

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN KONTÜZYONEL KAS
YARALANMASINDA TROMBOSİTTEN ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
PLAZMA (TZP) UYGULAMASININ İYİLEŞME ÜZERİNE
ETKİSİ**

Dr. Canan GÖNEN AYDIN

**SPOR HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Metin Lütfi BAYDAR

**“Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 2091-D-10 proje no.su ile desteklenmiştir”**

ISPARTA - 2010

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında büyük katkıları olan, fikir aşamasından itibaren her basamakta faydalandığım, ayrıca bu çalışmayı gerçekleştirme fırsatı vererek akademik hayata ilk adımımı atmamı sağlayan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Metin Lütü Baydar'a

Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Cem Çetin ve anabilim dalımızın diğer üyeleri Doç. Dr. Hilmi Karatosun, Yrd. Doç. Dr. Ali Erdoğan'a ve eğitim dönemimde bilgilerimi benden esirgemeyen Ortopedi Anabilim Dalından; Doç. Dr. Yakup Barboros Baykal, Yrd. Doç. Dr. Tolga Atay, Yrd. Doç. Dr. Halil Burç'a

Tezime maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne

Çalışmanın gerçekleştirildiği Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Merkezinin tüm çalışanlarına,

Trombositten zengin plazma hazırlanması aşamasında Diş Hekimliği Fakültesinin olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Yeşim Kırzioğlu'na

Histopatolojik değerlendirmelere ışık tutan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. İbrahim Metin Çiriş'e

İstatistiksel incelemelerdeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Ersin Uskun'a

Tezimin literatür çevirilerinde desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Tuçe Çimen'e

Asistanlık süresinde birlikte zaman geçirdiğim asistan arkadaşlarıma,

Bu güne gelmemde en büyük paya sahip olan sevgili anne ve babama,

Ve çalışmalarım sırasında sabır ve anlayışıyla bana destek olan, hayattaki en iyi arkadaşım sevgili eşim Harun Aydın'a

Sonsuz sevgi ve saygılarımla teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kas ve Çevresindeki Bağ Dokusunun Yapısı.....	2
2.2. Kasın Büyüme ve Gelişimi.....	4
2.3. İskelet Kası Hasarının Mekanizması.....	5
2.4. Kas Hasarının Patolojisi	6
2.4.1. Destrüksiyon Fazı	7
2.4.2. Tamir ve Remodeling Fazı	9
2.5. Kas Hasarlarının Sınıflaması.....	14
2.6. Kas Hasarının Tanısı	14
2.7. Kas Yaralanmalarında Tedavi Prensipleri.....	16
2.8. Trombosit	17
2.8.1. Trombosit Aktiviteleri	20
2.8.2. Yara İyileşmesinde Trombositlerin Yeri	21
2.9. TZIP'nin Tarihçesi.....	24
2.9.1. TZIP'nin Avantajları.....	26
2.9.2. TZIP'nin Kontrendikasyonları	27
2.10. TZIP'nin Etki Mekanizması	27
2.11. TZIP'nin Elde Edilmesi	28
2.12. TZIP'nin Saklanma ve Etki Süresi	30
2.13. Doku İyileşmesi ve Sitokinler	31
2.14. Trombositteki Büyüme Faktörleri	32
2.14.1. PDGF (Platelet derived growth factor) Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü.....	33
2.14.2. CTGF (Connective tissue growth factor) Bağ Doku Büyüme Faktör	33

2.14.3. TGF- β (Transforming growth factor-beta) “Transforming” büyüme faktör- β	34
2.14.4. PDEGF (Platelet-Derived Epidermal Growth Factor=Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü).....	36
2.14.5. PDAF (Platelet-derived Angiogenesis Factor =Trombosit Kaynaklı Anjiogenezis Faktör)	36
2.14.6. VEGF Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular endothelial growth factor)	37
2.14.7. IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I=İnsülin benzeri büyüme faktörü) .	37
2.14.8. FGF-1 ve FGF-2 Fibroblast Büyüme Faktörü 1 ve 2 (Fibroblast growth factor)	38
2.14.9. PF-4 (Platelet Factor 4=Trombosit faktör 4)	39
2.15. TZP'nin Kullanım Alanları	39
3. MATERİYAL ve METOD	43
3.1. Standart Hazırlık.....	43
3.2. Deneyin Yapılışı.....	43
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	47
3.4. TZP'nin Elde Edilmesi	47
3.5. Yöntemin Değerlendirilmesi	49
3.5.1. Histopatolojik Değerlendirme	49
3.5.2. İstatistiksel Değerlendirme	52
4. BULGULAR	54
5. TARTIŞMA	58
ÖZET.....	69
SUMMARY	70
KAYNAKLAR	71

KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
BF	: Büyüme Faktörleri
BMP	: Bone morphogenic protein
Ca+2	: Kalsiyum
CTGF	: Connective tissue growth factor
ECGF	: Epithelial Cell Growth Factor
ECM	: Extracellular Matrix
EGF	: Endothelial Growth Factor
FDA	: Food and Drugs Administration
FGF	: Fibroblast Growth Factor
HGF	: Hepatocyte Growth Factor
IGF	: Insulin-like Growth Factor
IL	: İnterleukin
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MR	: Magnetic Resonans
MSC	: Mesenchymal Stem Cells
MTJ	: Myotendinous junctions
NSAİİ	: Nonsteroid Antiinflatuar İlaç
PCSS	: Platelet Concentrate Collection System
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PF	: Platelet Factor
PRGF	: Plasminogen relate growth factor
PRGF	: Platelet Rich-in-Growth Factors
SR	: Sarkoplazmik Retikulum
TFP	: Trombosit Fakir Plazma
TGF-β	: Transforming Growth Factor-β
TKBF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TZP	: Trombosit Zenginleştirilmiş Plazma
USG	: Ultrason
WADA	: World Anti-doping Agency

