

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA VE TROMBOSİTTEN ZENGİN
FİBRİN YAPILARININ TAVŞAN KULAK KIKIRDAĞI REJENERASYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Ceren KARAÇAYLI
UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2014

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA VE TROMBOSİTTEN ZENGİN
FİBRİN YAPILARININ TAVŞAN KULAK KIKIRDAĞI REJENERASYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Ceren KARAÇAYLI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Rahmi KILIÇ

KIRIKKALE

2014

TC.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan Araştırma Görevlisi Dr. Ceren Karaçaylı'nın 'Trombositten Zengin Plazma ve Trombositten Zengin Fibrin Yapılarının Tavşan Kulak Kıkırdağı Rejenerasyonu Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması' konulu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

13.02.2014

Prof. Dr. Rahmi KILIÇ

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

KBB BBC AD

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Nuray BAYAR MULUK
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

KBB BBC AD

Üye

Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞİMŞEK

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

KBB BBC AD

Üye



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince üstün bilgi, beceri ve tecrübelerini aktararak, yetişmemde büyük emekleri olan, tez çalışmam sırasında beni yönlendiren, her türlü yardım ve bilimsel desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam, KBB Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Rahmi Kılıç'a teşekkür ederim.

Klinikte bulunduğum süre boyunca bilgi ve becerimin artmasında katkıları ve desteği olan, tez çalışmam boyunca beni yönlendiren, her türlü yardım ve bilimsel desteği esirgemeyen sayın Prof. Dr. Mustafa Kazkayası'na teşekkür ederim.

Klinikte bulunduğum süre boyunca engin tecrübe ve katkılarından yararlandığım sayın Prof. Dr. Nuray Bayar Muluk'a teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında büyük katkısı bulunan değerli hocam Doç. Dr. Siyami Karahan'a teşekkür ederim.

Kliniğimize geldikleri günden itibaren benden desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Gökçe Şimşek ve Uzm. Dr. Bengi Arslan'a teşekkür ederim.

Klinikte bulunduğum süre boyunca ameliyathanede bize hep destek ve sabır gösteren, sınav jürime katılmayı kabul eden sayın hocam Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD Başkanı Prof. Dr. Ünase Büyükköçak'a teşekkür ederim.

Klinik içerisinde uyumlu bir şekilde çalıştığım sevgili çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yetişip bugünlere gelmemdeki emeğini kelimelerle ifade edemeyeceğim anneme teşekkür ederim.

Tanıdığım günden bu yana her konuda benden yardım ve desteğini esirgemeyen, hayatımda olduğu için kendisine minnettar olduğum sevgili eşim

Doç.Dr. Ümit KARAÇAYLI'ya ve hayatıma anlam katan, evimin neşe kaynağı
canım kızım İdil'e çok teşekkür ederim.

ÖZET

Karaçaylı C., Trombositten Zengin Plazma ve Trombositten Zengin Fibrin Yapılarının Tavşan Kulak Kıkırdağı Rejenerasyonu Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2014.

Bu çalışmanın amacı trombositten zengin plazma ile trombositten zengin fibrinin kıkırdak dokusu iyileşmesi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması ve her iki materyalin kıkırdak doku iyileşmesini anlamlı derecede artırıp artırmadığını incelemektir.

Trombositten zengin plazma (TZP) ve trombositten zengin fibrin (TZF) yüksek miktarda büyüme faktörleri içermektedir. Bunlar son yıllarda kemik ve yumuşak doku defektlerinin iyileşmesinde kullanılmaktadır. Çalışmaya 21 tavşan alınmıştır. Bu tavşanlar her grupta 6 tavşan olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. Çalışmaya tavşanların her iki kulağı da dahil edilmiştir. Her grup kendi içinde A ve B alt gruplarına ayrılmıştır.

Tüm A alt gruplarında tavşanların kulaklarından $10 \times 10 \text{ mm}^2$ kıkırdak eksize edilmiştir. Dışarıya çıkarılan kıkırdağın çevresinden 1mm'lik kıkırdak eksize edilmiştir. Birinci grupta kalan $8 \times 8 \text{ mm}^2$ kıkırdak TZP ile muamele edildikten sonra çıkarıldığı alana yerleştirilmiştir. İkinci grupta kıkırdak TZF ile muamele edildikten sonra çıkarıldığı alana yerleştirilmiştir. Üçüncü grupta ise kıkırdak herhangi bir muameleye tabi tutulmaksızın çıkarıldığı alana yerleştirilmiştir.

Tüm B alt gruplarında tavşanların kulaklarından $10 \times 10 \text{ mm}^2$ kıkırdak eksize edilmiştir. Eksize edilen kıkırdak yerine yerleştirilmemiştir. Birinci grupta kıkırdağın çıkarıldığı alanda birbiri ile karşılıklı gelen mukoperikondrium üzerine TZP

uygulanmıştır. İkinci grupta kırırdağın çıkarıldığı alana TZF yerleştirilmiştir. Üçüncü grupta ise kırırdağın çıkarıldığı alana bir müdahalede bulunulmamıştır.

Dördüncü grup sham grubu olarak planlanmıştır. Sham grubu 3 tavşan içermektedir. Bu gruptaki tavşanlara sadece insizyon ve mukoperikondrium elevasyonu yapılmıştır. Kırırdağa bir girişimde bulunulmamıştır.

Histolojik incelemelerde gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Diğer bir deyişle TZP ve TZF'nin kırırdak iyileşmesi üzerine olumlu veya olumsuz bir etkisi gözlenmemiştir.

ABSTRACT

Karaçaylı C., The effects of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin on rabbit auricular cartilage regeneration, Kırıkkale University School of Medicine Department of Otorhinolaryngology, Thesis, Kırıkkale, 2014.

Platelet-rich plasma and Platelet-rich fibrin contain high volumes of growth factors. They have been used in bone and soft tissue healing in recent years. The aim of this study is to evaluate the effects of PRP and PRF on cartilage tissue healing, and to assess if these two materials would increase the cartilage tissue healing capacity significantly. 30 rabbits were included in this study. The rabbits were divided into 3 groups and each group included 6 rabbits. The sham group contained 3 rabbits. The study groups were divided into A and B subgroups and each subgroup contained 3 rabbits.

In all A subgroups, 10x10 mm² cartilage was removed from the ear cartilage of the rabbits. 1 mm cartilage was cut off around the removed cartilage. In the first study group, remaining 8x8 mm² cartilage was placed back after PRP application. In the second study group, remaining cartilage was placed back after PRF application. In the third study group, remaining cartilage was placed back without any application.

In all B subgroups, 10x10 mm² was removed from the ear cartilage of the rabbits. The removed cartilage was not placed back. In the first study group, PRP was applied to mucoperichondrium layers. In the second study group, PRF was placed to the area of removed cartilage. In the third study group, nothing was applied to the area of removed cartilage.

In sham group, only insicion and elevation were made. No insicion was made in the ear cartilage. The whole ear cartilage was mapped and sampled. Each specimen was examined for mucosal inflammation, ulceration, cartilage damage and regeneration.

There was no significantly difference between any of these groups. In other words PRP and PRF do not have any effect on cartilage healing.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.KIKIRDAK DOKUSU	3
2.1.1. Kıkırdak Dokusunun Tanım	3
2.1.2.Kıkırdak Dokunun Gelişimi	4
2.1.3.Kıkırdak Hücreleri (Kondrositler)	5
2.1.4.Kıkırdak Matriksi	7
2.1.5.Perikondrium	8
2.1.6.Kıkırdak Tipleri	8
2.1.7.Kıkırdak Dokusunun Onarımı	10
2.1.8. Kıkırdak Dokusunun Histofizyolojisi	11
2.2.Trombositler	12
2.2.1.Genel Yapısı ve İçerikleri	12
2.2.2.Trombositlerde Bulunan Büyüme Faktörleri	16
2.3.Trombositten Zengin Plazma	20

2.3.1.Kullanım Alanları	21
2.3.1.1. Maksillofasiyal ve Periodontal Cerrahi	21
2.3.1.2.Ortopedik Cerrahi	22
2.3.1.3.Oküler Cerrahi	22
2.3.1.4.Estetik Cerrahi	22
2.3.1.5.Rekonstrüktif Cerrahi	22
2.4.Trombositten Zengin Fibrin	23
2.4.1.TZF'deki Lökositler Tarafından Salgılanan Sitokinler	24
2.4.1.1.Interlökin-1 β	25
2.4.1.2.Interlökin-6	25
2.4.1.3.Tümör Nekroze Edici Faktör α	26
2.4.1.4.Interlökin-4	26
2.4.2.Trombositten Zengin Plazma ve Fibrin	26
3.GEREÇ ve YÖNTEM	28
4.BULGULAR	35
5.TARTIŞMA	46
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	53
7.KAYNAKLAR	54
EK	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

(Metin içindeki geçiş sırasına göre yazılmıştır)

TGF- β	Transforming growth factor β
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
IGF	İnsülin like growth factor
PDGF	Platelet-derived growth factor
BMPs	Bone morphogenic proteins
IGF-I	İnsülin like growth factor I
IGF-II	İnsülin like growth factor II
vWF	Von Willebrand factor
ATP	Adenosine triphosphate
ADP	Adenozin difosfat
TGF- β 1	Transforming growth factor β 1
TGF- β 2	Transforming growth factor β 2
TGF- β 3	Transforming growth factor β 3
GTP	Guanozin trifosfat
GDP	Guanozin difosfat
ECGF	Endothelial Cell Growth Factor
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF-II	Fibroblast growth factor II
VEGF	Vascular endothelial growth factor
IGF-II	Insulin-like growth factor II
IL- β	Interleukin- beta
Btg	β thromboglobulin

PF4	Platelet factor 4
HRGP	Histidine-rich glycoprotein
PBP	Penicillin-binding protein
CTAP-III	Connective tissue activating peptide-III
NAP-II	Interleukin-8 antibody
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein-3
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
FGFR1-4	Bazik fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1-4
VEGF121	Vascular endothelial growth factor121
VEGF165	Vascular endothelial growth factor165
TZP	Trombositten zengin plazma
TZF	Trombositten Zengin Fibrin
IL-1 β	Interleukin-1beta
IL-6	Interleukin-6
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
IL-4	Interleukin-4
IL-2	Interleukin-2
IL-3	Interleukin-3
IL-1	Interleukin-1
rpm	rotation per minute
H&E	Hematoksilen & Eozin
BMP	Bone morphogenic protein

ŞEKİLLER ve RESİMLER

Şekil 2.1: Trombositlerin temel yapısı ve içerikleri	13
Resim 3.1: Tavşanların santral aurikular arterinden 8 ml kan alındığı görülmektedir.	28
Resim 3.2: Elde edilen TZF görülmektedir.	29
Resim 3.3: Traş edilmiş kulak izlenmektedir.	30
Resim 3.4: 20x20 mm kıkırdak ekspozite edilene kadar mukoperikondriyumun eleve edildiği görülmektedir.	30
Resim 3.5A: Resimde 10x10 mm kıkırdak eksize edildiği izlenmektedir.	31
Resim 3.5B: Resimde dışarı alınan 10x10 mm kartilaj görülmektedir.	31
Resim 3.6A Kıkırdak dokusunun sütürle sabitlendiği görülmektedir	32
Resim 3.5B 2 ml TZP' nin kıkırdak dokusu üzerine enjekte edildiği gösterilmektedir.	33
Resim 4.1: Kıkırdak parçaları arasına yerleşen osteoid benzeri doku izlenmektedir. Osteoid doku arasındaki boşlukları tek sıra osteoblastlar döşemektedir (siyah ok). Osteoid benzeri miksomatöz doku yoğunluğunun kıkırdak uçlarını ayıracak kadar fazla olduğu görülmektedir (kesikli ok). Hematoksilen&Eozin (HE) boyama, bar= 140µm	38
Resim 4.2: Kıkırdak parçası çıkarılmış ve tekrar yerine konulmuş örneklerde kıkırdak kesi alanlarının tam olarak iyileşmediği görülmekte ve kıkırdak hasarları (oklar) izlenmektedir. Diğer taraftan kıkırdak üzerinde asidofilik osteoid doku izlenmektedir (kesikli oklar). HE boyama, bar= 200 µm	38
Resim 4.3: 10 Kıkırdak hasar bölgesini dolduran hücreden zengin fibröz kıkırdak benzeri yapı izlenmektedir (ok). İyileşmenin tam olmadığı gözlenmektedir. HE boyama, bar= 140µm.	39
Resim 4.4: İki kıkırdak dokusu arasında oluşan sınırlı doku, (ok) normal fibröz dokudan farklı olarak hem fibröz kıkırdak hem de osteoid dokuyu andırmaktadır. Etrafında bağ dokusu mevcuttur. HE boyama, bar= 140µm	39
Resim 4.5: Bu preparatta kıkırdak birleşim yerlerinde gevşek bağ dokusu izlenmektedir. İnflamasyon görülmemektedir. HE boyama, bar= 200µm.	40
Resim 4.6: Kıkırdak kesi hattında sınırlı kıkırdak yapışması ve tutunma bölgeleri (oklar) görülmektedir. İki dokunun birbirine tutunduğu, füzyon olduğu izlenmektedir. Kıkırdak etrafında osteoid doku görülmektedir (kesikli oklar). HE boyama, bar= 140µm.	40
Resim 4.7: Bu preparatta kesi alanlarında kondrosit kaybının belirgin olduğu görülmektedir (kesikli çizgi). HE boyama, bar= 80µm.	41
Resim 4.8: Greft kıkırdak ile ana blok kıkırdak arasında matriks oluşumu ve sınırlı sayıda kondrositler görülmektedir (oklar). HE boyama, bar= 140µm.	41
Resim 4.9: Kıkırdak hasarının oluşturulduğu bölgedeki küçük kondrositlerden oluşan hücre grupları izlenmektedir. HE boyama, bar= 140µm.	42
Resim 4.10: Bazı kesi bölgelerinde elastik kıkırdak hipertrofisi, merkezinde kondrosit ve matriks kaybı (*) görülmektedir. HE boyama, bar= 140µm.	42
Resim 4.11: Bu preparatta kıkırdak kesi bölgelerine komşu bölgelerde kondrosit kaybı yanında genişlemiş lakun (*) görülmektedir. Kesi hattı çevresindeki perikondriyumda kalınlaşma izlenmektedir. HE boyama, bar= 80µm.	43
Resim 4.12: Bazı vakalarda kesi bölgelerinde fibröz doku gözlemlendi. HE boyama, bar= 80µm	43
Resim 4.13: Kıkırdak hasarlı bölgede fonksiyonunu yitirmekte olan kondrositler (ok) izlenmektedir. Bu kesitte kondrosit kaybının belirgin olduğu gözlenmektedir. HE boyama, bar= 140µm.	44
Resim 4.14A: Çıkan kıkırdak bölgesini asidofilik osteoid doku ve yer yer fibröz ve fibrokıkırdak benzeri (fk) dokular doldurmuştur. Osteoid dokunun içinde lakunlar içinde ostesitden daha çok kondrositlere benzeyen hücreler tespit edilmiştir. En şiddetli reaksiyon bu grupta izlenmiştir. HE boyama, bar= 200µm.	45
Resim 4.14B: Daha büyük magnifikasyonda kondrosit benzeri hücreler (kond) fibroz kıkırdak benzeri (fk) doku osteoid dokunun içinde yer yer görülen boşlukları döşeyen osteoblastlar daha iyi izlenmiştir. HE boyama, bar= 140µm	45

TABLÖLAR

Tablo 2.1: Trombosit granüllerinin içerikleri	14
Tablo 3.1: Çalışma gruplarının şematik planlaması	33
Tablo 4.1: Gruplar arasındaki değerlerin dağılımı	35
Tablo 4.2: 1. Grupta (TZP Grubu) A/B grupları arasında skor değerleri dağılımı	36
Tablo 4.3: 2. Grupta (TZF Grubu) A/B grupları arasında skor değerleri dağılımı	36
Tablo 4.4: 3. Grupta (Kontrol) A/B grupları arasında skor değerleri dağılımı	36
Tablo 4.5: A/B grupları arasında skor değerleri dağılımı	37

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kıkırdak iyileşmesi otolaringolojide nazal septum cerrahisi, konjenital veya travmatik larinks ve trakea defektleri ile aurikula atrezisi onarımı gibi birçok başarılı operatif girişimin temelinde yatar. Tüm bu başarılı girişimlerde en önemli faktör kıkırdak dokunun iyileşme sürecidir. Cerrahi işlem ya da greftleme sözkonusu olduğunda, kıkırdak parçalarının yeniden birleşmesi postoperatif görünümde ve uzun süreli sonuçlar için çok kritiktir. Bu prosedür otolaringolojideki en popüler girişimlerden biri olan septoplasti için de önemlidir. Kıkırdak greft iyileşmesi ile ilgili yayınların çoğu laringotrakeal rekonstrüksiyon ve glottik stenoz üzerinedir. Hyalin ve elastik kıkırdak bir kez travmatize edildiğinde osteoartrit, hava yolu obstrüksiyonu ya da kulak ve burun deformasyonu ile sonuçlanan düşük tamir kapasitesi gösterir. Sadece küçük defektler, fetal ya da çok genç kıkırdak iyileşme gösterir. Namba ve ark. fetal koyun modelinde tam kat olmayan eklem kıkırdak hasarlarında spontan iyileşme olduğunu göstermiştir. Bu iyileşme süreci matür hayvanlarda görülmemektedir. Kıkırdak lezyonlarının dayanıklı bir şekilde iyileşmesi için önemli bir koşul yara kenarlarının birbiriyle ya da çevre kıkırdak doku ile ilişkisidir. Bozuk integrasyon nedeniyle kıkırdak iyileşmesinin başarısızlığı konusunda araştırmalar vardır.

