Philadelphia 2001; 245-71
5. Brighton CT, Okereke E, Pollack SR, et al: In vitro bone-cell response to a capacitively coupled electrical field: The role of field strength, pulse pattern and duty cycle. Clin Orthop Relat Res. 1992; 285: 255-62.
6. Singh I: The architecture of cancellous bone. J. Anat. 1978; 127: 305-10
7. Squier CA, Ghoneim S, Kremenak CR: Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. J. Anat. 1990; 171: 233-39
8. Ellender G, Feik SA, Carach BJ: Periosteal structure and development in a rat caudal vertebra. J. Anat. 1988; 158: 173-87
9. Feik SA, Ellender G, Crowe DM, Anderson MS: Periosteal response in translation-induced bone remodeling. J. Anat. 1990; 171: 69-84
10. Kelly PJ: Anatomy, physiology and pathology of the blood supply of bones. J Bone Joint Surg 1968; 50A: 766-83
11. Trias A, Fery A: Cortical circulation of long bones. J Bone Joint Surg 1979; 61A: 1052-59
12. Strachan RK, McCarthy I, Fleming R, Hughes SPF: The role of the tibial nutrient artery: Microsphere estimation of blood flow in the osteotomized canine tibia. J Bone Joint Surg 1990; 72B: 391-94
13. Whiteside LA, Lesker PA: The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection: II on fracture healing. J Bone Joint Surg 1978; 60A: 26-30
14. Whiteside LA, Ogata K, Lesker P, Reynolds FC: The acute effects of periosteal stripping and medullary reaming on regional bone blood flow. Clin Orthop Relat Res. 1978; 131: 266-72.

15. Whiteside LA, Lesker PA: The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection: I on blood flow in muscle. *J Bone Joint Surg* 1978; 60A:23-26
16. Chung SMK: The arterial supply of the developing proximal end of the human femur. *J Bone Joint Surg* 1976; 58A:961-70
17. Trueta J: The role of the vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 1963; 45B:402-18
18. Gil FTH, Gracia MAA, Pingarron MC, Jerez LB: Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:E47-51
19. Beresford JN: Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 ;240:270-80
20. Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW: Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects: An experimental study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 ;208:300-12
21. Vaes G: Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption: A review of recent developments on the formation, activation and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res.* 1988 ;231:239-71
22. Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA: The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 ;275:287-99
23. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, et al: Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 ;275:280-86
24. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG: Structure, expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 ;281:275-94
25. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology-II. In Pritchard DJ (ed). *Instructional Course Lectures Volume 41, AAOS, 1996; 387-99*
26. Puzas JE, Miller MD, Rosier RN: Pathologic bone formation. *Clin Orthop Relat Res.* 1989; 245:269-81
27. Gebhardt MC, Lippiello L, Bringham FR, Mankin HJ: Prostaglandin E2 synthesis by human primary and metastatic bone tumors in culture. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 ;196:300-305
28. Lind M, Büniger C: Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J.* 2001; 10:S102-109
29. Kraus KH, Kirker C: Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 2006; 35:232-42