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Kas yaralanması sınıflaması	14
Tablo 2. Trombosit granüllerinin içerikleri.....	20
Tablo 3. Grupların tanımlayıcı özellikleri.....	54
Tablo 4. Bağımlı değişkenlerin nekroz sonuçları	54
Tablo 5. Bağımlı değişkenlerin fibrozis sonuçları	55
Tablo 6. Bağımlı değişkenlerin distrofik kalsifikasyon sonuçları	56
Tablo 7. Bağımlı değişkenlerin distrofik kalsifikasyon sonuçları	57
Tablo 8. Farklı yöntemlerle elde edilen TZP'lerdeki BF miktarlarının karşılaştırması	61
Tablo 9. Trombositten zengin plazmanın spor hekimliğinde kullanımı için klinik kanıt.....	66
Tablo 10. TZP ile yapılan hayvan çalışmaları	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İskelet kası yapısı.....	3
Şekil 2. İnflamasyonun günlük ilerleyişi	7
Şekil 3. Satellit hücreyi etkileyen faktörler.....	11
Şekil 4. Aktive trombosit yapısı.....	17
Şekil 5. Trombosit elektron mikroskopik fotoğrafı.....	18
Şekil 6. İnflamasyon sırasında hücrelerin ortaya çıkış sırası	22
Şekil 7. TZBF inflamasyon basamaklarındaki etkileri	23
Şekil 8. Trombosit santirfüjü.	30
Şekil 9. 26 numarada Gracilis kası görülmektedir	45

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Travma cihazı	44
Resim 2. 12 cm demir ağırlık.....	44
Resim 3. Ağırlığın düşeceği alanı belirleme	45
Resim 4. Ağırlığın düşürülmesi	46
Resim 5. İnflamasyon hücrelerini, atrofi, ödem görülmektedir. Siyah okla parçalanmış kasları görmekteyiz.....	46
Resim 6. Tavşanın kulağından kan alınması.....	47
Resim 7. Heraeus Labofuge santrifüj cihazı	48
Resim 8. İlk santrifüjden sonra TZP ve TFP.....	48
Resim 9. Curasan kit	49
Resim 10. Tavşan arka bacağı.....	50
Resim 11. Kasete yerleştirilen travmalı kas.....	50
Resim 12. Kasın kenarları boyunca başlayan nekroz derinde bant tarzı yüzeye doğru şimşek şeklinde düzensiz sınırları olan travma etkisi görülmekte HE	51
Resim 13. Distrofik kalsifikasyonlar HE boyası ile siyah renkte görünmektedir.....	51
Resim 14. Yoğun kollajen lifleri, koyu mavi renkte görülmektedir	51
Resim 15. Az miktarda kollajen lifleri açık mavi renkte görülmektedir	52
Resim 16. Kollajen neredeyse hiç görülmemekte.....	52

1. GİRİŞ

Kas yaralanmaları spor hekimliğinin önemli ve çok sık karşılaşılan problemlerinden biridir. Kastaki iyileşme mekanizmaları ve tedavi basamakları için kabul edilmiş bir sınıflama henüz yoktur.

Sporcuların yoğun antrenman dönemlerinde yaralanmaları artmaktadır. Yoğun antrenman sporcuyu fiziksel ve psikolojik olarak yıpratır ve hazır olmadan karşılaşmalara çıkar. Sakatlıklar kronikleşmeye başlar. Meydana gelen bu yaralanmalarda inflamasyon sürecini kısaltarak antrenmanlara dönüşü hızlandıracak tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da Spor Hekimleri için çözümlenmesi gereken önemli bir problem olmaktadır.

Son yıllarda yeni tedavi yöntemleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan bazıları; gen tedavisi, kas kökenli kök hücre transferi, hiperbarik oksijen tedavisi, dekstrozla proloterapi ve trombosit zengin plazmadır. Kas ve tendon yaralanmaları ve dejenerasyonlarının tedavilerinde TZP enjeksiyonu kullanımı gün geçtikçe artan laboratuvar kanıtları ile desteklenmektedir. Otolog elde edilmesi, immün reaksiyon ve hastalık bulaştırma riski olmaması, önemli bir yan etki oluşmaması, gerektiğinde hastadan tekrar tekrar elde edilebilmesi kullanımının yaygınlaşmasını sağlayacak en önemli faktörlerdir. Kas yaralanmalarının tedavisinde TZP kullanımı ile ilgili daha fazla sayıda kanıta dayalı araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğuda bir gerçektir.

Biz bu çalışmamızda, TZP maddesinin kas dokusundaki iyileşmeyi nasıl etkilediğini ve kasta meydana getirdiği histopatolojik değişiklikleri araştırdık.