Büyüme faktörleri yara iyileşmesinde ve birçok dokunun onarımında önemli rol oynamaktadır. Transforming growth factor β (TGF- β), fibroblast growth factor 2 (FGF-2) ve insülin like growth factor (IGF) kas iskelet sistemi rejenerasyon ve remodellinginde rol oynar.

İn vitro kondrosit proliferasyonu ve matriks üretimi üzerine büyüme hormonlarının etkilerini anlatan birçok yayın olmakla birlikte, kırıldak iyileşmesi üzerine büyüme hormonlarının etkisi çok az bilinmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kıkırdak Dokusu

2.1.1. Kıkırdak Dokusunun Tanımı

Kıkırdak dokusu yumuşak dokuyu desteklemek amacıyla özelleşmiş olan bir bağ dokusudur (1,2,3). Kıkırdak, kondrosit (Yunanca chondros: kıkırdak, + kytos: hücre) adı verilen hücreler, lifler ve ara maddeden yapılmış yaygın bir hücre dışı matriksten meydana gelir. Kondrositler matriksi sentezleyip salgılar ve matriks içinde lakuna adı verilen çukurlarda yerleşirler (4). Matriks kıkırdak dokusuna mekanik etkilere karşı esneklik kazandırarak kalıcı şekil bozukluklarını önlemede katkıda bulunur (1). Tüm kıkırdak türlerinin matriksinde bulunan belli başlı makromoleküller; kollajen, hyalüronik asit, proteoglikanlar ve az miktarda birkaç glikoproteindir (5).

Kollajen ve elastin esnek olduğundan, kıkırdağın sert, peltamsi kıvamı kollajen lifler ile glikozaminoglikan yan zincirleri arasındaki elektrostatik bağlarla dayanır. Ayrıca bu özellik, merkezdeki proteoglikan proteinlerinden uzanan eksi yüklü glikozaminoglikan zincirine suyun (çözücü su) tutunmasıyla da ilgilidir (4).

Çeşitli işlevsel gereksinimlerin sonucunda, her biri değişik matriks içeriğine sahip, 3 tür kıkırdak gelişmiştir. En yaygın tür olan hyalin kıkırdağın matriksinde tip II kollajen yaygındır. Daha esnek ve bükülebilir olan elastik kıkırdağın matriksinde tip II kollajene ek olarak bol miktarda elastik lif vardır. Yoğun kaba tip I kollajen lif ağına sahip matriks ile özellik kazanan fibröz kıkırdak, çekme kuvveti etkisindeki vücut bölgelerinde bulunur (4).

Kıkırdak dokusunun etrafı perikondrium denen yoğun fibriler demetlerle sarılı bir bağ dokusu ile çevrilidir. Besin maddeleri kan yolu ile perikondriumuna

getirilir. Buradan matrikse geçen besin maddeleri difüzyonla kondrositlere kadar ulaştırılmış olur (1). Kıkırdak dokusu diğer destek dokulardan farklı olarak kan damarı ve sinirlere sahip değildir. Bu nedenle matriks koloidal yapısı ile kondrositlerin beslenmesine olanak sağlar. Perikondrium sinirler ve lenf damarlarını da barındırır. Hareketli eklemlerin yüzeylerini saran eklem kıkırdağında perikondrium yoktur. Burada oksijen ve besin maddeleri difüzyonla sinoviyal sıvıdan sağlanır (4,6).

Kıkırdak dokusu embriyo için önemli bir iskelet oluşturur. İskelet sisteminin aksiyel ve apendiküler kısımları önce kıkırdak olarak meydana gelir, daha sonra kemikleşir. Erişkinlerde uzun kemiklerin boyuna büyümelerinde de kıkırdak dokusu etkin rol oynamaktadır. Uzun kemiklerin eklem yüzleri de kıkırdakla kaplıdır. (1,2)

Kıkırdak dokusu; matriks miktarı, matrikste bulunan kollajen ve elastik fibrillerin çokluğuna göre üç gruba ayrılarak incelenir. Bu gruplar; hyalin kıkırdak, elastik kıkırdak ve fibröz kıkırdaktır. Bunlardan en yaygın olanı hyalin kıkırdaktır (1).

2.1.2 Kıkırdak Dokusunun Gelişimi

Kıkırdak dokusunun gelişimi mezenşimden olur. Mezenşimal hücrelerde izlenen ilk değişiklik, uzantılarının geri çekilip yuvarlak hale geldikten sonra hızla bölünüp çoğalarak mezenkimal yoğunlaşmaların oluşmasıdır. Doğrudan mezenşimal hücrelerden farklılaşarak meydana gelen bu hücrelere kondroblast denir. Sitoplazmaları ribozomdan zengin ve bazofiliktir. Matriksin sentezi ve depolanması ile kondroblastlar birbirinden uzaklaşmaya başlar. Kıkırdaktaki sürekli büyüme iki farklı yolla sağlanır: Intersistiyel büyüme ve appozisyonel

büyümedir. Intersistiyel büyümede kondrosit mitozu ve matriks salgılanması ile kıkırdak içten büyüyerek genişler. Kıkırdak hücrelerinin farklılaşması merkezden etrafa doğru olduğundan, merkezdeki hücreler daha çok kondrosit özelliği sergilerken, periferdeki hücreler tipik kondroblast halinde izlenir. Gelişmekte olan kıkırdak yüzeyindeki mezenkim, perikondriumdaki kondroblast ve fibroblastları oluşturur (7, 8, 9). Appozisyonel büyümede ise perikondriumun kondrojenik tabakasındaki hücreler kondrositlere farklılaşır ve etraflarına matriks salgırlar. Perikondriumun kıkırdak oluşturma yeteneği sınırlı bir süre devam eder, ama erişkinde bu fonksiyonu yoktur (1).

2.1.3 Kıkırdak Hücreleri (Kondrositler)

Perikondriumun hemen altındaki kıkırdak katmanlarında veya eklem kıkırdağı serbest yüzünde yer alan kıkırdak hücrelerinin içinde yerleştiği lakünler elips şeklindedir. Kıkırdak dokusundaki canlı kondrositlerin şekilleri genel olarak yerleştikleri lakünlerin şekline uyar. Kıkırdak dokusu preparatlarının hazırlanması esnasındaki fiksasyon ve dehidratasyon işlemleri nedeniyle kondrositler lakün duvarlarından ayrılır ve yıldız şeklinde görülürler. Lakünlerdeki hücreler küçük gruplar oluştururlar. Bu gruplara kondron=izogen (isos, eşit, + genos, aile) grup ya da kıkırdak territoryaları denir (1).

Kondrositler kollagen ve matriks proteinlerini sentezlerler (4). Kondrositlerin çekirdekleri oval veya yuvarlak olup türe göre bir ya da daha fazla çekirdekçik içerebilir. Çekirdek yanında bir çift sentriyol ve gelişmiş golgi aygıtları vardır. Ayrıca sitoplazmalarında uzun mitokondriler, ender yağ damlacıkları ve glikojen taneleri yer alır. Kondrositler yeni matriks üretecekleri zaman (büyüme veya onarım sırasında olduğu gibi) golgi aygıtında belirgin

büyüme ve sitoplazmada bazofilleşme izlenir. Aynı zamanda granüler endoplazmik retikulum da gelişir. Granüler endoplazmik retikulumda üretilip Golgiden çıkan vakuollerin çoğunlukla flamant ve granüller içerdikleri görülmektedir. Bu vakuollere kondrosit yüzeyinde de rastlanabilmektedir. Yüzey vakuolleri içeriklerini matrikse boşaltırlar. Kıkırdak dokusunda büyüme ve onarım durursa golgi ve granüllü endoplazmik retikulumdaki belirginlik geriler (10).

Kapillerin bulunmaması nedeniyle kıkırdak hücreleri düşük oksijen basıncında hayatlarını idame ettirirler. Hyalin kıkırdak hücreleri son ürün olan laktik asidi meydana getirebilmek için glikozu daha çok oksijensiz glikoliz yoluyla metabolize ederler. Kandaki besin maddeleri daha derinlerde yer alan kıkırdak hücrelerine gidebilmek için perikondriyumu geçer. Kıkırdağa suda çözülmüş maddelerin taşınma şekli, aralıklarla kıkırdağın sıkıştırılmasından sonra serbest bırakılması sonucu ortaya çıkan pompalama işlemleri ile oluşan difüzyondur. Bu nedenle, kıkırdağın ulaşabileceği genişlik sınırlı kalır (4).

Kondrositlerin işlevi hormon dengesinin tam olmasına bağlıdır. Büyüme hormonu, tiroksin ve testosteron, sülfatlı glikozaminoglikanların sentezini hızlandırır ve kortizon, hidrokortizon ve östradiol yavaşlatır. Kıkırdak büyümesi daha çok hipofizin büyüme hormonu olan somatotropine bağlıdır. Bu hormon doğrudan doğruya kıkırdak hücrelerini etkilemez, ancak karaciğerde somatomedin C sentezini başlatır. Somatomedin C de kıkırdak hücrelerini etkileyerek büyümelerini uyarır (4).

2.1.4 Kıkırdak Matriksi

Hyalin kıkırdağın kuru ağırlığının %40'ı proteoglikan ve yapısal protein içeren, su ile karışık pelte içine gömülü kollajenden meydana gelmiştir (4). Taze hyalin kıkırdakta matriks homojendir. Hyalin kıkırdağın esas yapıtaşı Tip II kollajen ve proteoglikanlardır. Matriksteki kollajen fibriller çok ince olup (100-200 Angström) diğer kollajenlerdekinden farklı olarak çaprazlaşmaz. Bu fibriller tüm matriks boyunca ağ şeklinde düzenlenirler (1). Kıkırdakta tip II kollajenin yanı sıra çoğu kez kollajen tip IX, X, XI ve diğer kollajen tiplerine de az miktarda rastlanır (4).

Kıkırdak proteoglikanları diğer benzer makromoleküllerden çok daha karmaşık bir yapıya sahiptir. Kıkırdak proteoglikanları merkezdeki proteinlere kovalen olarak bağlanmış kondroitin 4-sülfat, kondroitin 6-sülfat ve keratan sülfat içerir. Merkezi proteinin bir ucunda yerleşen polipeptit halkada glikozaminoglikan bulunmaz ve bu uca hyalüronik asit bağlanır. Buradaki proteoglikanlar bağlayıcı bir protein yardımı ile belli aralıklarla hyalüronik asit moleküllerine kovalen olmayan bağlarla bağlanır ve kollajen liflerle etkileşen proteoglikan kümelerini meydana getirir (1,4).

Negatif yüklü glikozaminoglikanlara bağlanmış çok miktardaki çözücü su, darbeleri emici veya biyomekanik bir yay gibi davranır. Bunun özellikle eklem kıkırdağında çok büyük işlevsel önemi vardır (4).

Tip II kollajen ve proteoglikana ek olarak, kıkırdak matriksinin önemli bir kısmı olan kondronektin, özellikle glikozaminoglikanlara ve tip II kollajen liflerine bağlanır. Kondrositleri kıkırdak matriksine bağlayan bu molekül, yapısal bir glikoproteindir. Her kondrositin etrafını saran kıkırdak matriksi

glikozaminoglikanlardan zengin ve kollajenden yoksuldur. Teritoryal matriks (kapsül matriksi) adı verilen bu çeper kuşağı, matriksin diğer bölgelerinden farklı boyanır. (4)

2.1.5 Perikondriyum

Eklem kıkırdakları dışında tüm hyalin kıkırdaklar perikondriyum adı verilen tıkHz bağ dokusu tabakası ile kuşatılmıştır (4). Perikondriyum mezeşimden gelişir ve bilaminar yapıdadır. Dış katmanındaki hücreler fibroblastlara farklılaşır. Fibroblastlar dens kollajenöz bir matriks sentezlerler. İç katmandaki hücreler ise kondroblast ve prekondroblastlara dönüşür. Özellikle apozizyonel büyüme perikondriyumun kondrojenik iç tabakasındaki hücre proliferasyonu ile olur. (11). Perikondriyum kıkırdağın büyüebilmesi ve bakımı için gereklidir. Tip I kollajen liflerden zengindir ve çok sayıda fibroblast içerir (4). Perikondriyumun potansiyel kondrojenik etkisi olduğu bilinmektedir. Klinik ve deneysel olarak kulak, larinks, nazal septum ve eklem kıkırdak defektlerinde kullanılmıştır (12-15).

Lester 1959 yılında, kıkırdaktan ayrılan perikondriumun, yeni kıkırdak dokusuna neden olduğunu bildirmiştir (16). Bunun klinik önemi, 1972 yılında, Ohlsen ve ark. tarafından güreşçi kulağının etyolojisi araştırılırken, perikondriumun kıkırdak oluşturma kapasitesinin olduğu farkedilene kadar anlaşılammıştır. Skoog ve ark., perikondriumun, altındaki kıkırdaktan ayrılmasının, kontakt inhibisyonu ortadan kaldırdığını ve bu sayede yeni kıkırdak oluştuğunu göstermişlerdir (17-19).

2.1.6 Kıkırdak Tipleri

Hyalin Kıkırdak: En sık rastlanan kıkırdak tipidir. Yunanca ‘hyalos’ yani ‘cam’ kelimesinden kaynaklanır. Az ışık geçirgen matriksi nedeniyle bu

ismi almıştır. Hiyalin kıkırdak, yapısal, biyokimyasal ve mekanik olarak araştırılmış ve dört zona ayrılmıştır. Bunlar yüzeysel (tanjansiyel), intermediate (ara), derin (radial) ve kalsifiye zonlar veya I, II, III ve IV zonlardır. Yaklaşık %40 Tip 2 kollajen lifler içerir ve homojen yapıdadır. Bu miktar, ciltteki kollajenin beş katıdır (20-22).

Açık mavi renkte, süt gibi görünen bu kıkırdağın kondrositleri oval olup, tek tek veya birkaçı birden lakünler içinde yerleşir. Kollajen fibrilleri perikondriumdan doku içine yayılır. Fetal iskelet kıkırdağı, erişkinde kostaların sternuma tutunma yerindeki kıkırdaklar, eklem kıkırdakları, nazal septum, trakea ve büyük bronş kıkırdakları, uzun kemiklerin uzamasını sağlayan epifiz plakları hyalin kıkırdak yapısındadır. Köpek balıklarının iskeletleri tüm yaşamları boyunca hyalin kıkırdak yapısındadır. (1,4)

Elastik Kıkırdak: Sarı renkte olup, kondrositlerin şekli hyalin kıkırdaktaki kondrositlere benzemektedir. Çevreleri kapsül ile çevrilidir. Tek tek hücreler şeklinde veya birkaç hücreden oluşan izogen gruplar halinde bulunurlar. Kollajen fibriller bu kıkırdakta geri plandadır. Bu kıkırdağa esnekliğini kazandıran elastik fibriller matrikste ağlar oluşturacak şekilde ön planda izlenirler. Elastik fibriller perikondriumun hemen altına denk düşen sahalarda gevşek düzenlenme gösterirler. Özel boyalarla doku içinde bu fibriller daha güzel izlenebilirler (1).

Elastik kıkırdak auriküla, dış kulak kanalı duvarları, östaki tüpünün kıkırdak kısmı, epiglottis, larinksin küneiform kıkırdağı ve küçük bronşiollede yer alır (1, 4).

Fibröz Kıkırdak (Fibro-kıkırdak): Fibröz kıkırdak tıkız bağ dokusu ile hyalin kıkırdak dokusu arası bir dokudur ve tıkız bağ dokusu ile kıkırdak dokusu arasında bir geçiş formu olarak kabul edilir. Gri-beyaz renklidir. Fibröz kıkırdak ya tek başına veya izogen gruplar halinde, genellikle birbirlerinden kaba tip I kollajen lifler ile ayrılmış, uzun sıralar halinde dizilmiş, kıkırdak hücrelerini içerir. Fibröz kıkırdak matriksi tip I kollajenden zengin olduğu için asidofildir (4).

Embriyonel gelişim sırasında sık rastanan bu kıkırdak tipine erişkinde intervertebral diskte, eklem kıkırdaklarında, simfisis pubiste, tendon-kemik bağlantı yerlerinde ve femur başı ligamentinde rastalanmaktadır. (1) Fibröz kıkırdak basınç ve çekme gibi travmatik etkilere karşı oldukça dayanıklıdır. Perikondriyumu yoktur (1,4).