30. Simpson JM, Ebraheim NA, An HS, Jackson WT: Posterolateral bone graft of the tibia. Clin Orthop Relat Res. 1990 ;251:200-206
31. Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, Vincent A: Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening:An experimental study. Clin Orthop Relat Res. 1990 ;250:34-42
32. Shearer JR, Roach HI, Parsons SW: Histology of a lengthened human tibia. J Bone Joint Surg 1992; 74B:39-44
33. Bolander ME, Balian G: The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects:Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. J Bone Joint Surg 1986;68A:1264-74
34. McLeod KJ, Rubin CT, Brook S: The low-frequency electrical fields on osteogenesis. J Bone Joint Surg 1992;74A:920-29
35. Nilsson E, Westlin NE: Bone density in athletes. Clin Orthop Relat Res. 1971 ;77:179-82
36. Gil FTH,Gracia MAA,Pingarron MC,Jerez LB: Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process.Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E151-7
37. Hill PA,et al: Bone remodeling. British Journal of Orthodontics 1998;25:101-107 Review
38. Raisz LG: Physiology and pathophysiology of bone remodeling. Clinical Chemistry 1999;45:no:8(B) 1353-58 Review
39. Ege R: Kırıkların etyopatolojisi ve biyomekaniği.In Travmatoloji:kırıklar,eklem ve diğer yaralanmalar.Cilt 1.Beşinci baskı. Ankara ,2001;35-53
40. Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998 ;355 Supp:7-21
41. Phillips AM: Overview of the fracture healing cascade.Injury 2005; 365:5-7
42. Cornell CN,Lane JM: Newest factors in fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1992 ;277:297-311
43. McKibbin B: The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg 1978;60B:150-62
- 44 Bassett CAL, Mitchell SN, Gaston SR: Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. J Bone Joint Surg 1981;63A:511-23
45. Chao EYS, Inoue N: Biophysical stimulation of bone fracture repair,regeneration and remodelling.European Cells and Materials.2003;6:72-85

46. Ege R: Kırık iyileşmesi(biyolojisi).In Travmatoloji:kırıklar,eklem ve diğer yaralanmalar.Cilt 1.Beşinci baskı. Ankara ,2001;55-94
47. Woll TS, Duwelius PJ: The segmental tibia fracture. Clin Orthop Relat Res. 1992 ;281:204-207
48. Jensen JE, Jensen TG,Smith TK,et al: Nutrition in orthopaedic surgery. J Bone Joint Surg 1982;64A:1263-72
49. Leung KS, Sher AH,Lam TSW,et al: Energy metabolism in fracture healing. J Bone Joint Surg 1989;71B:567-660
50. Einhorn TA, Bonnarens F, Burstein AH: The contributions of dietary protein and mineral to the healing of experimental fractures:a biomechanical study. J Bone Joint Surg 1986;68A:1389-95
51. Cruess RL, Sakai T: Effect of cortisone upon synthesis rates of some components of rat bone matrix. Clin Orthop Relat Res. 1972 ;86:253-59
52. Simmons DJ, Kunvin AS: Autoradiographic and biochemical investigations of the effect of cortisone on the bones of the rat. Clin Orthop Relat Res. 1967 ;55:201-15
53. Theyse LFU, Dijksterhuis MAO,Doorn JV, Dhert WJA, Hazewinkel HAW: Growth hormone stimulates bone healing in a critical-sized bone defect model. Clin Orthop Relat Res. 2006 ;446:259-267
54. Raikin SM, Landsman JC, Alexander VA,et al: Effect of nicotine on the rate and strength of long bone fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998 ;353:231-37
55. Yorgancıgil H, Özerdemoğlu RA, Korkusuz F, Erdoğan N: Nikotin sığıanlarda kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri.Turkish Journal of Arthroplasty and Arthroscopic Surgery.1998;9(1):32-35
56. Mullis BH, Copland ST,Weinhold PS, Miclau T,Lester GE, Bos GD: Effect of cox-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. İnjury.2006;37:827-37
57. Ho ML, Chang JK, Wang GJ: Anti-inflammatory drug effects on bone repair and remodelling in rabbits. Clin Orthop Relat Res. 1995 ;313:270-78
58. Street JT, McGrath M, O'Regan K, et al: Thromboprophylaxis using a low molecular weight heparin delays fracture repair. Clin Orthop Relat Res. 2000 ;381:278-89