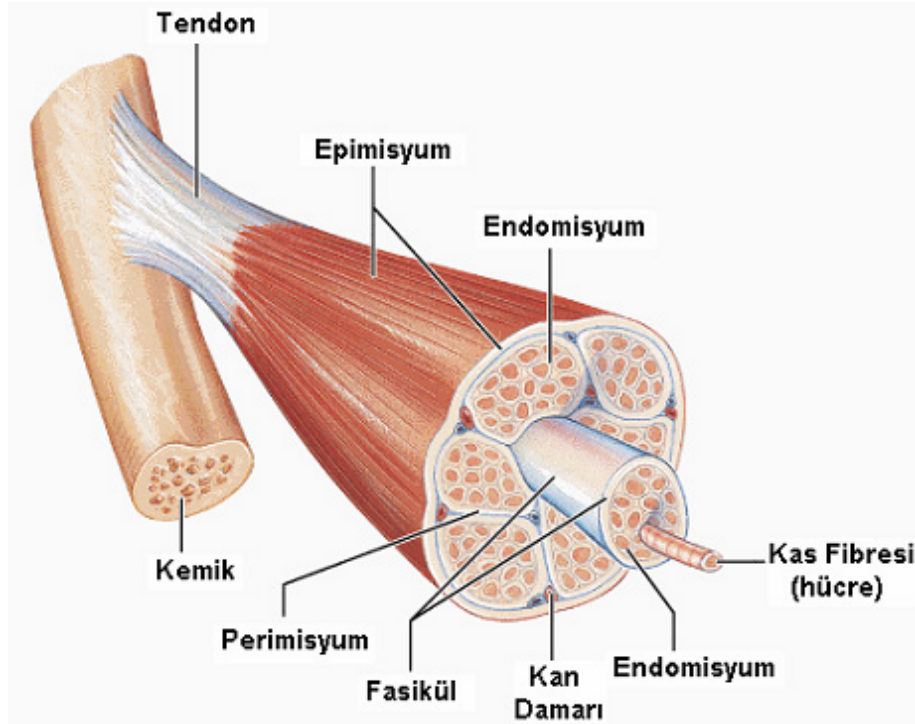
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kas ve Çevresindeki Bağ Dokusunun Yapısı

İskelet kasları basit olarak 2 yapıdan meydana gelir; kas fibrilleri ve bağ dokusu. Kas lifleri sinirleri ile beraber kasın kontraktıl birimini oluşturur ve her kas hücresi birbirine bağ dokusu ile bağlanır. İskelet kası lifleri şerit benzeri hücrelerdir. Bağ dokusu ise kas liflerinin beraberce eklem hareketine katılıp, lokomasyonun başarılı şekilde oluşmasını sağlayan yatak gibi davranır. Her kas lifi kemiğe yaklaşırken incilir ve tendonlar aracılığıyla kemiğe tutunur. Bu kas-tendon bağlantı bölgesine miyotendinöz bağlantı denir (MTJ) (1). Tendonlar kasları her iki ucundan kemiklere veya diğer kasların bağ dokusuna bağlarlar. Parlak beyaz görünümlü tendonlar, yuvarlak veya yassı bir yapıda olabilirler, ilgili kaslara göre daha ince ve paralel kollajen liflerden oluşmuşlardır. Kemikler üzerinde ya kemik örtüsü olan periosta tutunurlar veya kemik yapısı içerisine kadar ilerleyerek “Sharpey” lifleri adı verilen oluşumlar ile bağlantı kurarlar.

Her bir miyofibril 3 aşamalı olarak endomisyum, perimisyum ve epimisyum isimli bağ dokusu ile farklı aşamalarda birbirine bağlanmıştır (2).

İskelet kasını çevreleyen bağ dokusu kılıfına ‘epimisyum’ adı verilir (Şekil 1). Epimisyum, kasın içerisine doğru ilerleyerek kası kompartmanlara ayırır. Her kompartmanda yer alan kas demetleri ‘fasikül’ olarak adlandırılır ve bağ dokusu ‘perimisyum’ ile sarılıdır. Kas demetlerini oluşturan çok sayıda kas lifini çevreleyen bağ dokusuna ise ‘endomisyum’ adı verilir (3). Kas liflerinin bağ dokular ile çevrelenerek oluşturduğu yapısal organizasyon, kas dokusunun mimarisini belirler. Kas lifleri ve demetlerini saran bağ dokular, kas hücrelerinin kontraksiyon güçlerine dayanması için koruma ve destek sağlar. Kasları besleyen zengin kan damarı ve sinir ağı, kontraksiyonun oluşmasını sağlayan en önemli yapılardır. Kas hücreleri, kasılmak için sinir hücresinden iletim almalıdır. Çoğunlukla bir adet sinire bir adet arter ve en az bir ven eşlik eder. Sinir ve kan damarlarının dalları epimisyumu geçerek kasın içine nüfus ederler. Genellikle tek bir akson birden fazla kas lifini inerve eder. Tek bir sinir hücresi tarafından inerve edilen kas demetlerine ‘motor ünite’ denir.



Şekil 1. İskelet kası yapısı

Kas liflerinin dizilimi kasın uzunlamasına eksenine paralel veya oblik yerleşimli olabilir. Oblik dizilimler pennat, bipennat ve daha karmaşık düzenlemeleri içerir. Liflerin bu dizilimleri kasın fonksiyonel ve kontraktıl özelliklerinin belirlenmesinde önemlidir.