2.1.7 Kıkırdak Dokusunun Onarımı

Kıkırdak metabolik olarak aktif bir doku olmasına rağmen düşük yapım ve yıkım hızına sahiptir, çünkü bu doku içinde az miktarda kondrosit vardır. Bu hücrelerin aktivitesine rağmen intrinsik tamir kapasitesi sınırlıdır ve küçük hasarlar bile ilerleyici işlev kayıplarına yol açabilir. Kıkırdak iyileşmesi için en önemli ölçüt hasarın büyüklüğüdür (10).

Yüzeyel bir hasar olduğunda, hasarlanan dokunun çevresindeki kondrositler bölünmeye başlar ve matriks sentezini hızlandırır. Çoğu vakada yeni sentezlenen matriks ve bölünen kondrositler defekti kapatmak için yeterli olmaz. Bu yetersizliğin altında yatan neden matriks üretimi ve hücre bölünmesinin sürekli olarak kesintiye uğramasıdır. Osteokondral defektlerin tamiri, hasarın matriks hasarı ya da eklem kıkırdağının tamamen yırtılmış olmasına göre farklılık gösterir. Tamir ve yeniden şekillendirme olayının sonuçları kıkırdak dokusu

altındaki dokunun bütünlüğü ile yakından bağlıdır. Tam kat hasar oluştuğunda, kırıkta altındaki kemik dokusunda kanama meydana gelir ve hasar bölgesinde hematoma oluşur. Hematomun içinde fibrin oluşur ve plateletler fibrin kollajene bağlanarak altta yatan kemik dokusu ile birlikte birçok vazoaktif madde ve büyüme hormonu salgılarlar: transforming growth factor-beta (TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF), bone morphogenic proteins (BMPs), insülin like growth factor I ve II (IGF-I, IGF-II). Kemik iyileşmesinde görevli bu büyüme faktörleri aynı zamanda kırıkta iyileşmesinde de önemli rol oynamaktadır (10).

Küçük çocuklar dışında, hasara uğrayan kırıkta yenilenmesi güç gerçekleşir. Perikondrium hasara uğramış alan içine girerek yeni kırıkta güçlükle ve çoğu zaman eksik olarak yapar. Yaygın hasara uğramış bölgelerde ve seyrek de olsa küçük bölgelerde- perikondrium, yeni kırıkta dokusu yerine tıkmaz bağ dokusundan oluşan nedbe dokusunu yapar (4). Bu nedenle skar dokusunu azaltabilmek için kırıkta onarımı sırasında kırıkta rejenerasyonunu maksimum seviyeye çıkarmak çok önemlidir (20).

2.1.8 Kırıkta Dokusunun Histofizyolojisi

Eklemlerde yer alan kırıkta dokusu, ağırlık taşıyan kemiklere destek olarak çok önemli bir fonksiyon icra ederler. Aynı zamanda bu kırıkta dokuların varlığı sayesinde eklem hareket kolaylığı da sağlanır. Solunum yolu ve kulak gibi yerlerde ise kırıkta dokusu esnek ve dirençli bir çerçeve oluşturarak ve buralarda içe doğru çökmenin önüne geçerek hayati denebilecek bir rol oynarlar. Kırıkta dokusu uzun kemiklerin enine ve boyuna büyümesinde de rol oynamaktadır (1).

Kırıkta dokusu protein, mineral ve vitamin eksikliği ile sonuçlanan beslenme yetersizliğini dolaylı yoldan gösterir. Deneysel çalışmalarda protein ve

A vitamini açısından zayıf bir diyetle beslenen sıçanların epifiz kıkırdaklarında hızlı bir incelmeye olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada hipofizektomi yapılan sıçanlarda uzun kemiklerde büyümenin durduğu, epifiz kıkırdaklarının incelendiği gösterilmiştir. Hipofizektomi ile epifiz kıkırdağında mitozun durduğu, kondrosit sayısında ve hücrelerin büyüklüğünde azalmaların olduğu tesbit edilmiştir. Bu sıçanlara büyüme hormonu enjekte edildiğinde kıkırdakta büyüme ve kemik gelişiminde normale dönüş olduğu görülmüştür (1).

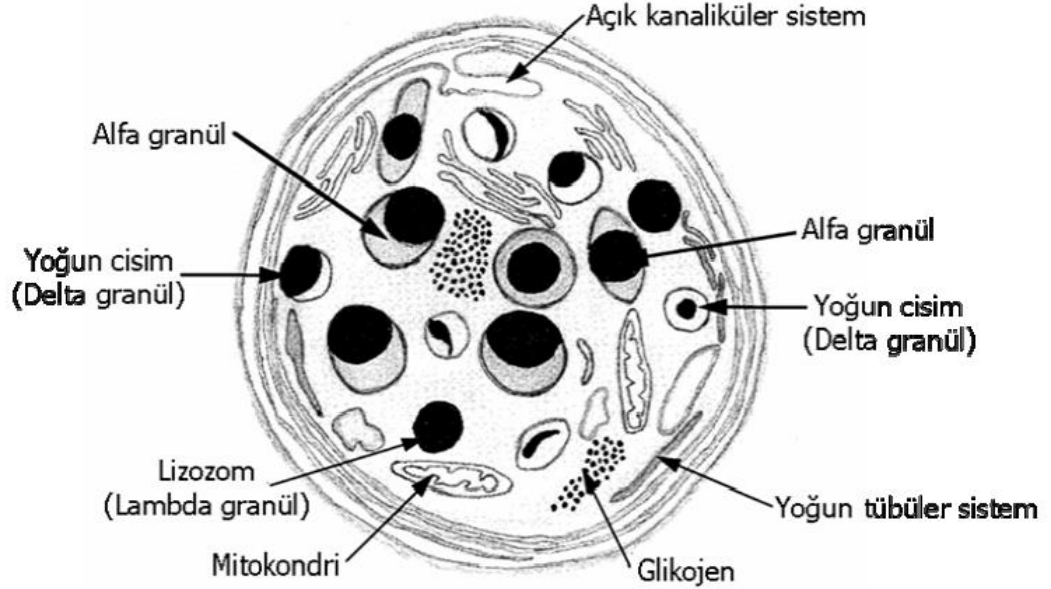
Trombositler, içinde kıkırdak dokusunun onarımında da rol oynayan çok miktarda büyüme faktörü içermektedir.

2.2 Trombositler

2.2.1 Genel Yapısı ve İçerikleri

Trombositler 2-4 µm çapında, disk biçiminde ve çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Bu yapılar kemik iliğindeki polipoid dev hücreler olan megakaryositler tarafından üretilirler ve periferik kan dolaşımına girdikten sonra yaklaşık 10 gün kadar yaşarlar. Trombositler periferik yaymada soluk mavi boyanan ve “hyalomer” adı verilen şeffaf bir periferik bölge ile mor boyanan ve granüllerin yerleştiği “granülomer” adı verilen merkezi kısımlardan oluşur. Trombositler, plazma membranının sitoplazma içerisine parmak şeklinde uzantılarından oluşan ve “açık kanalikül sistem” adı verilen bir kanal sistemine sahiptirler. Bu sistem sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmasını sağlayan fonksiyonel bir yapıdır. Hyalomer bölgesi içerisinde “yoğun tübül sistem” adı verilen ikinci bir kanal sistemi daha bulunmaktadır. Bu kanalikül sistemi, primer olarak trombosit aktivasyonu için gerekli olan kalsiyum

iyonlarını depolar. Ayrıca tromboksan gibi prostanooidlerin sentezi bu tübüler sistem üzerinde gerçekleştirilir (ekil 2.1) (23).



Şekil 2.1: Trombositlerin temel yapısı ve içerikleri. (Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. Platelets 12(5): s:262, 2001).

Trombositlerde hücre membranına yakın olarak yerlemi olan ve aktin içeren mikroflamanlar bulunmaktadır. Bu yapıların görevi trombosit hareketini sağlamak ve trombositlerin birbirlerine yapımaları esnasında filopod ve yüzey uzantılarının oluşmasını sağlamaktır. Trombosit membranının dış yüzeyinde bulunan glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin 15-20 nm'lik tabaka ise trombosit adezyonunu sağlamaktadır (7). Merkezi granlomer bölgesinde değişik özellikte granüller, az sayıda mitokondri ve glikojen partikleri yer almaktadır. Trombositlerde elektron mikroskopik incelemeler ile birbirlerinden ayırt edilebilen başlıca 3 tip granül bulunmaktadır. Alfa, delta ve lambda granüller olarak adlandırılan bu granüllerden iık mikroskop ile görülebilen granüllerin büyük çoğunluğu alfa granüllerdir. Deiik boyut ve içeriklere sahip olan bu granüllerin işlevleri de birbirlerinden farklıdır (**Tablo 2.1**) (23).

Tablo 2.1: Trombosit granüllerinin içerikleri (Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. Platelets 12(5): s:262, 2001).

Alfa granül	Delta granül	Lambda granül
<i>Yapışkan glikoprotein</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>Fibronektin, Vitronektin, vWF, Trombospondin</i>	Nükleotidler <ul style="list-style-type: none">• ATP, ADP• GTP, GDP	Asit proteazlar <ul style="list-style-type: none">• Katepsin D, E• Karboksipeptidazlar• Kollajenaz• Asit fosfataz• Arilfosfataz
<i>Hemostaz faktörleri</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Kininojenler, Protein S, Plasminojen</i>	Aminler <ul style="list-style-type: none">• Serotonin• Histamin	Glikohidrolazlar <ul style="list-style-type: none">• Heparinaz• Diğerleri
<i>Hücre sel mitojenler</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>PDGF, TGF-β, ECGF, EGF</i>• <i>FGF-II, VEGF, IGF-II, IL-β</i>		
<i>Proteoglikanlar</i> <ul style="list-style-type: none">• <i>Btg, PF4, HRGP, PBP, CTAP-III, NAP-II</i>		
<i>Proteaz inhibitörleri</i> <i>Albumin ve immünglobülinler</i>		

Alfa granüller: 300-500 nm çapında olan bu granüller diğerlerine oranla çok daha heterojen bir içeriğe sahiptirler. Boyut ve sayıları nedeniyle trombositlerin majör granülleri olarak kabul edilirler. Küresel veya oval şekilli bu granüllerde, koyu renkli görünen alanlarda proteoglikanlar yer alırken, daha açık renkli periferal zonda von Willebrand Factor (vWF) gibi plazma proteinleri ve tübüler yapılar yer almaktadırlar. Alfa granüller içerisinde bulunan proteinlerin bir kısmı megakaryosit maturasyonu sırasında sentezlenmektedirler ve bunlar erken dönemde görülebilirler. Buna karşın diğer bazı proteinler, megakaryosit veya trombosit aşamasında plazmadan endositoz yolu ile alınarak depolanmaktadırlar. Bu yolla depolanan albumin ve immunglobulin gibi proteinlerin granül içerisindeki yoğunluğu oldukça düşük seviyelerde kalmaktadır (23).

Alfa granüller hemostaz, inflamasyon, yara iyileşmesi ve hücre-matriks etkileşimi üzerinde kritik öneme sahip çok sayıda protein molekül içermektedirler (23).

Delta granüller (yoğun cisimler): 250-300 nm çapa sahip olan bu granüller elektron mikroskopta ışınları yoğun olarak absorbe etmeleri nedeniyle dens-yoğun görünmektedirler. Bu nedenle delta granüller “yoğun cisimler” olarak da adlandırılırlar. Kalsiyum iyonları, pirofosfat, ADP ve ATP gibi protein olmayan molekülleri içeren granüllerdir. Delta granüller ayrıca serotonin deposu olarak da görev yapmaktadırlar ve içeriklerindeki serotonin miktarının plazmadan yaklaşık 100 kat fazla olduğu bilinmektedir (23).

Lambda granüller (lizozomlar): Sadece lizozomal enzimler içeren bu veziküllerin çapları 175-250 nm arasında değişmektedir. Bu enzimler, bakterisidal

etkileri yanında plazminin tamir fazından sonra bölgedeki pıhtıyı eriterek ortadan kaldırması sürecinde de görev alan enzimlerdir (23).

2.2.2 Trombositlerde Bulunan Büyüme Faktörleri

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): İlk olarak fibroblast ve düz kas hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinden dolayı “trombosit kaynaklı mitojen” olarak tanımlanmıştır. Yaralanma sonrasında erken dönemde doku konsantrasyonu artan faktörlerden birisidir. PDGF, A ve B olmak üzere iki farklı polipeptit zincirinin değişken kombinasyonlar ile birleşmesinden oluşur ve bu nedenle de dokularda AA, AB ve BB şeklinde üç farklı izoform şeklinde bulunur. PDGF hedef dokuda bağlandığı reseptörlerde tirozin α ve β reseptörleri olarak iki şekildedir. PDGF'nin tüm formları α reseptörüne bağlanabilirken, PDGF-BB sinyal iletimi yalnızca β reseptörlerini kullanmaktadır (24).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü primer olarak trombositlerden salınan bir büyüme faktörü olmakla birlikte, aynı zamanda makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar ve keratinositler tarafından da sentezlenerek salınılmaktadırlar. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü fibroblastlar, düz kas hücreleri ve endotelial hücreler üzerinde kemoatraktan ve mitojenik etki göstermekte, aynı zamanda bu hücreleri fibronektin ve hiyalüronik asit sentezi için stimüle etmektedir. PDGF'nin bu hücreler üzerindeki β reseptör aktivasyonu fibroblast proliferasyonu, kollajen birikimi ve anjiogeneze öncülük eder (24).

PDGF doku yaralanması sonrası tespit edilen ilk faktörlerden birisidir. Erken dönemde insülin benzeri büyüme hormonu gibi diğer faktörlerin sentez ve salınımını da indükler. Rekombinan yolla elde edilen PDGF'nin, cerrahi yaralarda tensil gücü arttırdığı, kronik yaralarda iyileşmeyi hızlandırdığı ve fleksör tendon

onarımından sonra topikal olarak uygulandığında mekanik gücü arttırdığı saptanmıştır (24). Ayrıca yapılan klinik çalışmalar, bası yaraları ve diyabetik ayak ülserlerinde de kullanılabileceğini işaret etmektedir (25, 26).

Transforming büyüme faktör- β (TGF- β): İlk olarak 1983 yılında plasenta kaynaklı olarak elde edilmiş ve kültür ortamında fibroblastların proliferasyonunu sağladığı bulunmuştur. TGF- β farklı dokularda üç farklı izoform şeklinde bulunmaktadır. (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) ve bu formların polipeptit dizilimleri %60 oranında aynıdır. Hedef hücrelerde RI, RII ve RIII olarak adlandırılan membran reseptörlerine bağlandıklarında, hücre içi serin-treonin protein kinaz aktivasyonuna neden olurlar (27).

TGF- β vücuttaki tüm hücreler tarafından sentezlenebilen ve yine tüm hücrelerce duyarlı olunan bir faktördür. Bununla birlikte, TGF- β 'nın her hücre tipindeki cevabı farklıdır. Genel olarak hücre döngüsünün regülasyonunda, embriogenezde ve organ gelişiminde etkili bir faktördür. Yara iyileşmesi aşamalarında, TGF- β trombositlerden başka lenfositler, makrofajlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, epitelyal hücreler ve fibroblastlardan da salınmaktadır. Yara yerinde kemotaktik ve anjiogenezi hızlandırıcı etkisi vardır. Ayrıca kollajen, fibronektin ve glikozaminoglikanlar gibi birçok matriks proteininin sentezini regüle eder (27).

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I): Aminoasit dizilimi insan proinsülinine benzediğinden bu adı almıştır. IGF ailesinin diğer üyesi olan IGF-II ile %50 homolog dizilime sahiptir. IGF-I sekresyon sonrasında dokularda lokal olarak etki gösterebildiği gibi, sistemik dolaşıma katılarak uzak organlarda endokrin etkiler de gösterebilmektedir. Lokal olarak etki gösterebilmesi için

bağlanabileceği altı farklı reseptörü bulunmaktadır ki bunlardan IGFBP-3 baskın olarak bulunmaktadır. Bu reseptörle etkileşim, hücre içi tirozin kinaz yolunu tetiklemektedir (24).

Dolaşımda bulunan IGF-I' in kaynağı büyük ölçüde karaciğer dokusudur. Buna karşın dokularda lokal olarak etki gösteren IGF-I, keratinosit, osteoblast ve fibroblast gibi değişik hücreler tarafından üretilebilir. Hücre kültürleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar IGF-I'in fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, çizgili kas hücreleri, epitelyal hücreler, tiroid hücreleri ve nöronlar gibi birçok hücre üzerinde mitojenik olduğunu göstermektedir (24).

Dolaşımda bulunan IGF-I'in hücrese seviyedeki anabolik etkileri yalnızca protein sentezini artırmakla sınırlı değildir. Periferal hücrelerde glikoz içe alımını ve glikojen sentezini sağlamak, nöronların yaşayabilirliğini, miyelin sentezini ve kemik rejenerasyonunu artırmak gibi görevleri de bulunmaktadır (24).