59. Hak DJ, Stewart RL, Hazelwood SJ: Effect of low molecular weight heparin on fracture healing in a stabilized rat femur fracture model. *J Orthop Res.* 2006;Apr:645-52
60. O'Sullivan ME, Bronk JT, Chao EYS, et al: Experimental study of the effect of weight bearing on fracture healing in the canine tibia. *Clin Orthop Relat Res.* 1994 ;302:273-83
61. Kenwright J, Goodship AE: Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 ;241:36-47
62. Kershaw CJ, Cunningham JL, Kenwright J: Tibial external fixation, weight bearing and fracture movement. *Clin Orthop Relat Res.* 1993 ;293:28-36
63. Sarmiento A: A functional below-the-knee cast for tibial fractures. *J Bone Joint Surg* 1967;49A:855-75
64. Sarmiento A, Schaeffer JF, Beckerman L, et al: Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *J Bone Joint Surg* 1977;59A:369-75
65. Einhorn TA: Current concepts review: Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg* 1995;77A:940-56 (Inst. course lect. 1996. vol 45:401-16)
66. Claes L, Willie B: The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2006;1-15 Review
67. Claes LE, Heigele CA, Wilke CN, et al: Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 ;355Supp:132-47
68. Goodship AE, Kenwright J: The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg* 1985;67B:650-55
69. Kenwright J, Richardson JB, Cunningham JL, White SH, Goodship AE, et al: Axial movement and tibial fractures: A controlled randomised trial of treatment. *J Bone Joint Surg* 1991;73B:654-59
70. Moucha CS, Einhorn TA: Enhancement of skeletal repair. In Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG (ed). *Skeletal Trauma Vol 1. Third edition.* Saunders Co, Philadelphia 2003;639-59
71. Meadows TH, Bronk JT, Chao EYS, Kelly PJ: Effect of weight bearing on healing of cortical defects in the canine tibia. *J Bone Joint Surg* 1990;72A:1074-80
72. Chao EYS, Inoue N, Elias JJ, Aro H: Enhancement of fracture healing by mechanical and surgical intervention. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 ;355Supp:163-78

- 73.** Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, Helms JA: Mechanobiology of skeletal regeneration. . Clin Orthop Relat Res. 1998 ;355Supp:41-55
- 74.** Ryaby JT: Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998 ;355Supp:205-15
- 75.** Hannouche D, Petite H, Sedel L: Current trends in the enhancement of fracture healing. J Bone Joint Surg 2001;83B:157-64
- 76.** Scott G, King JB: A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of nonunion of long bones. J Bone Joint Surg 1994;76A:820-26
- 77.** Mammi GI, Rocchi R, Cadossi R, Traina GC: Effect of PEMF on the healing of human tibial osteotomies: A double blind study. Clin Orthop Relat Res. 1993 ;288:246-53
- 78.** Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, Rubin C: Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. Clin Orthop Relat Res. 1998 ;355Supp:216-29
- 79.** Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, et al: Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low intensity ultrasound. J Bone Joint Surg 1997;79A:961-73
- 80.** Busse JW, Bhandari M, Kulkarni AV, Tunks E: The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: A meta-analysis. Canadian Med. Ass. Jou. 2002;166(4):437-41
- 81.** Lane JM, Bostrom MPG: Bone grafting and new composite biosynthetic graft materials. In Cannon WD (ed). Instructional Course Lectures . Volume 47, AAOS, 1998;525-34
- 82.** Schemitsch EH, Bhandari M: Bone healing and grafting. In Koval KJ (ed). Orthopaedic knowledge update-7. AAOS, 2002;19-29
- 83.** Stevenson S: Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. Clin Orthop Relat Res. 1998 ;355Supp:239-46
- 84.** Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G: Physical and biological aspects of repair in dog cortical bone transplants. J Bone Joint Surg 1975;57A:237-52
- 85.** Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R: Development of an osteogenic bone marrow preparation. J Bone Joint Surg 1989;71A:684-91
- 86.** Bruder SP, Fox BS: Tissue engineering of bone: cell based strategies. Clin Orthop Relat Res. 1999 ;367Supp:68-83

87. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S: The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg* 1998;80A:985-96
88. Vladimirov BS, Dimitrov SA: Growth factors:Importance and possibilities for enhancement of the healing process in bone fractures.*Folia Medica*.2004;45(2):11-17
89. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA: The role of growth factors in the repair of bone:Biography and clinical applications. *J Bone Joint Surg* 2002;84A:1032-44
90. Dijke PT, Fu J, Schaap P, Roelen BAJ: Signal transduction of bone morfogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg* 2003;85A Supp(3):34-38
91. Wozney JM, Rosen V: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 ;346:26-37
92. Bostrom MPG: Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 ;355Supp:115-23
93. Bostrom MPG, Camacho NP: Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 ;355Supp:274-82
94. Einhorn TA,Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM,et al: A single percutaneous injection of recombinant human bone morfogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg* 2003;85A:1425-35
95. Eckardt H, Christensen KS,Lind M, Hansen ES,et al: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of nonunion. *Injury*.2005;36:489-94
96. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD,et al: Osteogenic protein-1(bone morphogenetin protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg* 2001;83A Supp(1):151-58
97. Bostrom MPG, Asnis P: Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 ;355Supp:124-31
98. Solheim E: Current concepts review:Growth factors in bone.*International Orthopaedics*.1998;22:410-16
99. Radomsky ML, Thompson AY,Spiro RC,Poser JW: Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 ;355Supp:283-93

- 100.** Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox CW: Novel formulation of fibroblast growth factor-2 and hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res.* 1999;17:607-14
- 101.** Trippel SB: Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 ;355Supp:301-13
- 102.** Schmidmaier G, Wildeman B, Ostapowicz D, Kandziora F, et al: Long term effects of local growth factor(IGF-I and TGF- $\beta$ 1) treatment on fracture healing:A safety study for using growth factors. *J Orthop Res.* 2004;22:504-19
- 103.** Simpson AHRW, Mills L, Noble B: The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg* 2006;88B(6):701-05
- 104.** Eckhardt H, Ding M, Lind M, et al: Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg* 2005;87B:1434-38
- 105.** Glowacki J: Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 ;355Supp:82-9
- 106.** Maes C, Coenegrachts L, Stockman I, Daci E, et al: Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover and bone remodeling during fracture repair. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006;116:1230-42
- 107.** Laurent TC, Fraser JRE: Hyaluronan. *FASEB J.* 1992;6:2397-404
- 108.** Aslan M, Şimşek G, Dayı E: The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: Experimental study in rabbits. *Journal of Biomaterials Applications.* 2006;20:209-20
- 109.** Goa KL, Benfield P: Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs.* 1994 Mar;47(3):536-66
- 110.** Dahl LB, Kimpton WG, Cahill RNP, Brown TJ, Fraser JRE: The origin and fate of hyaluronan in amniotic fluid. *J Dev Physiol* 1989; 12:209-18
- 111.** Longaker MT, Adzick NS, Hall JL, Stair SE, Crombleholme TM, Duncan BW, Bradley SM, Harrison MR, Stern R: Studies in fetal wound healing, VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid. *J Pediatr Surg.* 1990 Apr;25(4):430-3.
- 112.** Lee HS, Kim JC: Effect of amniotic fluid in a corneal sensitivity and nerve regeneration after excimer laser ablation. *Cornea.* 1996;15:517-24

- 113.** Merimee TJ, Grant M, Tyson JE: Insulin-like growth factors in amniotic fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984 Oct;59(4):752-5
- 114.** Shida J, Jingushi S, Izumi T, Iwaki A, Sugioka Y: Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo. *J Orthop Res.* 1996 Mar;14(2):265-72
- 115.** Longaker MT, Adzick NS: The biology of fetal wound healing: a review. *Plast Reconstr Surg.* 1991 Apr;87(4):788-98.
- 116.** Longaker MT, Chiu ES, Harrison MR, Crombleholme TM, Langer JC, Duncan BW, Adzick NS, Verrier ED, Stern R: Studies in fetal wound healing. IV. Hyaluronic acid-stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. *Ann Surg.* 1989 Nov;210(5):667-72.
- 117.** Ozgenel GY, Filiz G: Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg.* 2003 Feb;98(2):371-7
- 118.** Ozgenel GY, Samli B, Ozcan M: Effects of human amniotic fluid on peritendinous adhesion formation and tendon healing after flexor tendon surgery in rabbits. *J Hand Surg [Am].* 2001 Mar;26(2):332-9
- 119.** Ozgenel GY: The influence of human amniotic fluid on the potential of rabbit ear perichondrial flaps to form cartilage tissue. *Br J Plast Surg.* 2002 Apr;55(3):246-50.
- 120.** The Placenta and Fetal Membranes .In:Cummingham FG,Gant NF,Leveno KJ,Gistrap LC,Hauth JC,Wenstrom KD(ed),Twenty-first edition,McGraw-Hill,USA,Chapter 5:85-108,2001
- 121.** Ozgenel GY, Filiz G: Combined application of human amniotic membrane wrapping and hyaluronic acid injection in epineurectomized rat sciatic nerve. *J Reconstr Microsurg.* 2004 Feb;20(2):153-7.
- 122.** Ozgenel GY: The effects of a combination of hyaluronic and amniotic membrane on the formation of peritendinous adhesions after flexor tendon surgery in chickens. *J Bone Joint Surg Br.* 2004 Mar;86(2):301-7
- 123.** Vishwakarma GK, Khare AK: Amniotic arthroplasty for tuberculosis of the hip. A preliminary clinical study. *J Bone Joint Surg Br.* 1986 Jan;68(1):68-74
- 124.** Heiple KG, Goldberg VM, Powell AE, Bos GD, Zika JM: Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1987;18:179-85