Kas hücresi farklı yapılardan meydana gelmektedir (3).

Sarkolemma: Kas lifinin hücre membranıdır. Plazma membranı denilen gerçek hücre membranı ile birçok ince kollajen fibril içeren bir polisakkarit tabakasından meydana gelen dış kılıftan ibarettir. Kas lifinin ucunda, sarkolemma'nın yüzey tabakası bir tendon lifiyle kaynaşır. Daha sonra tendon lifleri kas tendonunu oluşturmak üzere demetler halinde birleşir ve kemiğe yapışırlar

Sarkoplazma: Miyofibriller kas lifinde sarkoplazma denilen intrasellüler maddelerden oluşan bir matriks içinde asılıdır. Sarkoplazma sıvısı potasyum, magnezyum, fosfat ve protein yapıda enzimler içerir.

Sarkoplazmik Retikulum: Sarkoplazma içerisinde bulunan zengin endoplazmik retikuluma kas lifinde sarkoplazmik retikulum (SR) denir. Hızlı kasılan kas tiplerinde sarkoplazmik retikulumun özellikle yoğun olması bu yapının hızlı kas

kasılmasında önemli olduğunu gösterir. SR kas kontraksiyonunda kritik bir role sahiptir. Kas hücre membranı sarkolemmanın içe doğru yaptığı kıvrımlara T-tübülleri denir. Bu tübüller hücre dışı ile doğrudan bağlantılıdır. SR terminal sisternası T-tübül yakınında yer alır ve kasılma için gerekli kalsiyumun hücre içine salınımından sorumludur. SR' un uzun olan bölümü de kas gevşemesinin sağlanması için gerekli kalsiyum pompa proteinlerini (Ca^{+2} ATPaz) içerir.

Mitokondriler: Hücrenin enerji santralleri olarak bilinir. Mitokondriler olmadan hücre besinler ve oksijenden önemli miktarda enerji elde edemez ve sonuçta tüm hücresel işlevler durur. Mitokondriler tüm sitoplazma bölümlerinde bulunurlar ama hücre içindeki sayıları hücrenin gereksinim duyduğu enerji miktarına göre yüz ile birkaç bin arasında değişebilir. Ayrıca mitokondriler hücrede enerji metabolizmasının yoğun olduğu bölgelerde toplanırlar. Mitokondrinin yapısında lipit çift kat proteinden oluşmuş iki zarı vardır. İç membranın oluşturduğu kıvrımlara oksidatif enzimler tutunur. Mitokondri içindeki boşluk, besinlerden enerji elde edilmesi için gerekli olan çözülmüş enzimleri içeren bir matriksle doludur. Bu enzimler iç membrana tutunmuş olan enzimlerle işbirliği halinde çalışarak besinlerin oksidasyonunu, sonuçta su ve karbondioksit oluşumunu ve bunlarla eş zamanlı olarak enerji serbestlemesini sağlarlar. Açığa çıkan enerji, adenozin trifosfat (ATP) adı verilen yüksek enerjili bir bileşiğin sentezlemesi için kullanılır (4).

2.2. Kasın Büyüme ve Gelişimi

İnsan vücudunda yaklaşık 450 iskelet kası bulunur ve bu kaslar kadınlarda toplamda vücut ağırlığının % 25-30 erkekte ise % 40- 50'sini oluşturur (5, 6). İskelet kası, embriyo 2-3 haftalıkken mezodermal somitlerden köken alır. Somitlerdeki gelişimle beraber, embriyonun içinde tek hücreli mononükleat kas fibril öncülleri olan miyoblastlar görülmeye başlar. Miyoblastlar 7-9. haftalarda bir araya gelerek miyotüp adı verilen küçük, multinükleat hücreleri oluşturur. Aktin ve miyozin molekülleri de aynı zamanda sentezlenmeye başlar. Yeni oluşan miyoblastların miyotüplerin uçlarına eklenmesiyle boydaki artış devam eder ve 10. haftada kaslarda belirginleşme görülür. 16. haftadan doğuma kadar, kas lifleri büyümeye devam eder ve liflerdeki çizgilenmeler daha belirgin hale gelir.

Yaralanma sonrasında görülen kasın tamir ve rejenerasyonu, iskelet kasının orijinal oluşum işlemine yakın benzerlik gösterir (5). Kas liflerinin çapı yaşla beraber değişir. Genellikle, kas lifi çapı çocukluk döneminde artarak erken erişkin dönemde zirveye ulaşır. Lif çapı bir yaşında erişkinlerdekine %30'u, beş yaşında %50'si kadardır. İlk yıl içinde tip 1 ve tip 2 liflerin sayısında indifferensiye liflerin sayısının azalmasına bağlı olarak sürekli bir artış görülür. Çocuklar bir yaşını aştıktan sonra kas liflerinin bileşimi ve dağılımı erişkinlerle aynıdır (5). Erişkinlerde, kasın kısalmış veya uzamış pozisyonda immobilizasyonuna bağlı uzunluk değişiklikleri olabilir. Bu değişiklikler esas olarak kas liflerinde görülür ve tendonu içermez. Fakat iskelet gelişimini tamamlamamış çocuklar uzunluk değişikliklerine ve kronik germeye hem kas lifi hem de tendonda oluşan adaptasyonlar ile yanıt verirler. Bu dönemde kas lifi büyümesi esas olarak muskületendinöz bileşkede görülür (7).