Bazık fibroblast büyüme faktörü (bFGF veya FGF-II): İlk kez sığır hipofizinden elde edilmiş olan bFGF'in, fibroblastlar üzerindeki mitojenik etkisi gösterilmiştir. Daha sonra anjiogenez, yara iyileşmesi ve embriyolojik gelişim gibi hücrese süreçlerde modülatör rolü olduğu saptanmıştır. Heparine bağlanan büyüme faktörleri grubundan olan bFGF, heparin dışında hücre yüzeyinde veya ekstraselüler matriks içerisinde bulunan heparan-sülfat proteoglikanlara da bağlı olarak bulunmaktadır. Hücrese aralıkta bulunan bu proteoglikanların yıkımı, ortamdaki serbest bFGF miktarının artmasına neden olur ve serbest bFGF hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlerine (FGFR1-4) bağlanarak hücre içi sinyal iletimini sağlar (28).

Bazik fibroblast büyüme faktörü temel olarak endotelial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, kondrositler ve mast hücreleri tarafından sentez edilerek salınır. bFGF'nin hücre tipleri üzerindeki etkisi de değişkendir. Yara iyileşmesi sürecinde özellikli olarak keratinositlerin migrasyon ve proliferasyonunu artırmaktadır. Aynı zamanda fibroblastlardan kollajenaz enziminin salınımını ve kapiller endotelial hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederek, anjiogenez için ortam yaratır (29).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF): Tümör anjiogenezi üzerindeki etkileri nedeniyle 1983 yılında tanımlanmış olan bir büyüme faktörüdür. Tümör hücreleri tarafından salınan VEGF'in, vasküler endotelial hücrelerin geçirgenliğini artırdığı, bu nedenle hücreler arası mesafede ve vücut boşluklarında sıvı birikimine neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle ilk olarak 'vasküler permeabilite faktörü' olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları bunu takip eden çok sayıda çalışma, bu gruba ait izoformların ve spesifik reseptörlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Vasküler endotelial büyüme faktörünün şu an için bilinen farklı büyüklüklerde beş adet izoformu mevcuttur. Benzer biyolojik etkilere sahip 121, 145, 165, 189 ve 206 formlarından baskın olarak bulunanları VEGF121 ve VEGF165 formlarıdır. VEGF hücreler arası mesafede kollajenaz ve geletinaz aktivasyonu ile vasküler bazal membranın yıkımını tetikler, böylelikle anjiogenezin erken basamaklarını hızlandırır. Anjiogenez için gerekli α -integrinlerin ekspresyonunu sağlar. Vazodilatasyon, vasküler geçirgenlikte artış, endotelial hücre proliferasyonu ve monosit migrasyonu, VEGF varlığında hızlanan diğer biyolojik süreçlerdir. İlk olarak tümör hücreleri tarafından sentez edildiği bulunmasına rağmen, nötrofiller, trombositler, keratinositler ve astrositler

gibi birçok farklı hücre tipi tarafından da doku hipoksisine ve düşük glukoz değerlerine cevap olarak salınır. Klinikte, iskemik yaralar üzerine topikal olarak uygulanan VEGF'in yara iyileşmesini geliştirdiği ve ekstremitelere olan kan akımını arttırdığı tespit edilmiştir (29).

2.3 Trombositten Zengin Plazma

Trombositlerin hemostaz sürecindeki etkin fonksiyonlarının keşfedilmesi çok eskilere dayanmasına rağmen, yara iyileşmesi üzerindeki etkileri yakın zamanlarda tespit edilmiştir. Trombositten zengin plazma (TZP) ilk olarak 1997 yılında Whitman ve arkadaşları tarafından maksillofasiyal cerrahide kullanılmıştır ve yazarlar, jel içindeki plateletlerin aktivasyonu ve büyüme faktörlerinin salınımı sayesinde, yara iyileşmesinin hızlanması gerektiğini rapor etmişlerdir (30).

Dolaşımdaki trombositler, aktive olmaları durumunda alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıdaki büyüme faktörünü ortama salmaktadırlar. Benzer şekilde invitro ortamda da aktive edilebilmektedirler. Yüksek yoğunlukta trombositin trombin ile aktive edilmesi, mitojenik faktörler yönünden zengin bir plazma elde edilebilmesini sağlamaktadır ki, bu son ürün "trombositten zengin plazma" olarak adlandırılır (30).

Pıhtı içerisindeki aktive trombositler, alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıda büyüme faktörünü ortama salgıladıklarında, bu faktörler uygulama sahası içerisinde büyüme faktörlerinden zengin bir mikro çevrenin oluşmasını sağlamaktadır (30).

2.3.1 Kullanım Alanları:

Fibrinli biyomateryallere trombosit ilave edilmesi doksanlı yılların sonunda tanımlanmıştır ve bu girişim günümüze kadar yapılmış olan birçok farklı klinik ve deneysel çalışmaya öncü olmuştur. TZP ilk olarak Whitman ve arkadaşları tarafından osteointegre titanyum implantlar ile yapılan maksillofasiyal rekonstrüksiyon ameliyatlarında kullanılmıştır (30). Daha sonra Marx ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada, mandibular defekt rekonstrüksiyonu için kullandıkları kansellöz kemik greftleri üzerine TZP uygulamışlar ve kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu tespit etmişlerdir (31). Sonraları, bunu takip eden çok sayıda çalışmanın amacı, TZP'nin hazırlanış aşamalarını geliştirmek ve kullanım alanlarını genişletmek olmuştur.

2.3.1.1 Maksillofasiyal ve periodontal cerrahi:

TZP'nin ilk olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerinin tespit edilmesi, öncelikle maksillofasiyal cerrahi ve diş cerrahisi alanında klinik kullanıma girmesine neden olmuştur. Trombositten zengin plazma invitro ortamda fetal osteoblast-benzeri hücrelerin rejenerasyon ve fonksiyonel aktivitesini artırmak yanında, aynı zamanda mezenkimal kök hücrelerinin bölgeye migrasyonunu da sağlamaktadır. Klinikte mandibular defektlerin tedavisinde kemik greft ile birlikte uygulanan TZP'nin kemik biçimlenmesinin hız ve derecesini artırdığı ve bunu trombositlerden salınan PDGF ve TGF- β aracılığıyla sağladığı bildirilmiştir (31). Siebrecht ve ark. Poröz hidroksiapatit greftler içerisine olan kemik ilerlemesinin TZP ile artırılabilirdiğini göstermişlerdir (32). Yine maksiler sinüs yükseltilmesinde, periodontal defektlerde ve dental implant cerrahisinde klinik kullanıma girmiştir (33).

2.3.1.2 Ortopedik cerrahi:

Spinal füzyon ameliyatlarında titanyum implantlar etrafında uygulanan TZP kemik rejenerasyonunu artırmaktadır (34).

2.3.1.3 Oküler cerrahi:

Maküladaki tam kat eksikliklerin tedavisinde ve retinal yaralanmalarda proliferatif hücre cevabını artırdığı bildirilmiştir (35).

2.3.1.4 Estetik cerrahi:

Jackson ve ark. yaptıkları çalışmada, abdominoplasti sonrası flep altına uyguladıkları TZP'nin, seroma gelişimini belirgin derecede azalttığını bulmuşlardır (36). Man ve ark. yüz germe, meme küçültme ve meme büyültme gibi kozmetik ameliyatlarda TZP kullanıldığında, ameliyat zamanının kısaldığını, dren gereksiniminin ortadan kalktığını ve ameliyat sonrası dönemde gelişen ödem ve ağrıların azaldığını belirtmiştir. Aynı çalışmacılar lazer ile yüz gençleştirme sonrasında uyguladıkları TZP'nin biyolojik bir örtü gibi davrandığına da dikkat çekmişlerdir (37).

2.3.1.5 Rekonstrüktif cerrahi:

Trombositten zengin plazmanın kronik ülserlerin ve iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanımı üzerine yapılan çok sayıda klinik çalışma, TZP'nin yara yerinde vaskülarizasyon, epitelizasyon ve granülasyonu artırdığını bildirmektedir (38, 39). Diyabetik ülserlerde, arteriyel ya da venöz vasküler yetmezliğe bağlı ülserlerde ve bası yaralarında, iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi tespit edilen TZP'nin, otoimmün hastalıklara bağlı ülserlerin tedavisinde ise etkili olmadığı belirtilmektedir (40). Trombositten zengin plazmanın tendon iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştıran Aspenberg ve ark. da, TZP kullanımının tendon iyileşmesini

hızlandırdığını saptamışlardır (41). Bu bulgu daha sonra Anitua ve arkadaşlarının tendon hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmalar ile de desteklenmiştir (42).

2.4 Trombositten Zengin Fibrin

Trombositten zengin fibrin (TZF) ilk defa Fransa'da Choukroun tarafından, ikinci kuşak trombosit konsantrasyon ürünü olarak tanımlanmıştır. TZF doğal kan dokusundan elde edilen, yapısında bol miktarda trombosit ve lökosit içeren fibrin yapısındadır. TZP tekniğinden farklı olarak antikoagülan ve trombin kullanılmaması, tekniği daha basit, hızlı ve ekonomik hale getirmiştir (43,44). TZF hazırlanması esnasında trombin kullanılmaması elde edilen fibrin dokusunun doğal fibrin çatısına sahip olmasını ve büyüme faktörlerinin proteolizinin önlenmesini sağlamaktadır (44,45).

Fibrin, plazma ve trombositlerin α (alfa) granüllerinde yoğun şekilde bulunur. Fibrinojenin aktive edilmiş formudur. Pıhtılaşmada, trombosit agregasyonunda önemli görevler yapmaktadır. Bu aşamada bir çeşit biyolojik yapıştırıcıya dönüşüp vasküler kanamayı kontrol altına alır. Çözülebilir bir protein olan fibrinojen, trombin tarafından çözilemeyen bir molekül olan fibrine dönüşerek kanama bölgesinde fibrin jeli oluşturur. Pıhtılaşma esnasında bu fibrin matriks içerisine yara iyileşmesini kontrol eden çeşitli büyüme faktörleri salgılanmaktadır. Bu özelliklerinden yola çıkılarak fibrin yapıştırıcılar, TZP ve son olarak da TZF uygulamaları geliştirilmiştir. (43,46).

Trombositler, pıhtı oluşumu için gerekli olup yara iyileşmesini başlatmak ve desteklemek için büyüme faktörlerinin salınmasından sorumludur. Cerrahiden sonra, trombositler bölgede kalıcı bir kan pıhtısı oluştururlar. Doku oluşumu, iyileşmenin desteklenmesi ve arttırılması için büyüme faktörlerinin salınımı

başlar. Diğer kemiklerde olduğu gibi maksillofasiyal bölgenin gelişmesinde de hormonların ve büyüme faktörlerinin çok önemli rolü vardır. Kemik ve yumuşak doku metabolizması üzerinde sistemik hormonların ve büyüme faktörlerinin etkilerini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (43,46).

Trombositlerdeki büyüme faktörleri etkilerini spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. TZF'nin osteojenik hücrelerin proliferasyonunu arttırarak kemik formasyonu ve rejenerasyonu üzerinde güçlü bir stimülatör olabileceği düşünülmektedir (43,46). Bu bilgiler ışığında TZF materyali biyolojik bir fibrin yapıştırıcıdan çok, yara iyileşmesini hızlandıran bir ajan olarak nitelendirilmektedir (43).

TZF matriksi içerisinde sadece trombositlerden salınan sitokinler değil, lökositler tarafından salgılanıp enflamasyon kontrolünde görev alan sitokinler de tespit edilmiştir. Bunların ve TZF'deki sitokinlerin savunma mekanizmasını güçlendirdiğini göstermiştir. Bu sitokinler ile polimorfonükleer lökosit, makrofaj gibi hücreler aktive edilip TZF bölgesinde daha hızlı hücresel cevaplara sebep olunmaktadır. Çalışmalarda matriks içindeki sitokinlerin remodelling aşamasında yavaş salınım yaparak uzun dönemde etkili oldukları gösterilmiştir (47).

2.4.1 TZF' deki Lökositler Tarafından Salgılanan Sitokinler:

Bu grupta yer alan sitokinler enflamasyonda kilit görevi yapan Interlökin-1 β (IL-1 β), IL-6 ve TNF- α ile yara iyileşmesinde görev yapan IL-4 ve VEGF gibi sitokinlerdir (47).

2.4.1.1 Interlökin-1 β : Aktif makrofaj, nötrofil, endotel hücreleri, fibroblast, keratinosit ve Langerhans hücreleri tarafından salgılanır. Enflamasyonunun kontrolünde kilit rol oynar. İki farklı gene bağlı olarak α ve β formları vardır. Interlökin-1 β (IL-1 β) dominanttır.

IL-1 β sentezlenmesi TNF- α , İnferon α , β , γ ve bakteriyel endotoksinler tarafından kontrol edilmektedir. Ana görevi T helper lenfosit stimülasyonudur.

TNF- α ile birlikte çalıştığında osteoklastların aktive olmasıyla osteolizisin artmasına neden olur (47).

2.4.1.2. IL-6 (Interlökin-6): IL-6, IL-1 β ve TNF- α ile koordineli olarak çalışan bir enflamatuvar sitokinidir. Asıl kaynağı stimüle olan monosit, fibroblast ve epitelyal hücreler olup; uyarıda makrofaj, T ve B lenfositler, granülosit, mastosit, kondrosit ve osteoblastlar da IL-6 salgırlar. Fizyolojik olarak IL-1 β , bakteri endotoksinleri, TNF- α ve PDGF tarafından da salgılanması uyarılmaktadır. Ayrıca IL-6 kendisi salgılanmasını stimüle veya inhibe edebilir (47).

IL-6, B lenfositlerin farklılaşmasını ve T lenfositlerin de aktivasyonunda rol alır. IL-2 ile beraber matür veya immatür T lenfositlerin sitotoksik T lenfositlere farklılaşmasını sağlar. Bundan başka IL-4 ile etkilenmesinden sonra IL-6, B lenfositlerin son farklılaşmasında görev yapıp bunların salgılayıcı plazmositlere dönüşmesinde görev alır. B lenfositlerin popülasyonuna bağlı olarak antikorların salgılanmasını uyarır. Bu oran 120 ile 400 kat arasında artmaktadır. Son olarak IL-6'nın IL-3 ile sinerjik etki göstererek hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu in vitro olarak arttırdığı tespit edilmiştir (47).

IL-6 immün hücrelerin uyarılmasında, dolayısıyla enflamasyon, yıkım ve remodelling olaylarında önemli görevler yapmaktadır (47).

2.4.1.3 Tümör Nekroze Edici Faktör α (TNF- α): TNF- α , bakteriyel endotoksin istilası sonucu meydana gelen enflamasyonda ilk salgılanan sitokinlerdendir. Bakteriyel antijenler tarafından aktivasyon sağlandıktan sonra bu faktör monosit/makrofaj, nötrofil, polimorfonükleer lökosit ile T lenfositler tarafından salgılanmaktadır. Salgılanma miktarı IL-6 ve TGF- β tarafından kontrol edilmektedir (47).

TNF- α , monositleri aktive eder ve fibroblastların remodelling kapasitesini stimüle eder. Bu faktör fagositoz ile nötrofil sitotoksitesini arttırarak IL-1 ile IL-6 gibi mediatörlerin salgılanmalarını ayarlar (47).

2.4.1.4 IL-4 (Interlökin 4): IL-4, başlıca aktive olan T hücrelerinin bir alt grubu tarafından salgılanmakta; bu hücreler aynı anda IL-6'yı da salgılamaktadırlar. IL-4, aktive olan B hücrelerin proliferasyon ile farklılaşmasında görev almaktadır (47)

Esas görevi iyileşme esnasında enflamasyon olayı cereyan ederken, enflamasyonun şiddetini azaltmaktır (47).

2.4.2 Trombositten Zengin Plazma ve Fibrinin Avantajları

1. Alıcı ve verici alanda operasyon sırasında ve sonrasında kanamanın azalması.
2. Yumuşak doku iyileşmesinin hızlandırılmasına yardımcı olması.
3. Büyüme faktörleri sayesinde iyileşmekte olan dokuların vaskülarizasyonunun hızlandırılması.

4. Kemik replasman materyalleri ile kombine kullanılarak rejenerasyonun arttırılmasını sağlaması.
5. Toksik olmaması.
6. Orijinal donörden alındığında otojen materyal olduğu için immün ve allerjik reaksiyonlara sebep olmaması
7. Operasyon sırasında veya öncesinde kısa sürede hazırlanması (Operasyon sırasında zaman kaybına neden olmaz).
8. Doku uyumlu olması.
9. Enfeksiyöz hastalıkların geçiş riskinin bulunmaması.
10. İçindeki lökosit ve bunlar tarafından salgılanan sitokinler sayesinde enflamasyon olayını kontrol etmesi ve enfeksiyonu baskılaması (43, 46, 47, 48).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın 24.02.2011 tarih ve 11/193 sayılı izni ile, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada 21 adet 9-12 aylık (3500-4500 g) erişkin beyaz Yeni Zelanda tipi erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar uygun kafeslerde, 22 ± 2^0 C sıcaklıkta ve 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı.