- 125.** Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT: The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 ;264:295-301
- 126.** Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Lijima T, Ohishi M: Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.*2003;41:173-78
- 127.** Cui GLY, McILmurray L, Allen WE, Wang H: rhBMP-2, rhVEGF165, rhPTN and thrombin-related peptide,TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res.* 2005 ;23:680-85
- 128.** Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 ;355Supp:56-65
- 129.** Kaygusuz MA, Ataşlı N, Aydoğdu İ, Özen S,et al: GM-CSF'nin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin sıçan tibiaları üzerinde araştırılması.*Acta Orthop Traumatol Turc.*1999;33:205-10
- 130.** Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, Günel İ,et al: Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.*1995;66(5):473-75
- 131.** Jackson RA, McDonald MM, Nurcombe V,Little DG,Cool SM: The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model. *J Orthop Res.* 2006;Apr:636-44
- 132.** Zimmermann G, Henle P, Küsswetter M, Moghaddam A, et al: TGF- $\beta$ 1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone.*2005;36:779-85
- 133.** Kirker CA, Gerhart TN,Armstrong N, Schelling SH,Carmel LA: Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 ;349:205-17
- 134.** Muratlı HH, Tabak AY, Korkusuz P,Örs Ü,et al: Endotelin antagonisti bosentanın kırık iyileşmesi üzerindeki etkisinin kobay modelinde incelenmesi. *İnsizyon* 1999;2(3):171-80
- 135.** Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM,et al: The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures.*Journal of Biomedical Materials Research* 2003;66(4):880-84
- 136.** Sasaki T,Watanabe C: Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone* 1995;16(1):9-15
- 137.** Tejwani S, Kolari RS, Sangwan VS, Rao GN: Role of amniotic membrane graft for ocular chemical and thermal injuries. *Cornea* 2007;26:21-26

- 138.** Lee H, Ha SW, Kim JC: A novel application of amniotic membrane in patients with bullous keratopathy. *J Korean Med Sci.*2006;21:324-28
- 139.** Mencucci R, Menchini U, Dei R: Antimicrobial activity of antibiotic-treated amniotic membrane:An in vitro study. *Cornea* 2006;25:428-31
- 140.** Gomes FR, Anjos JS, Nogueira TO, Guimaraes SAC: Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. *Oral Maxillofac Implants.* 2001;16(4):563-71
- 141.** Burgos H: Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta.*Eur J Clin Invest.* 1983;13(4):289-96
- 142.** Molster AO, Gjerdet NR, Alho A, Bang G: Fracture healing after rigid intramedullary nailing in rats.*Acta Orthop Scand.* 1983;54:366-73
- 143.** Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Effects of lesion between bone,periosteum and muscle on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1998;69(2):177-80
- 144.** Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand.* 1994;65(5):559-63
- 145.**Rhineland FW: Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1974;105:34-81