Kas liflerinin aksine miyofibrillerin sayısı ve dolayısıyla lif çapı dramatik olarak değişebilir. Kas hücrelerinde aktif olan genler, kontraktıl proteinlerin yapımını kontrol ederler. Miyofibrillerin çapı normal büyüme veya egzersize bağlı hipertrofi ile artar, immobilizasyon, inaktivite, travma, hastalık veya yaşa bağlı atrofiyle azalır.

2.3. İskelet Kası Hasarının Mekanizması

Egzersiz sırasında çarpma ve burkulmalar sonucu yumuşak doku yaralanmaları oldukça yaygındır. Bu yaralanmalar normal rehabilitasyon sonucu rehabilite edilebilen yaralanmalardır. Fakat egzersiz esnasında bu yumuşak doku yaralanmalarıyla birlikte hücresel düzeyde de bir hasar oluşmaktadır. Bu yaralanma türü terminolojide tam tanımlanmamış olmakla birlikte mikro travma (microtrauma), mikro yaralanma (microinjury) ve kas hasarı (muscle damage) terimleri yaygın olarak kullanılmaktadır (8). Hasar temel olarak iki yolla açıklanmaktadır. Birincisi alışık olunmayan egzersiz, ikincisi ise, tam olarak karakterize edilememesine rağmen kas iskemisinin de katkısıyla doku yaralanmasıyla bazı metabolik ve kimyasal olayların ortaya çıkmasıdır.

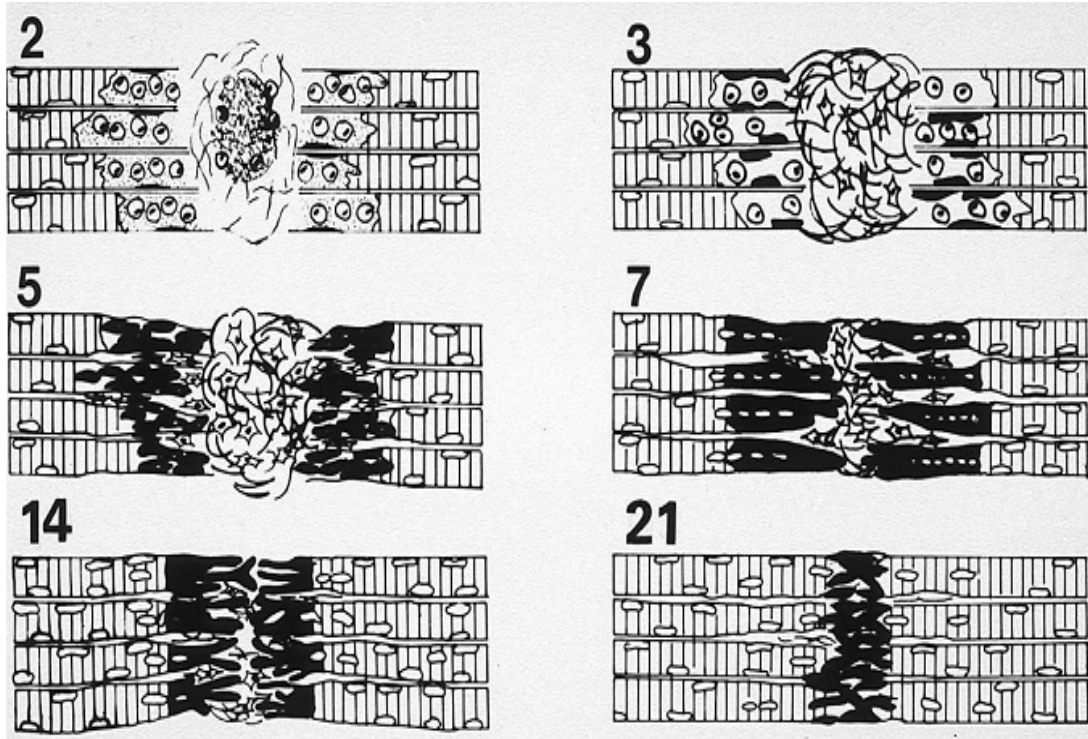
Kas yaralanmaları sporlarda en sık karşılaşılan yaralanmalardır ve sıklığı %10-55 arasında değişir. Kas hasarları kontüzyon, strain ya da laserasyon şeklinde gerçekleşir (9, 10). Laserasyonlar kas yaralanmalarının en az görülen şeklidir ve yaralanmaların %90'nını kontüzyon ve strain oluşturur. Kontüzyon yaralanmaları kas

ani, ağır, kompresif güce; örneğin kasa indirilen darbeye maruz kaldığında meydana gelir. Bu tip kas travmaları; temas sporlarında meydana gelir, sprint ve zıplama sporları ise kas straini ile ilişkili aktivitelerdir (9, 11). Strain'lerde aşırı gerim kuvveti kas üstüne uygulanmıştır ve bu gerim kasın dayanabileceğinden fazla olduğunda; MTJ yakınında rüptüre neden olur. Kas strainleri sıklıkla 2 eklem arasında çalışan yüzeyel kas guruplarında meydana gelir; örneğin; rectus femoris, semitendinosus kas ve gastreknekius kası (6,8,9).