Tavşanlar öncelikle her bir grupta 6 tavşan olacak şekilde 3 çalışma grubu ve 3 tavşan içeren bir sham grubuna ayrıldı (Tablo 3.1). Her çalışma grubu her bir alt grupta üçer tavşan olacak şekilde A ve B alt gruplarına ayrıldı. Tavşanların sağ ve sol kulakları birer spesimen olarak çalışmaya dahil edilerek 6 sayısına ulaşıldı.



Resim 3.1: Resimde tavşanların santral aurikular arterinden kan 8 ml kan alındığı görülmektedir.

TZP, Cellular Mask Advanced (RegenACR[®], İsviçre) sistemine göre hazırlandı. Tavşanların santral aurikular arterinden sitratlı bir tüpe 8 ml kan alındı. Kanama mandal ve bası ile durduruldu. Alınan kan standart santrifüjde 3100

devirde [rpm:rotation per minute]'de 9 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında biriken sarımsı renkli trombosit zengin plazma enjektöre alındı.

TZF hazırlanması için tavşanların santral aurikular arterinden içerisinde antikoagülan madde içermeyen 10 ml' lik tüpe 8 ml kan alındıktan sonra 3000 rpm de 10 dakika süreyle santrifüje edildi. Santrifüj işleminin ardından tüpün orta kısmında biriken TZF elevatör yardımı ile alındı. Tavşanlara kendi kanından elde edilen materyal otolog olarak uygulandı.



Resim 3.2: Elde edilen TZF görülmektedir.

Genel anestezi altında yapılacak ameliyat için bacak kası içine yapılan 35 mg/kg Ketamin HCL (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 8 mg/kg Ksilazin HCL (Rompun, Bayer, Almanya) enjeksiyonu uygulandı. Aurikula jilet ile traş edildikten sonra Povidone-iodine (Betadine[®], Kansuk Lab. İstanbul) ile dezenfeksiyon sağlandı.



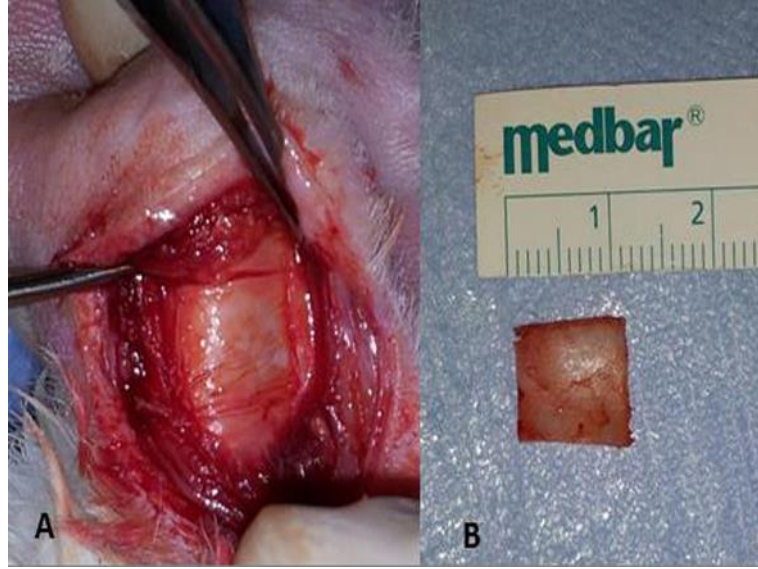
Resim 3.3: Traş edilmiş kulak izlenmektedir.

İnfiltrasyon anestezisi 1 ml 1/100000'lik adrenalın içeren artikain HCL (Ultracain DS-forte[®], Sanofi, Türkiye) ile yapıldıktan sonra, aurikula dorsal yüzüne insizyon yapıldı. Posterior cilt flebi 20x20 mm kıkırdak ekspoze edilene kadar mukoperikondrium eleve edildi.



Resim 3.4: Resimde 20x20 mm kıkırdak ekspoze edilene kadar mukoperikondriumun eleve edildiği görülmektedir.

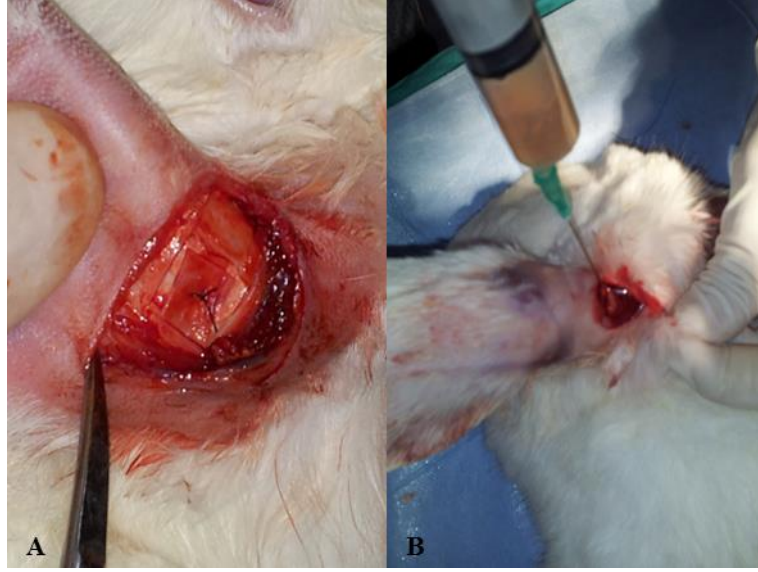
Tüm A alt gruplarında tavşanların kulaklarından 10x10 mm² kıkırdak eksize edildi. Dışarıya çıkarılan kıkırdağın çevresinden 1 mm'lik kıkırdak eksize edildi.



Resim 3.5A: Resimde 10x10 mm kıkırdak eksize edildiği izlenmektedir.
3.5B: Resimde dışarı alınan 10x10 mm kartilaj görülmektedir.

Birinci grupta elde edilen 8x8 mm kıkırdak çıkarıldığı alana yerleştirildi ve sütür ile sabitlendi. Üzerine 2 ml TZP enjekte edildi.

İkinci grupta elde edilen 8x8 mm kıkırdak TZF ile muamele edildikten sonra çıkarıldığı alana yerleştirildi ve 5-0 “polyglycolic acid” içerikli eriyebilen (Vicryl – Johnson and Johnson[®], USA) sütür ile sabitlendi.









Resim 3.6A: Yerine yerleştirilen kıkırdak dokusunun sütürle sabitlendiği görülmektedir. **3.6B:** Bu resimde 2 ml TZP'nin kıkırdak dokusu üzerine enjekte edildiği gösterilmektedir.

Üçüncü grupta ise kıkırdak herhangi bir muameleye tabi tutulmaksızın çıkarıldığı alana yerleştirildi ve sütür ile sabitlendi.

Tüm B alt gruplarında tavşanların kulaklarından 10x10 mm² kıkırdak eksize edildi.

- **Birinci grupta** (TZP grubu) kıkırdağın çıkarıldığı alanda birbiri ile karşılıklı gelen mukoperikondrium üzerine 2 ml TZP uygulandı.
- **İkinci grupta** (TZF grubu) kıkırdağın çıkarıldığı alana TZF yerleştirildi.
- **Üçüncü grupta** (Kontrol grubu) ise kıkırdağın çıkarıldığı alana bir müdahalede bulunulmadı.
- **Dördüncü grup** sham grubu olarak planlandı. Sham grubunda da 3 tavşan vardı. Bu gruptaki tavşanlara sadece insizyon ve mukoperikondrium elevasyonu yapıldı. Kıkırdağa bir girişimde bulunulmadı.

Tablo 3.1 Çalışma gruplarının şematik planlaması

	A	B
1.Grup (TZP grubu)		
2.Grup (TZF grubu)		
3.Grup (Kontrol grubu)		

Cilt insizyonları 5-0 vicryl ile suture edildi. Operasyon sonrasında enfeksiyonu önlemek için deneklere intramusküler (im.) prokain penisilin (Pronapen[®], Bayer, Almanya) 40,000 IU uygulandı.

Tüm tavşanlar 3 aylık izlem periyodunun sonunda letal dozda pentobarbital verilerek sakrifiye edildi.

İşlem yapılan kulak kıkırdakları çıkarıldıktan sonra %10'luk formaldehit solüsyonu ile fikse edildi. Örneklemeye ve rutin doku prosedürlerinden sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 4µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyandı. Her spesimen *mukoza inflamasyonu*, *mukoza ülserasyonu*, *kıkırdak hasarı* ve *kıkırdak rejenerasyonu* açısından değerlendirildi. Parametreler semikantitatif olarak değerlendirildi:

0 = normal intakt kıkırdak,

1 = minimum kondrosit kaybı,

2 = hasarlı bölgede belirgin kondrosit kaybı, hasarlı bölgenin belli olması,

3 = hasarlı bölgede kondrosit kaybına ilaveten fibröz ve osteoid doku oluşumu,

4 = hasarlı bölgede kıkırdak uçları arasında fibröz kıkırdak ve osteoid doku benzeri yapıların görülmesi,

5 = kıkırdak uçları arasında kıkırdak dokusu hariç fibröz ve osteoid dokunun yer alması.

İstatistik:

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS 20.0 (IBM, Chicago, Illinois, ABD) paket programı ile değerlendirildi. Verilerin frekans ve yüzdesel dağılımları verildi. Normallik testi sonucunda, gruplar arasında farklılık incelenirken ikili gruplarda normal, dağılmayan değişkenlerde ise Mann Whitney U Testi kullanıldı. İki'den fazla gruplarda ise normal dağılmayan değişkenlerde düzeltmeli Kruskal Wallis H Testi kullanıldı.

Gruplar arası farklılık incelenirken; anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kullanılmış olup $p < 0,05$ olması durumunda gruplar arası anlamlı farklılığın olduğu, $p > 0,05$ olması durumunda ise gruplar arası anlamlı farklılığın olmadığı belirtildi.

4. BULGULAR

Her grupta altışar tavşan ve sham grubunda 3 tavşan olmak üzere toplam 21 adet denek, postoperatif 3 ay takip edilerek çalışma tamamlandı. Deneklerin tamamı uygulanan anestezi protokolünü tolere ettiler. Postoperatif takiplerde deneklerin hiçbirinde yara yerinde müdahale gerektirecek bir hematoma veya enfeksiyon bulgusuna rastlanılmadı.

Makroskopik Bulgular

Örneklerin alınması için eski insizyon hattından girildiğinde, bütün gruplarda cilt altında skar formasyonu gözlemlendi. Cilt, mukoperikondrium kıkırdak üzerinde bırakılacak şekilde eleve edilerek yaklaşık 20x20 mm boyutunda kıkırdak eksize edilerek spesimen olarak dışarı alındı.

Histomorfolojik Bulgular

Tüm spesimenler *mukoza inflamasyonu*, *mukoza ülserasyonu*, *kıkırdak hasarı* ve *rejenerasyonu* açısından değerlendirildi. Spesimenler 5x, 10x, 20x ve 40x büyütme oranlarında incelendi. Her bir spesimen gereç ve yöntemde anlatıldığı üzere 0'dan 5'e kadar skorlandı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 4.1: Gruplar Arasında Skor Değerleri Dağılımı

		Grup						Kruskal Wallis H Testi		
		n	Mean	Median	Min	Max	SS	Sıra Ort.	H	p
Skor	Grup 1	12	3.8	4.0	2.0	5.0	1.2	19.54	0.425	0.808
	Grup 2	12	3.4	3.5	2.0	5.0	1.4	17.00		
	Grup 3	12	3.7	4.0	2.0	5.0	1.4	18.96		
	Toplam	36	3.6	4.0	2.0	5.0	1.3			

Gruplar arasında skor değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmedi ($p>0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmemekle birlikte 2. grupta (TZF grubu) skor değerlerinin daha düşük olduğu görüldü.

Tablo 4.2: 1. Grupta (TZP Grubu) A/B Grupları Arasında Skor Değerleri Dağılımı

		Grup 1						Mann Whitney U Testi		
		Alt Grup						Sıra Ort.	U	p
		N	Mean	Median	Min	Max	SS			
Skor	A	6	3.83	4.00	2.00	5.00	0.98	6.08	15.5	0.670
	B	6	3.83	4.50	2.00	5.00	1.47	6.92		
	Toplam	12	3.83	4.00	2.00	5.00	1.19			

1. grupta (TZP grubu), A/B grupları arasında skor değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmedi ($p>0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmemekle birlikte 1. grupta skor değerlerinin A grubunda daha düşük olduğu görüldü.

Tablo 4.3: 2. Grupta (TZF Grubu) A/B Grupları Arasında Skor Değerleri Dağılımı

		Grup 2						Mann Whitney U Testi		
		Alt Grup						Sıra Ort.	U	p
		N	Mean	Median	Min	Max	SS			
Skor	A	6	3.17	3.00	2.00	5.00	1.33	5.75	13.5	0.445
	B	6	3.67	4.00	2.00	5.00	1.51	7.25		
	Toplam	12	3.42	3.50	2.00	5.00	1.38			

2. grupta (TZF grubu), A/B grupları arasında skor değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmedi ($p>0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmemekle birlikte 2. grupta skor değerlerinin A grubunda daha düşük olduğu görüldü.

Tablo 4.4: 3. Grupta (Kontrol) A/B Grupları Arasında Skor Değerleri Dağılımı

		Grup 3						Mann Whitney U Testi		
		Alt Grup						Sıra Ort.	U	p
		N	Mean	Median	Min	Max	SS			
Skor	A	6	3.17	3.00	2.00	5.00	1.33	5.08	9.5	0.149
	B	6	4.17	5.00	2.00	5.00	1.33	7.92		
	Toplam	12	3.67	4.00	2.00	5.00	1.37			

3. grupta (kontrol grubu), A/B grupları arasında skor değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmedi ($p>0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmemekle birlikte 3.grupta skor değerlerinin A grubunda daha düşük olduğu görüldü.

Tablo 4.5: A/B Grupları Arasında Skor Değerleri Dağılımı

		Alt Grup						Mann Whitney U Testi		
		N	Mean	Median	Min	Max	SS	Sıra Ort.	U	p
Skor	A	18	3.39	4.00	2.00	5.00	1.20	15.97	116.5	0.129
	B	18	3.89	5.00	2.00	5.00	1.37	21.03		
	Toplam	36	3.64	4.00	2.00	5.00	1.29			

A/B grupları arasında skor değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmedi ($p>0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmemekle birlikte A grubunda skor değerlerinin daha düşük olduğu görüldü.

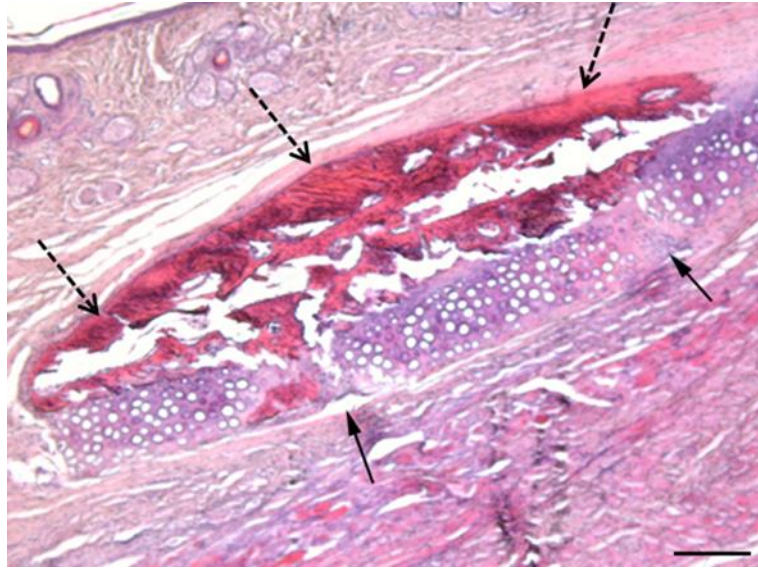
Grupların Histopatolojik Değerlendirmeleri

Tüm gruplar aşağıda tek tek irdelendi. Basım sırasındaki magnifikasyonun yanıltıcı olmaması için tüm patoloji resimlerinin sağ alt köşesine bar eklendi. Her preparattaki bar değeri resmin altında belirtildi.

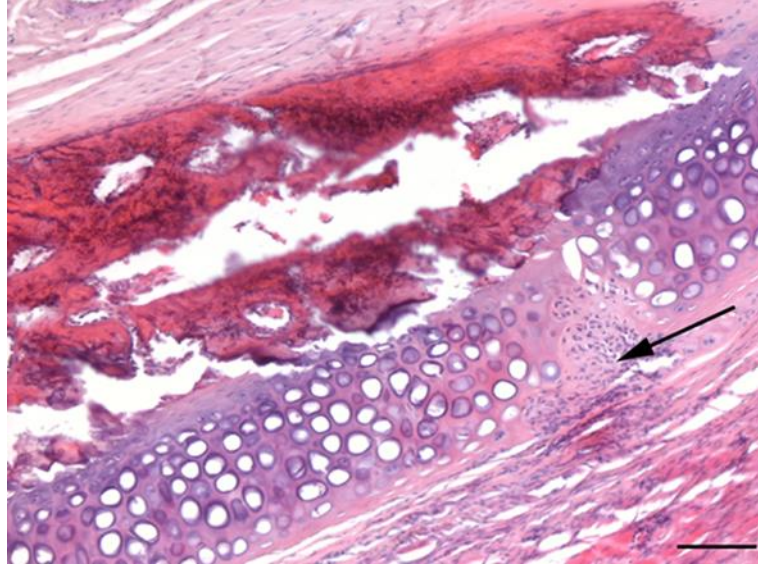
1A (TZP A) grubu: Bu grupta iki kıkırdak parça arasında yeni kıkırdak dokusunun oluşmadığı, bunun yerine hasarlı bölgede asidofilik osteoid doku olduğu gözlemlendi. Osteoid doku içinde oluşan boşlukların çevresini osteoblastların döşediği izlendi (Resim 4.1, Resim 4.3, Resim 4.4). Bazı preparatlarda normal fibröz dokudan farklı, fibröz kıkırdak benzeri yapı gözlemlendi (Resim 4.2, Resim 4.3, Resim 4.4). Bazı kıkırdak keski bölgelerinde ise inflamasyon görülmedi, gevşek bağ dokusu izlendi (Resim 4.5).



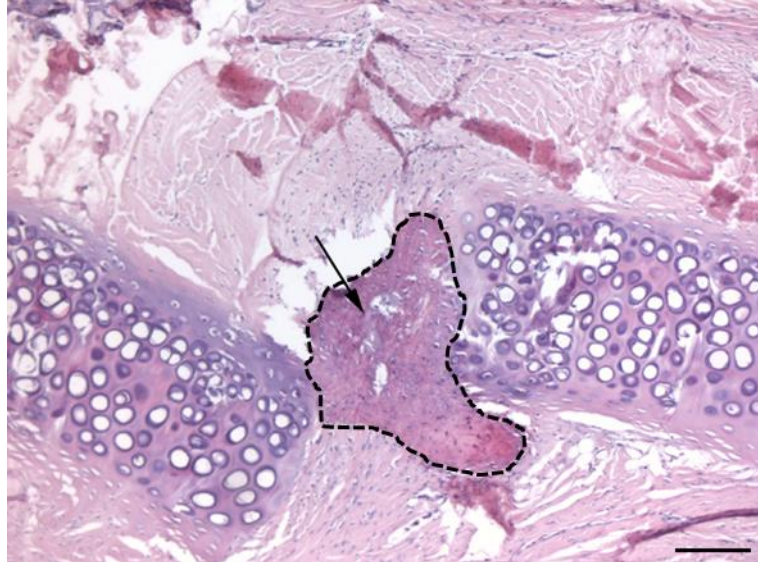
Resim 4. 1: Kıkırdak parçaları arasına yerleşen osteoid benzeri doku izlenmektedir. Osteoid doku arasındaki boşlukları tek sıra osteoblastlar döşemektedir (siyah ok). Osteoid benzeri miksomatöz doku yoğunluğunun kıkırdak uçlarını ayıracak kadar fazla olduğu görülmektedir (kesikli ok). Hematoksilen&Eozin (HE) boyama, bar= 140µm



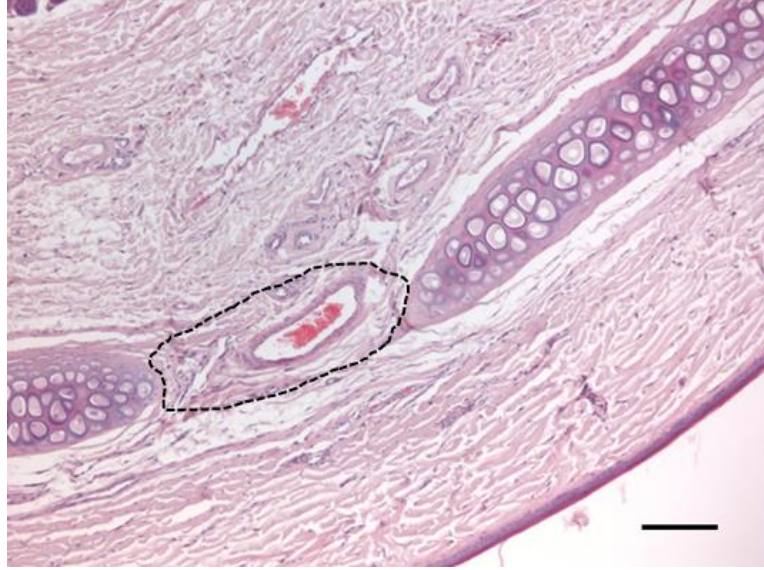
Resim 4.2: Kıkırdak parçası çıkarılmış ve tekrar yerine konulmuş örneklerde kıkırdak kesi alanlarının tam olarak iyileşmediği görülmekte ve kıkırdak hasarları (oklar) izlenmektedir. Diğer taraftan kıkırdak üzerinde asidofilik osteoid doku izlenmektedir (kesikli oklar). HE boyama, bar= 200 µm



Resim 4.3: 10 Kıkırdak hasar bölgesini dolduran hücreden zengin fibröz kıkırdak benzeri yapı izlenmektedir (ok). İyileşmenin tam olmadığı gözlenmektedir. HE boyama, bar= 140 μ m.

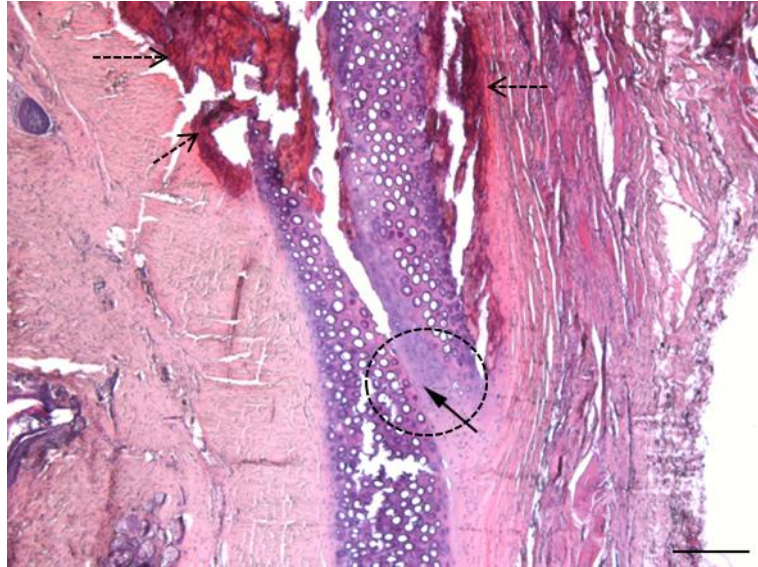


Resim 4.4: İki kıkırdak dokusu arasında oluşan sınırlı doku, (ok) normal fibröz dokudan farklı olarak hem fibröz kıkırdak hem de osteoid dokuyu andırmaktadır. Etrafında bağ dokusu mevcuttur. HE boyama, bar= 140 μ m

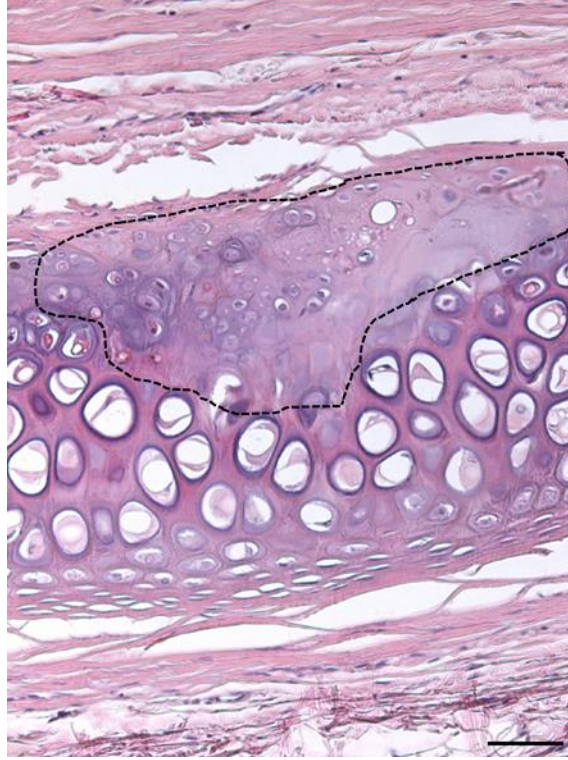


Resim 4.5: Bu preparatta kıkırdak birleşim yerlerinde gevşek bağ dokusu izlenmektedir. İnflamasyon görülmemektedir. HE boyama, bar= 200µm.

2A (TZF A) grubu: Bu grupta hasarlı kıkırdak bölgelerinin çevresinde osteoid doku izlendi (Resim 4.6). Kıkırdak hasarı olan bölgelerde küçülüp fonksiyonlarını yitiren kondrositler gözlemlendi (Resim 4.7).

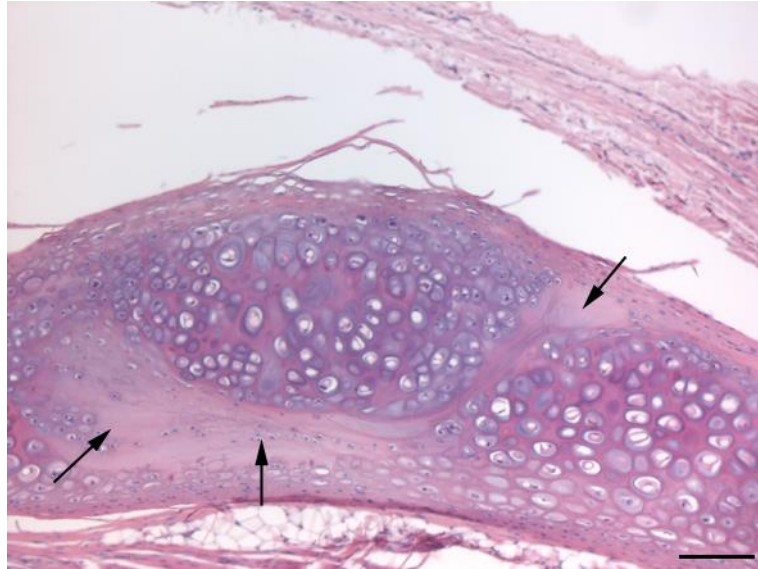


Resim 4.6: Kıkırdak kesi hattında sınırlı kıkırdak yapışması ve tutunma bölgeleri (oklar) görülmektedir. İki dokunun birbirine tutunduğu, füzyon olduğu izlenmektedir. Kıkırdak etrafında osteoid doku görülmektedir (kesikli oklar). HE boyama, bar= 140µm.

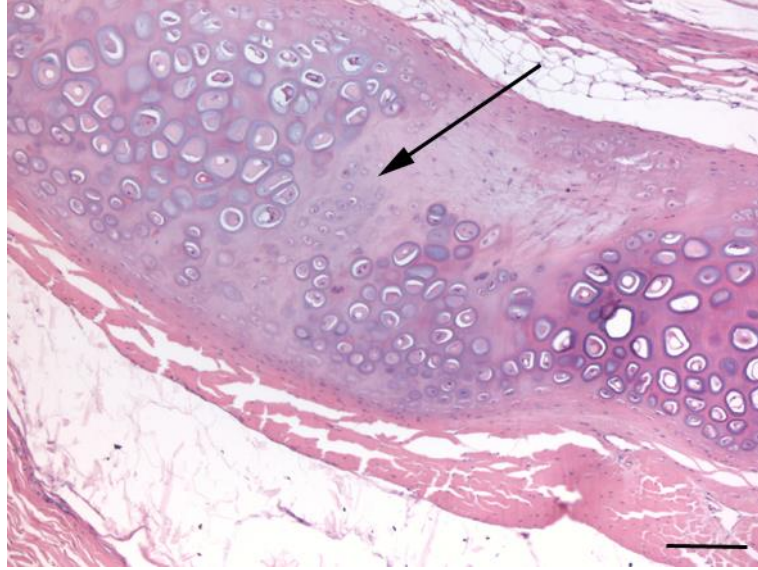


Resim 4.7: Bu preparatta kesi alanlarında kondrosit kaybının belirgin olduğu görülmektedir (kesikli çizgi). HE boyama, bar= 80 μ m.

3A (Kontrol A) grubu: Bu grupta araya konulan kıkırdak parçada doku kaybı olduğu izlendi. Kondrositlerin küçülüp fonksiyonlarını yitirdiği belirlendi ancak araya konulan kıkırdak çevresinde matriks oluşumu ve sınırlı sayıda kondrositler izlendi (Resim 4.8, Resim 4.9).

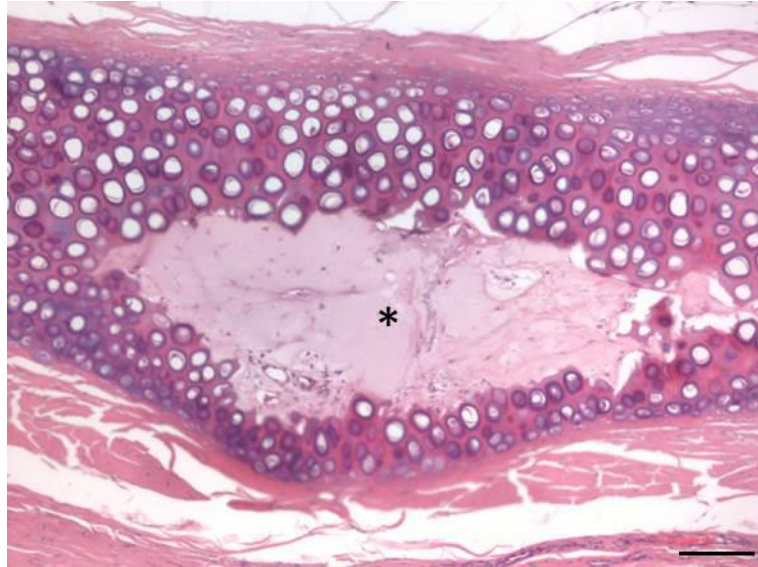


Resim 4.8: Graft kıkırdak ile ana blok kıkırdak arasında matriks oluşumu ve sınırlı sayıda kondrositler görülmektedir (oklar). HE boyama, bar= 140 μ m.

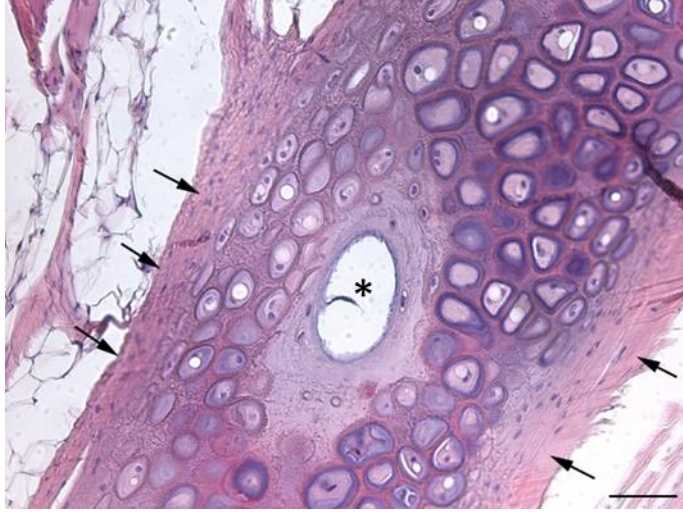


Resim 4.9: Kıkırdak hasarının oluşturulduğu bölgedeki küçük kondrositlerden oluşan hücre grupları izlenmektedir. HE boyama, bar= 140µm.

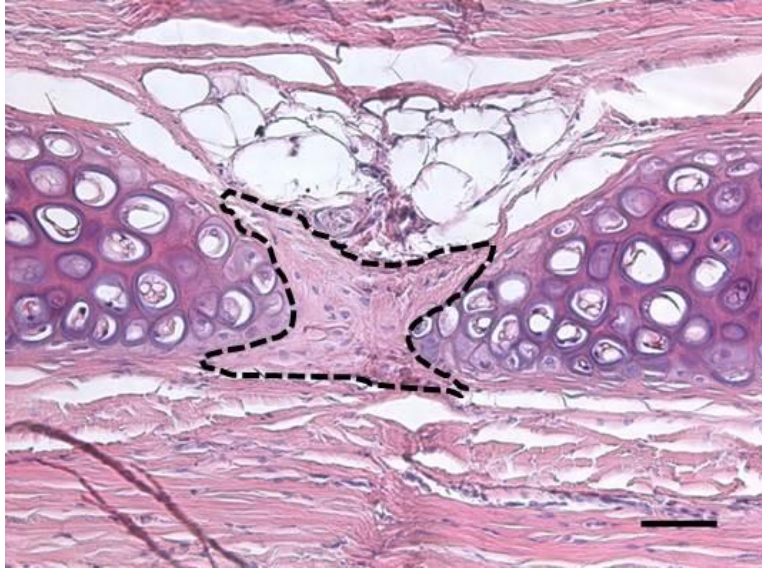
1B (TZP B) grubu: Bu grupta bazı spesimenlerde kıkırdığın çıkarıldığı bölgelerde fibröz kıkırdak benzeri yapı oluştuğu gözlemlendi. Bazı spesimenlerde kondrosit kaybı izlendi (Resim 4.10, Resim 4.11). Bazı spesimenlerde ise kıkırdakların arasını fibröz dokunun doldurduğu tespit edildi (Resim 4.12).