2.4. Kas Hasarının Patolojisi

Kas ile kemik dokunun iyileşmesini birbirinden ayıran temel mekanizmaya göre; iskelet kası tamir süreci ile iyileşirken, kemik rejenerasyon ile iyileşir. Vücuttaki herhangi bir doku yaralandığında çoğunlukla skar ile iyileşir, ancak bir kemik doku kırıldığında bu dokuya özgü bir iyileşme süreci başlar. Yaralanmış kas dokusunun iyileşmesi yaralanmanın tipine (kontüzyon, strain, laserasyon) bağlı olmaksızın belli bir patern gösterir (12) (Şekil.2). Bu iyileşme süreci 3 basamaktan oluşur;

1. Miyofibril rüptürü ve takip eden kas lifi nekrozu, rüptüre kas güdükleri arasında hematoma formasyonu ve inflamatuvar hücre cevabı ile karakterize *destrüksiyon fazı*,
2. Nekroze dokunun fagositozu, kas lifi rejenerasyonu, aynı zamanda gelişen bağ doku skarı, yaralı alanda kapiller ağ oluşumunu içeren *tamir fazı*
3. Rejenere kas liflerinin maturasyonu, skar dokunun kontraksiyonu ve reorganizasyonu, kasın fonksiyonel kapasitesinin tamirinden oluşan *remodeling fazı*.



Şekil 2. İnflamasyonun günlük ilerleyişi

Şekilde inflamasyonu günlük olarak incelersek; 2. gün makrofajlar nekrotize kas liflerini temizlemeye başlar. Fibroblastlar santral zonda (CZ) bağ doku skar oluşumunu başlatır. 3. gün Satellit hücreler rejenerasyon zonunda aktif olmaya başlar. 5. gün Rejenerasyon zonunda (RZ) myoblastlar birleşerek miyotüpleri oluşturur. Rejenerasyon zonunda bağ doku yoğunlaşır. 7. gün Rejenere olan kas hücreleri rejenerasyon zonuna doğru uzanır ve skar dokusuna nüfuz eder. 14. gün Rejenerasyon zonundaki skar doku küçülür. 21. gün skar dokusu kaynaşmaya başlar.

2.4.1. Destrüksiyon Fazı

Kas Rüptürü; eksternal güçlerin kompresyonu ile iskelet kasında yaralanma ortaya çıkar, rüptür darbe alanının yakınında ya da darbe alanında meydana gelir, kas gerilmesinde ise yaralanma MTJ'nin yakınında kasın bittiği yerde olur. Kasılmış bir kasta, kontüzyonun neden olduğu yaralanma; gevşek bir kas dokusuna göre daha yüzeysel gerçekleşir, hasar kemiğe yakın yerde olduğunda darbenin basıncı kas, kemik yüzeyi ile komprese olur ve kas liflerine iletilir (8,12,13,14).

Miyofibrillerin Nekrozu; Kas yaralandığında aşırı mekanik güç, her bir kas lifi boyunca yayılır, sonrasında rüptüre kas güdüğündeki yırtılan sarkoplazma da sonlanır. Kas lifleri çok uzun ise, ip şeklindeki hücrelerin, darbenin olduğu yerde başlayan nekrozu kas lifinin tamamı boyunca ilerletme tehdidi mevcuttur. Ancak

özel bir yapı olan kontraksiyon bantları; hücre iskeleti materyalinden yapılmıştır. Yaralanmadan sonraki saatler içinde nekroz lokalize edilmeye başlanır, plazma membranındaki kapaklarda bulunan kontraksiyon bantları yırtılmış plazma membranının tamirinde koruyucu bariyer görevi yapar (12). Son çalışmalara göre; hasarlanan plazma membranında görülen lizozomal veziküller geçici membran görevi yaparak plazma membranının kurtarılmasında çok önemli rol oynar (13, 14).

İnflamasyon; Kas lifinin yaralanması sırasında, kas dokusunun kan damarları sıklıkla yırtılmıştır, bu nedenle de kandaki inflamatuvar hücreler yaralanma bölgesine direk olarak ulaşır (15, 16). Başlangıçta 3 tip inflamatuvar hücre bulunur (nötrofiller, ED1+makrofaj ve ED2+ makrofaj) ED1+ sub grubu debris ve hasarlı miyofibril materyallerini fagosite ederken ED2+ ise rejenerasyon sürecinde görev alır (17, 18). İnflamasyon reaksiyonunun başlangıcında, satellit hücreler ve kas liflerinin nekroze olan kısımları çeşitli maddeler salgılar, bu maddeler inflamatuvar hücrelerin ekstravazasyonu için kemoatraktan görevi görürler (19-21). Yararlanan kas dokusunda aktive olmuş makrofaj ve fibroblastlar bulunur ve bu hücrelerde ek olarak kemotaktik sinyaller (büyüme faktörler, sitokinler, kemokinler) salgırlar. Bu denova üretilen büyüme faktörlere ek olarak yaranın tamiri gibi süreçlerde kullanılmak üzere kendi bünyelerinde de büyüme faktörleri depolarlar. Bu depolanmış büyüme faktörleri çevredeki sağlam hücrelerce sentezlenir, ECM'in(extracellular matrix) elemanları ve proteoglikanlar yardımı ile inaktive şekilde bekletilirler. Doku hasarı başladığında bu ECM bağımlı büyüme faktörlerin salınımı ve aktivasyonu gerçekleşir ve direk olarak tamir sürecini başlatırlar (22).