Resim 4.10: Bazı kesit bölgelerinde elastik kıkırdak hipertrofisi, merkezinde kondrosit ve matris kaybı (*) görülmektedir. HE boyama, bar= 140µm.

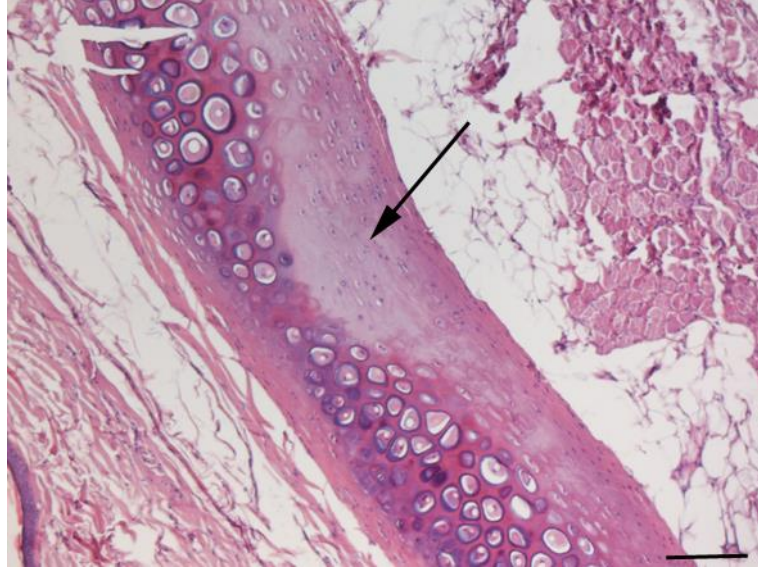


Resim 4.11: Bu preparatta kırıldak kesi bölgelerine komşu bölgelerde kondrosit kaybı yanında genişlemiş lakun (*) görülmektedir. Kesi hattı çevresindeki perikondriyumda kalınlaşma izlenmektedir. HE boyama, bar= 80µm.



Resim 4.12: Bazı vakalarda kesi bölgelerinde fibröz doku gözlemlendi. HE boyama, bar= 80µm

2B (TZF B) grubu: Bu grupta kırıldakta hasar olan bölgede kırıldak hücrelerinin küçülüp fonksiyonlarını kaybettiği gözlemlendi (Resim 4.13).

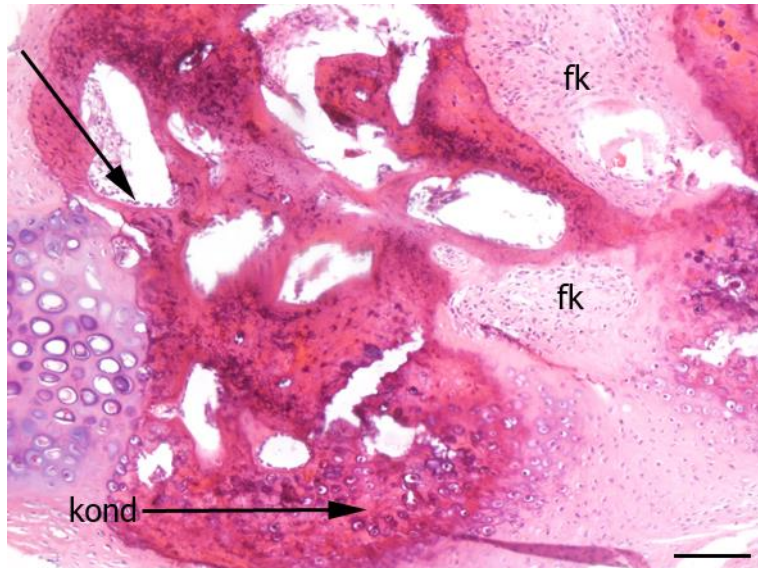


Resim 4.13: Kıkırdak hasarlı bölgelede fonksiyonunu yitirmekte olan kondrositler (ok) izlenmektedir. Bu kesitte kondrosit kaybının belirgin olduğu gözlenmektedir. HE boyama, bar= 140µm.

3B (Kontrol B) grubu: Bu grupta çıkarılan kıkırdak bölgesini asidofilik osteoid doku ve yer yer fibröz ve fibrokıkırdak benzeri dokuların doldurduğu gözlendi. Osteoid dokuda oluşan lakunlar içinde ostesitden daha çok kondrositlere benzeyen hücreler izlendi. En şiddetli reaksiyon bu grupta görüldü. Osteoid dokunun içinde oluşan boşlukların çevresini osteoblastların döşediği gözlendi (Resim 4.14, Resim 4.15), Bazı kesitlerde kesi hatlarında kondrosit kaybı olduğu tespit edildi.



Resim 4.14A: Çıkan kıkırdak bölgesini asidofilik osteoid doku ve yer yer fibröz ve fibrokıkırdak benzeri (fk) dokular doldurmuştur. Osteoid dokunun içinde lakunlar içinde osteositden daha çok kondrositlere benzeyen hücreler tespit edilmiştir. En şiddetli reaksiyon bu grupta izlenmiştir. HE boyama, bar= 200µm.



Resim 4.14B: Daha büyük magnifikasyonda kondrosit benzeri hücreler (kond) fibroz kıkırdak benzeri (fk) doku osteoid dokunun içinde yer yer görülen boşlukları döşeyen osteoblastlar daha iyi izlenmiştir. HE boyama, bar= 140µm

5. TARTIŞMA

Kıkırdak dokusu; başta burun estetik ve fonksiyonel cerrahisi ile kıkırdak greftli timpanoplasti olmak üzere mentoplasti, enoftalmus düzeltilmesi, kranioplasti, göğüs kafesi defektlerinin onarımı ve herniasyonların onarımı gibi birçok operasyonda greft materyali olarak kullanılmaktadır (49). Kıkırdağın kalın ve sağlam yapısı, büyük kulak zarı perforasyonları, retraksiyon poşları, atelektazi ve revizyon timpanoplasti gibi ileri kulak patolojilerinde greft olarak kullanılmasını sağlar (50). Otolog kıkırdak greftlerinin vasküler olmaması yaşam şansını artırır ve kemik greftlere göre rezorpsiyonu daha azdır (51).

Kıkırdak dokusunun, konjenital, travmatik veya cerrahi kaybında, önemli kozmetik ve fonksiyonel bozukluklar ortaya çıkar. Kıkırdak defektlerinin onarımında, değişik yöntemler uygulanmaktadır. Otojen, homolog, heterolog kıkırdak kullanımı, biyomateryallerin kullanımı, perikondrial flep ve greftlerinin kullanımı, sekonder vaskülarize perikondrium fleplerinin kullanımı, bunlardan bazılarıdır. Otojen greftlerin yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaması, alerjik olmaması, kanserojen olmaması gibi birçok avantajı bulunmaktadır (52). Ancak otolog kıkırdak greftlerinde donör dokunun hasarı ve kıkırdak greftin zamanla rezorpsiyonu bu greftin dezavantajıdır. En çok korkulan komplikasyon ise özellikle kosta greftlerinde görülen eğilmedir. Kulak kıkırdağının özellikle yaşlı hastalarda septum kıkırdağına göre daha kırılabilir olması şekil verilmesini zorlaştırır (53).

Kıkırdak greft iyileşmesi ile ilgili çalışmaların büyük kısmı hayvan modellerinde laringotrakeal rekonstrüksiyon ve subglottik stenoz üzerine yoğunlaşmıştır. Nazal septal rekonstrüksiyon için kıkırdak iyileşmesi ile ilgili yeterince yayın bulunmamaktadır. Bu nedenle biz de çalışmamızda da kıkırdak iyileşmesinde otojen greft kullanımında alternatif yöntemler konusunda çalışmayı planladık.

Diğer birçok dokudan farklı olarak kıkırdak dokusunda anaerobik metabolizma gözlenir. Bu yüzden de transplantasyon sırasındaki hipoksik duruma diğer dokulardan daha iyi dayanır (54).

Bizim çalışmamızda da yapılan histomorfolojik değerlendirmede yerine yeniden yerleştirilen tüm kıkırdak greftlerinin canlı olduğu gözlendi.

Verwoerd CDA (55) tarafından yapılan bir çalışmada, perikondriyumun travmaya cevap olarak yüksek miktarlarda, orijinal septal kıkırdaktan farklı morfolojiye ve büyüme potansiyeline sahip kıkırdak geliştirdiği gösterilmiştir. Haberal ve ark. (56) tarafından yapılan bir çalışmada ise perikondriyumun travmaya cevabının sadece yeni kıkırdak oluşumu değil aynı zamanda osifikasyon da olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da histomorfolojik değerlendirmede travmaya cevap olarak fibröz kıkırdak gelişiminin yanı sıra osifikasyon da gözlenmiştir. Haberal ve ark. cerrahi girişim sırasında perikondriyumun altından çalışmanın bu kemik oluşumunu engelleyebileceğini savunmuşlardır ancak bizim çalışmamız göstermiştir ki perikondrium altında çalışılarak kıkırdak dokuya müdahale edilse bile kıkırdak hasar bölgelerinde yüksek miktarlarda kemik doku oluşumu gözlenebilir. Yine de bu sonuca varmadan önce cerrahi sırasında minimal de olsa perikondriyum hasarının oluşabileceği göz ardı edilmemelidir.

Kulak kıkırdağında osifikasyon ilk olarak 1866 yılında Polonyalı anatomist Bochdalek tarafından histopatolojik olarak gösterilmiştir. Daha sonra 1899 yılında Wassmund bir hastada kulak kıkırdağında kemikleşmeyi düz grafide göstermiştir (57). İngilizce literatürde sadece 6 adet kulak kıkırdağında osifikasyon olan vaka gösterilmiştir. Bu vakalarda ise osifikasyonun en sık sebebi soğuğa bağlı travmadır.

Yapılan çalışmalarda, trombositlerin α -granüllerinden bol miktarda, PDGF, TGF- β , IGF, EGF gibi büyüme faktörlerinin salgılandığı bildirilmektedir. Bu büyüme

faktörleri kollajen sentezini arttırmaktadır. Kollajen sentezindeki artışın yumuşak dokuda direnci arttırdığı, kemik dokuda ise kallus oluşumunu başlattığı düşünülmektedir. (45, 58-60). Büyüme faktörlerinden özellikle TGF- β , basic fibroblast growth factor (bFGF) ve bone morphogenic protein (BMP)'in kırıldak iyileşmesinde etkin rol oynadığı kanıtlanmıştır (61).

Birinci kuşak trombosit konsantrasyonu olarak Marks tarafından 1998 yılında tanıtılan TZP, kemik greftlerinin iyileşmesini hızlandırmak için oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılmaktadır (62). Büyüme faktörlerinin klinik uygulaması düşünüldüğünde, TZP otolog büyüme faktörlerinin zengin bir kaynağı olarak düşünülebilir. TZP içeriğinde PDGF, TGF- β , bFGF ve epithelial cell growth factor (ECGF) bulundurur. Otolog olarak kullanıldığı için de bulaşıcı hastalık riski taşımamaktadır. Ayrıca, TZP tam kandan cerrahi sırasında iki basamaklı santrifüj ile kolayca elde edilebilir (61).

Sun ve ark. (61) 28 adet tavşanda her femoropatellar olukta 48 osteokondral defekt oluşturarak yaptıkları bir çalışmada, bir grupta oluşturulan defekt polilaktik-glikolik asit ile muamele edilmiş, diğer grupta ise polilaktik-glikolik asitin içine TZP de eklenerek elde edilen karışımla defekt onarılmıştır. Çalışma 4-12 hafta sonunda sonlandırılmış, makroskopik inceleme, mikro bilgisayarlı tomografi ve histolojik değerlendirme sonucunda, TZP'nin polilaktik-glikolik asit ile birlikte kullanıldığında geniş defektlerin onarımında etkili olduğu gösterilmiştir.

Ehrenfest ve ark. (63) trombosit konsantrasyonlarını lökosit ve fibrin içeriklerine göre dört kategoride sınıflandırmıştır: saf TZP (hücre ayırıcı TZP, Vivostat TZF yada Anitua'nın trombositten zengin büyüme faktörleri); lökosit ve trombositten zengin plazma (Curasan, Regen, Plateltex, SmartPREP, Platelet Concentrate Collection System, Magellan yada Gravitational Platelet Separation System); saf TZF (Fibrinet);

lökosit ve trombosit zengin fibrin (Choukron'un TZF). Bu protokollerin içerisinde Chokroun'un TZF'i en son geliştirilmiş olanıdır. Burada kan antikoagülan içermeyen bir tüpe alınır ve hemen santrifüj edilir. Doğal koagülasyon yolağı aktive olduğu için bu yöntemde antikoagülan, trombin ya da kalsiyum klorid kullanımına ihtiyaç yoktur. Bu sistem şimdiye kadar geliştirilmiş en kolay, en ucuz lökosit ve trombosit zengin fibrin elde etme yöntemidir.

Saf TZP, ilk olarak klasik trombosit transfüzyon süspanسیونlarının topikal kullanımını olarak maksillofasiyal cerrahide kullanılmıştır. Saf TZP elde etme yöntemlerinden biri plazmaferez olarak adlandırılır ve hasta işlem sırasında hücre ayırıcı makineye bağlı kalır. Bu yöntem ileri teknoloji kullansa da işlem sırasında bir hematoloğa ihtiyaç duyulur ve kullanışsızdır. Ayrıca elde edilen plazma içinde mutlaka eser miktarda eritrosit kalır (63).

Lökosit ve trombosit zengin plazma üretiminin asıl amacı, bir transfüzyon laboratuvarına ihtiyaç duymadan trombosit konsantrasyonlarını günlük kullanım için hazırlayabilmektir. Bir hücre ayırıcı olmadan lökositleri hazırlanan plazmadan elimine etmek çok zordur. Bu yüzden de hazırlanan trombosit konsantrasyonlarının içinde yüksek dozda lökosit de bulunmaktadır. Birbirine benzer iki protokol olan Curasan (Kleinostheim, Almanya) ve Friadent-Schütze (Viyana, Avusturya) iki basamaklı santrifüj sistemi kullanmaktadır. Elde edilen konsantre, sığır trombinini ya da kalsiyum klorid ile birlikte uygulanır. Plateltex (Bratislava, Slovakya) protokolü jelleşme için kalsiyum glukonat ve liyofilize saflaştırılmış batroxobin gibi özel ajanlar kullanır. Regen (Regen Laboratuvarı, Mollens, İsviçre) metodu santrifüj tüpleri içinde trombosit ve lökositleri ayırmak için bir jel bulundurur. Bu protokollerle elde edilen konsantrelerde lökositler ve trombositler parçalanmaz ve korunur (63, 64).

Saf TZF elde etmek için tek yöntem Fibrinet (Cascade Medical, New Jersey, USA) sistemidir. Bu yöntem antikoagülan ve hücre ayırıcı jel içerdiği için Choukroun sistemi kadar doğal değildir ve etkinliği üzerine yeterince çalışma yoktur (63).

Lökosit ve trombosit zengin fibrin elde etmenin tek yöntemi olan Choukroun prosedürü son derece basit ve ucuz bir tekniktir. Antikoagülan içermediğinden trombosit aktivasyonu ve fibrin polimerizasyonu hızla tetiklenir. İki gazlı bez arasında sıkıştırılan fibrin jel, güçlü bir membran haline gelir. TZP'nin aksine Choukroun'nun TZF'i tıpkı bir pıhtı gibi geç çözünür. Trombositler aktive olduğu için de jel içinde yüksek miktarda büyüme faktörlerini barındırır (63).

Biz de kendi çalışmamızda uygulama kolaylığı sağladığı için TZP elde etmek amacıyla Regen Kit, TZF elde etmek amacıyla da Choukroun sistemini kullandık.

Literatürde TZP ve TZF'nin kırık üzerine etkilerini inceleyen çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Petrera ve ark. (65) tarafından yapılan bir çalışmada sığırların metakarpofalangeal eklemlerinden izole edilen kondrositler ile doku kültürü hazırlanmıştır. Doku kültürleri fetal sığır serumu ve TZP ile desteklenmiştir. Bu elde edilen iki doku kültürünün karşılaştırılmasında, TZP ile desteklenen kültürlerinde daha fazla miktarda kırık dokusu elde edildiği gözlenmiştir.

Van Bergen ve ark. (66) tarafından yapılan bir çalışmada 16 adet yetişkin keçinin taluslarına osteokondral defektler yapılmıştır. Denekler randomize olarak ikiye bölünmüş, 4 deneğin osteokondral defektine salin ile karıştırılmış otolog demineralize kemik matriksi uygulanmış, 4 deneğe ise TZP ile karıştırılmış demineralize kemik matriksi uygulanmıştır. Geriye kalan 8 denek ise kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Yapılan analizler sonucunda gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır ve TZP'nin osteokondral defektlerin iyileşmesinde katkı sağlamadığı sonucuna varılmıştır.