Büyüme faktörleri ve sitokinler ile ilgili olarak TNF-alfa'nın ,(tumor necrosis factor) yaralanmış kemik dokunun iyileşmesinde direk rolü vardır, iyileşme sırasında aktivitesi inhibe olursa, iskelet kasının iyileşmesinde çok büyük yetmezlik gelişir (23). İndirekt olaraksa, fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF), transforming growth factor- β (TGF- β) ailesi; hepatocyte growth factor (HGF) ve interleukin-1 β ve IL-6, platelet derived growth factor(PDGF) gibi büyüme faktörleri hasarlı iskelet kasında eksprese edilir. Bunların iskelet kasındaki ekspresyonu mikro travmalara yol açar, şok travma ve eksternal gerilmeye bağlı fizyolojik durumlarda da olur (24, 25). Bu büyüme faktörlerinin çeşitli hücrelerin aktivasyonunu sağladığı bilinmektedir. Ayrıca kas dokunun rejenerasyonunda da

görevlidirler. BFGF'ler, IGF-1, IGF-2, TGF- β , HGF, TNF-alfa ve IL-6, satellit hücre denilen kaslı öncülü hücrelerin potansiyel aktivatörüdür. Bu hücrelerin bazıları satellit hücre proliferasyonunu uyardığı gibi, multinükleer kas lifleri içindeki mikrotübüllerin füzyonunu da sağlar (26, 27).

İskelet kasındaki yaralanmadan hemen sonra, polimorfonükleer hücreleri yaralanma alanındaki en fazla hücrelerdir (12, 18, 28-30). Fakat ilk gün içinde monositlerle yer değiştirme başlar. İnflamasyonun temel prensibine göre; bu monositler makrofajlara dönüşür ve makrofajlarda nekrotik materyalin proteolizini ve fagositozunu sağlayan lizozomal enzimleri salgırlar (12, 21, 31, 32). Makrofaj fagositozla nekrotik materyalin temizlenmesini sağlar; hasarlı kas liflerinin etrafını saran bazal membran silindirleri, makrofajların tutunmasını uyarır. Satellit hücrelerde yeni kas lifi oluşumunda iskelet görevi görür (12, 33, 34). Bu olağanüstü, inanılmaz özgül sistemde satellit hücre çevresindeki nekrotik debrisler fagosit edilirken bir yandan da, rejenerasyon olan hücrelere çözünebilir kurtarıcı faktörlerin salınmasını sağlar (19, 35). Kas hasarı sonucunda inflamatuvar hücrelerin kas içi invazyonu hızlı ve ardışık bir şekilde artar. Bu hücrelerin invazyonu kasın iyileşme, yenilenme ve büyüme sürecinde günler ve haftalar boyu devam edebilir. Kas tamiri ve yenilenmesi ile inflamasyon arasındaki bu ilişkinin yararlı olabileceği gibi yaklaşımlar mevcutken bunun kas hasarını arttırdığı ve kas gelişiminde tamamen yararlı olmadığına dair çalışmalar da mevcuttur (35).

Nötrofillerin kas hasarını arttırdığı deneysel çalışmalarda gösterilmesine rağmen, kasın tamir ve yenilenme sürecindeki fonksiyonları açık bir şekilde ortaya konulmamıştır. Egzersizi takip eden 1 saat içinde nötrofillerin invazyonu başlar ve 5 gün yüksek kalabilir. Bunun yanında nötrofillerin sitolitik ve sitotoksik moleküller salgıladığı ve bu yolla kasta veya diğer sağlıklı dokularda hasara neden olduğu da bildirilmiştir (36).