Yin ve ark. (67) tarafından yapılan bir çalışmada domuzdan elde edilen kondrositler agaroz jel ve TZP ile zenginleştirilmiş agaroz jele ekilmiştir. 28 günlük kültür sonucunda agaroz jel ile kıyaslandığında TZP'nin kondrosit bölünmesi ve farklılaşmasında pozitif etkileri olduğu bulunmuştur.

Serra ve ark. (68) 36 adet Yeni Zellanda tavşanı üzerinde yaptıkları çalışmada tavşanları üç gruba ayırmış ve ilk iki gruptaki 24 adet tavşanın medial femoral kondillerini dril ile delerek tam kat kırık hasarı oluşturmuşlardır. Geriye kalan 12 adet tavşanda lezyon oluşturulmamış ve bu grup kontrol grubu olarak alınmıştır. İlk gruptaki 12 adet tavşanda oluşturulan tam kat kırık hasarı serum fizyolojik ile muamele edilmiştir. İkinci gruptaki 12 adet tavşanda oluşturulan kırık hasarı ise TZP ile muamele edilmiştir. Her üç grup da ikişer alt gruba ayrılmış ve ilk alt gruplar 16. haftada, ikinci alt gruplar ise 19. haftada sakrifiye edilmiştir. Bu çalışmada 16. haftada TZP grubunda elde edilen sonuçların serum fizyolojik uygulanan gruba göre daha iyi olduğu görülmüştür ancak 19. haftada her iki grubun da birbirlerine üstünlüğü olmadığı görülmüştür.

Bizim çalışmamızda ise TZP grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır ve trombositten zengin plazmanın kırık iyileşmesi üzerine pozitif etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde TZF'nin kırık üzerine etkileri ile ilgili sadece iki adet yayın bulunmaktadır. Bunlardan ilki Chien ve ark. (69) tarafından doku kültüründe yapılan çalışmadır ve TZF içeren kültürlerdeki hücre çoğalmasının daha umut verici olduğu belirtilmiştir.

Diğer yayın ise, Tzonk-Fu ve ark. (70) tarafından 12 adet Yeni Zellanda tavşanı üzerinde yapılan çalışmadır. Bu çalışmada tavşanlar iki gruba ayrılmıştır. İlk grupta hayvanların dizlerinde kırık hasarı oluşturulmuş ve tedavi edilmeden bırakılmıştır.

İkinci grupta ise oluşturulan kıkırdak defektine TZF ile karıştırılmış kıkırdak granülleri uygulanmıştır. Bu çalışmada kıkırdak iyileşmesinin 3 ayda tamamlandığı gözlenmiştir ve TZF uygulanan gruptaki iyileşmenin diğer gruba göre daha iyi olduğu bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda ise yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak ne TZP'nin ne de TZF'nin kıkırdak iyileşmesi üzerinde pozitif bir etkisi gözlenmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda bu konuda yeni gelişmeler kaydedileceğini düşünmekteyiz. Rutin klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için bu alanda daha çok yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. Kıkırdak iyileşmesinde, yaygın hasara uğramış bölgelerde ve -seyrek de olsa küçük bölgelerde yeni kıkırdak dokusu yerine tıkHz bağ dokusundan oluşun nedbe dokusu görülür. Bu nedenle skar dokusunu azaltabilmek için cerrahi esnasında kıkırdak dokusundan minimal rezeksiyon yapılmalıdır.
2. TZP'nin kıkırdak doku iyileşmesi üzerine bir etkisi olmadığı görüldüğünden uygulanması fayda sağlamayacaktır.
3. TZF'nin kıkırdak doku iyileşmesi üzerine bir etkisi olmadığı görüldüğünden uygulanması fayda sağlamayacaktır.
4. TZP ve TZF'nin kıkırdak iyileşmesinde rutin klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için bu alanda yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. İleride yapılacak çalışmalarda bu konuda yeni gelişmeler kaydedilebileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. AKAY MT (1999) Genel Histoloji. Palme Yayıncılık. 4. Baskı. Ankara, 15-20.
2. EŞREFOĞLU M (2009) Genel Histoloji. Medipres Yayıncılık Malatya, 121-123.
3. ÖZGENTAŞ HE, EROL ÖO, GÜRSU-HAZARLI GG (1982-1983) Sekonder arteriyel perikondrial fleplerde kıkırdak rejenerasyonu. *Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi*; 79, 4-5.
4. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J (2009) Temel histoloji Text&Atlas. Nobel Tıp Kitabevi İstanbul 128.
5. ROSS MH, PAWLINA W (2011) Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. 6th ed. Philadelphia. 198-216.
6. KIERSZENBAUM AL (2006) Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Palme, Ankara, 113-119.
7. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, KELLEY RO (1998) Temel histoloji. Barış kitabevi/ Appleton&Lange. 8th ed. İstanbul, 127-128.
8. LEESON TS, LEESON CR (eds) (1981) Specialized connective tissue. Histology. W.B. Saunders Company. 4th edition. Philadelphia. 137-61.
9. STEVENS A, LOWE J (eds) (1992) Support cells and axtracellular matrix. Histology. London: Gower Medical Publishers. 42-56.
10. MEYER U, WIESMANN HP (2010) Bone and cartilage engineering. Springer-Verlag Berlin. 33-34.
11. STANDRING S (2008) Gray's Anatomy. Elsevier. 48th ed. İspanya. 132-133
12. OHLSEN L (1976) Cartilage formation from free perichondrial grafts: an experimental study in rabbits, *Br J Plast Surg.*; 29, 262-7.

13. HOMMINGA GN, BULSTRA SK, KUIJER R, LINDEN AJV (1991) Repair of sheep articular cartilage defects with a rabbit costal perichondrial graft. *Acta Orthop Scand.*; 62, 415-8.
14. OHLSEN L (1978) Cartilage regeneration from perichondrium: experimental and clinical applications. *Br J Plast Surg.*; 62, 507-13.
15. GULTAN SM, EMIROGLU M, CENETOGLU IS, YORMUK E (1993) Effects of free perichondrial graft replacement of epiphyseal cartilage on bone growth. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.*; 27, 1-8.
16. LESTER CW (1959) Tissue replacement after subperichondrial resection of costal cartilage. Two case reports. *Plast Reconst Surg*; 23,49.
17. OHLSEN L, SKOOG T, SOHN SA (1975) The pathogenesis of cauliflower ear. *Scand J Plast Reconstr Surg.*;9, 34.
18. SKOOG T, OHLSEN L, SOHN SA (1972) Perichondrial potential for cartilaginous regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surgery*; 6,123.
19. STUCKER FJ (1977) Cartilage regeneration: a clinical and experimental study. *Trans Sect Otolaryngol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*; 84, 785-90.
20. SILVER FH, GLASGOLD AI (1995) Cartilage wound healing: an overview. *Otolaryngol Clin North Am.*; 28, 847-64.
21. PROCKOP DJ, WILLIAMS CJ, VANDENBERG P (1993) Collagen in normal and diseased connective tissue. McCarthy DJ, Koopman WJ (eds). *Arthritis*. Lea and Febiger. Philadelphia; 213-28
22. BORNSTEIN P (1980) Structurally distinct collagen types. *Ann Rev Biochem*; 49, 958.
23. RENDU F, BROHARD-BOHN B (2001) The platelet release reaction, granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12(5), 261-73.

24. HSU C, CHANG J (2004) Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg [Am]*, 29(4), 551-63.
25. ROBSON MC, PHILLIPS LG, THOMASON A, ALTROCK BW, PENCE PC, HEGGERS JP, et al (1992) Recombinant human platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Ann Plast Surg*; 29(3), 193-201.
26. WIEMAN TJ, SMIELL JM, SU Y (1998) Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care*; 21(5), 822-7.
27. BENNETT NT, SCHULTZ GS (1993) Growth factors and wound healing, biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg*.; 165(6), 728-37.
28. STEED DL (1998) Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg*; 25(3), 397-405.
29. CORRAL CJ, SIDDIQUI A, WU L, FARRELL CL, LYONS D, MUSTOE TA (1999) Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg*.; 134(2), 200-5.
30. WHITMAN DH, BERRY RL, GREEN DM (1997) Platelet gel, an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*; 55(11), 1294-9.
31. MARX RE, CARLSON ER, EICHSTAEDT RM, SCHIMMELE SR, STRAUSS JE, GEORGEFF KR (1998) Platelet-rich plasma, growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; 85(6), 638-46.

32. SIEBRECHT MA, DE ROOIJ PP, ARM DM, OLSSON ML, ASPENBERG P (2002). Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite. *Orthopedics*; 25(2), 169-72.
33. MAIORANA C, SOMMARIVA L, BRIVIO P, SIGURTA D, SANTORO F (2003) Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma, preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent.*; 23(3), 227-35.
34. LOWERY GL, KULKARNI S, PENNISI AE (1999) Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone*; 25(2 Suppl), 47S-50S.
35. GEHRING S, HOERAUF H, LAQUA H, KIRCHNER H, KLUTER H (1999) Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*; 39(2), 144-8.
36. JACKSON RF (2003) Using platelet rich plasma to promote healing and prevent seroma formation in abdominoplasty procedures. *Am J Cosm Surg.*; 20(4), 185-95.
37. MAN D, PLOSKER H, WINLAND-BROWN JE (2001) The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.*; 107(1), 229-37.
38. BRISSETT AE, HOM DB (2003) The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.*; 11(4), 245-50.
39. MAZZUCCO L, MEDICI D, SERRA M, PANIZZA R, RIVARA G, ORECCHIA S, LIBENER R, CATTANA E, LEVIS A, BETTA PG, BORZINI P (2004) The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds, a pilot study. *Transfusion*; 44(7), 1013-8.

40. DUBUISSON AS, BEUERMANN RW, KLINE DG (1993) Sciatic nerve regeneration across gaps within collagen chambers, the influence of epidermal growth factor. *J Reconstr Microsurg*; 9(5), 341-6.
41. ASPENBERG P, VIRCHENKO O (2004) Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.*; 75(1), 93-9.
42. ANITUA E, ANDIA I, SANCHEZ M, AZOFRA J, DEL MAR ZALDUENDO M, DE LA FUENTE M, NURDEN P, NURDEN AT (2005) Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.*; 23(2), 281-6.
43. DOHAN DM, CHOUKROUN J, DISS A, DOHAN SL, DOHAN AJJ, MOUHYI J, GOGLY B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; 101,E37-44.
44. KOÇYIĞIT İD, TUNALI M, ÖZDEMİR H, KARTAL Y, SÜER BT (2012) İkinci nesil trombosit konsantrasyonunun klinik uygulamaları. *Cumhuriyet Dent J*; 15, 279-87.
45. LING H, LIN Y, HU X, ZHANG Y, WU H (2009) A comparative study of platelet rich fibrin and platelet rich plasma on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblast in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; 108,707-713.
46. DOHAN DM, CHOUKROUN J, DISS A, DOHAN SL, DOHAN AJJ, MOUHYI J, GOGLY B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*; 101: E45-50.

47. DOHAN DM, CHOUKROUN J, DISS A, DOHAN SL, DOHAN AJJ, MOUHAYI J, GOGLY B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates?, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*; 101: E51-55.
48. CHOUKROUN J, DISS A, SIMONPIERI A, GIRARD MO, SCHOEFFLER C, DOHAN SL, DOHAN AJJ, MOUHAYI J, DOHAN DM (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*; 101: E56-60.
49. TURHAN-HAKTANIR N, UYSAL OA, HAKTANIR A, YILDIZ L (2005) Radiologic and histologic assessment of diced cartilage grafts for cranial bone defects of rabbits: an experimental study. *Aesthetic Plast Surg*; 29(3),195-201.
50. DÜNDAR R, SOY FK, KULDUK E, MULUK NB, CINGI C (2013) A new grafting technique for tympanoplasty: tympanoplasty with a boomerang-shaped chondroperichondrial graft (TwBSCPG). *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 2013 Oct 16. [Epub ahead of print]
51. KANSU L, AKMAN H, UCKAN S (2010) Closure of oroantral fistula with the septal cartilage graft. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 267(11), 1805-6.
52. ISLAMOGLU K, DIKICI MB, ÖZGENTAS HE (2006) Permanence of Diced Cartilage, Bone Dust and Diced Cartilage/Bone Dust Mixture in Experimental Design in Twelve Weeks. *The Journal of Craniofacial Surgery*; Volume 17(5), 905-8.
53. IMMERMANN S, WHITE WM, CONSTANTINIDES M (2011) Cartilage grafting in nasal reconstruction *Facial Plast Surg Clin North Am*; 19(1): 175-82.
54. MURRAY JAM (1987) The behavior of nasal septal cartilage in response to trauma. *Rhinology*; 25:23-27

55. VERWOERD CD, VERWOERD-VERHOEF HL, MEEUWIS CA, VAN DER HEULRO (1991) Wound healing of autologous implants in the nasal septal cartilage. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*; 53(5), 310-4.
56. HABERAL CI, ATILLA P, CAKAR AN, ONERCI M (2008) An animal study on cartilage healing using auricular cartilage as a model. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 265(3), 307-11.
57. Kim SY, Hong DK, Im M, Lee Y, Lee JH, Seo YJ (2011), A case of auricular ossification. *Ann Dermatol*; 23(Suppl 2), 261-3.
58. Deutman KHC, Vehof JWM, Spauwen PHM, Stoelinga PJW, Jansen JA, Orthotopic bone formation in titanium fiber mesh loaded with platelet rich plasma and placed in segmental defects. *Int J. Oral Maxillofac. Surg*; 37, 542-9.
59. HSU CW, YUAN K, TSENG CC (2009) The negative effect of platelet rich plasma on the growth of human cells is associated with secreted thrombospondin-1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 107(2), 185-92.
60. SHEN YX, FAN ZH, ZHAO JG, ZHANG P (2009) The application of platelet rich plasma may be a novel treatment for central nervous system diseases. *Med Hypotheses*; 73(6):1038-40.
61. SUN Y, FENG Y, ZHANG CQ, CHEN SB, CHENG XG (2010) The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop*.; 34(4), 589-97.
62. CHOI BH, ZHU SJ, KIM BY, HUHBY JY, LEE SH, JUNG JH (2005) Effect of platelet rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*.; 34(4), 420-4.

63. DOHAN EHRENFEST DM, RASMUSSEN L, ALBREKTSSON T (2009) Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.*; 27(3), 158-67.
64. MAZZUCCO L, BALBO V, CATTANA E, BORZINI P (2008) Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *Von Sang; Von Sang*; 94(3), 202-8.
65. PETRERA M, DE CROOS JN, IU J, HURTIG M, KANDEL RA, THEODOROPOULOS JS (2013) Supplementation with platelet-rich plasma improves the in vitro formation of tissue-engineered cartilage with enhanced mechanical properties. *Arthroscopy*; 29(10); 1685-92.
66. VAN BERGEN CJ, KERKHOFFS GM, OZDEMIR M, KORSTJENS CM, EVERTS V, VAN RUIJVEN LJ, VAN DIJK CN, BLANKEVOORT L (2013) Demineralized bone matrix and platelet-rich plasma do not improve healing of osteochondral defects of the talus: an experimental goat study. *Osteoarthritis Cartilage*; 21(11), 1746-54.
67. YIN Z, YANG X, JIANG Y, XING L, XU Y, LU Y, DING P, MA J, XU Y, GUI J (2013) Platelet-rich plasma combined with agarose as a bioactive scaffold to enhance cartilage repair: An in vitro study. *J Biomater Appl.* 2013 Jul 3. [Epub ahead of print]
68. SERRA CI, SOLER C, CARILLO JM, SOPENA JJ, REDONDO JI, CUGAT R (2013) Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness articular defects in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*; 21(8), 1730-6.
69. CHIEN CS, HO HO, LIANG YC, KO PH, SHEU MT, CHEN CH (2012) Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*; 100(4):948-55.

70. KUO TF, LIN MF, LIN YH, LIN YC, SU RJ, LIN HW, CHAN WP (2011)
Implantation of platelet-rich fibrin and cartilage granules facilitates cartilage repair in
the injured rabbit knee: preliminary report. *Clinics (Sao Paulo)*; 66(10), 1835-8.

EK 1. Veriler

GRUPLAR	ALT GRUPLAR		SONUÇ
1	A	1-A-1	4
		1-A-2	5
		1-A-3	4
		1-A-4	4
		1-A-5	4
		1-A-6	2
1	B	1-B-1	5
		1-B-2	2
		1-B-3	5
		1-B-4	4
		1-B-5	5
		1-B-6	2
2	A	2-A-1	2
		2-A-2	5
		2-A-3	4
		2-A-4	2
		2-A-5	4
		2-A-6	2
2	B	2-B-1	5
		2-B-2	2
		2-B-3	5
		2-B-4	5
		2-B-5	3
		2-B-6	2
3	A	3-A-1	4
		3-A-2	2
		3-A-3	2
		3-A-4	2
		3-A-5	4
		3-A-6	5
3	B	3-B-1	5
		3-B-2	3
		3-B-3	5
		3-B-4	5
		3-B-5	2
		3-B-6	5