2.4.2. Tamir ve Remodeling Fazı

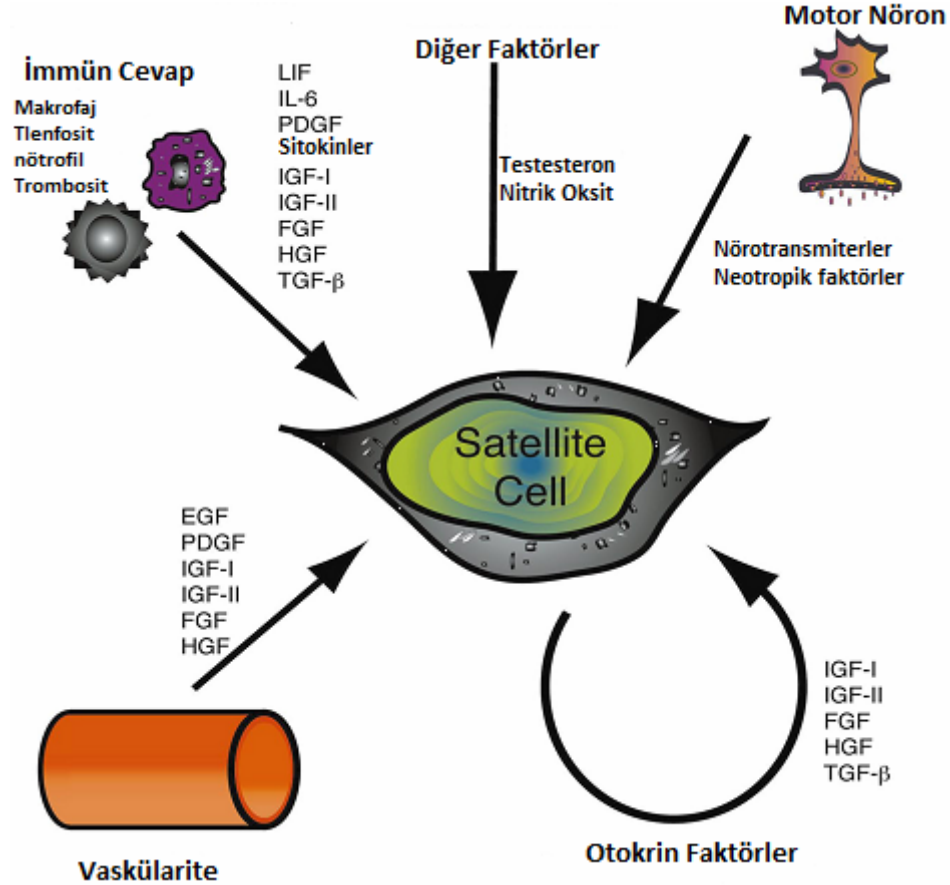
Destruksiyon fazı bir kez başlatıldığında, yaralanan kasın asıl tamiri müşterek iki süreç ile devam eder; bu eş zamanlı ve yarışmalı olarak gerçekleşen süreçler, kas liflerinin ve sinirlerin rejenerasyonu ve bağ doku skarının oluşumudur. Bu denge

halindeki iki sistem kasın kontraktıl fonksiyonunu geri kazanabilmesinde çok önemlidir (12).

Kas Liflerinin Rejenerasyonu; Kas lifleri geri dönüşümsüz postmitotik hücreler olarak sınıflandırılrsa da, iskelet kasının rejenerasyon kapasitesi intrensek bir mekanizma ile başlatılır. Satellit hücreler denen andiferansiye öncü hücreler fetüs döneminden itibaren her bir kas lifinin bazal laminasının altında uzanır (34, 37, 38). Yaralanmaya cevap olarak bu hücreler öncelikle proliferer olur, sonra miyoblastlara farklılaşır, sonunda da multinükleer miyotüpleri oluşturmak üzere birleşirler. Yeni oluşturulan multinükleer miyotüpleri travmanın olduğu yerdeki yaralı kas liflerinin bir kısmı ile füzyona uğrarlar. Ardından kas lifinin rejenerer olan kısmı normal yapısındaki hali olan, çapraz çizgilenme ve periferal yerleşik nükleus ile ilk hallerine dönerler (34). İlginç bir şekilde hafif bir gerim ile oluşan basit yaralanmalarda bile satellit hücreler acilen çoğalmaya başlar. Ancak yaralanmanın zayıf ve hızlı olması nedeniyle miyoblast dönüşümü olmadan satellit hücre aktivitesi durdurulur (39).

Önceden, satellit hücreler kas tamirinde görev alan kas çekirdeğinin kaynağı olarak bilinirlerdi. Oysaki son çalışmalarda multipotent kök hücrelerin kas olmayan yerel kök hücre ve yerleşik kas kök hücresi olarak 2 farklı multipotent kök hücre gurubundan oluştuğu gösterilmiştir (27). Kemik iliğinden kaynaklanan progenitör hücreler, yaralanan kas dokudaki kas liflerinin yerine gelir ve ayrıca hasarlı kas doku için gereken satellit hücre havuzunu da oluştururlar. Ancak bu kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin devreye girmesi satellit hücrelerden oluşan miyofibroblast yapımı yanında, çok nadir olmaktadır. Bu da iskelet kası rejenerasyonunda kök hücrelerin ne denli önemli olduğunu göstermektedir (40, 41).

Satellit hücreler bu işlevlerini yerine getirmek için sıkı bir genetik kontrole ihtiyaç duyarlar (Şekil3) (44,45). Miyogenez sürecinde satellit hücreler hücre döngüsünün ilerleyişinin kontrolünü, kendilerini çevreleyen yara dokusundaki sinyaller ile gerçekleştirirler. Bu süreç, spesifik genlerin genetik programla indüklenmesi veya baskılanması şeklinde düzenlenir (42).



Şekil 3. Satellit hücreyi etkileyen faktörler.

Şu bilinmektedir ki kas dokunun iyileşme kapasitesi yaşla birlikte azalmaktadır. Azalan kapasite satellit hücre sayısı ya da aktivitesindeki azalma ile ilişkili gözükmemektedir. Yaşlanmış kasların rejenerasyon kapasitesinin azalması, rejenerasyonun tüm fazlarının yaşla birlikte yavaşlaması ile ilişkilendirilmiştir (43).

Bağ Dokusu Skarının Oluşumu; İskelet kasındaki hasardan hemen sonra, rüptüre kas lifleri arasında hematoma ile dolu bir yapı oluşur. İlk günde, inflamatuvar hücreler hematoma fagosite edip kan hücrelerini ortadan kaldırmaya başlarlar (12, 21, 44). Kan kaynaklı fibrin ve fibronektin, erken granülasyon dokusunu kurmak üzere çapraz bağ yaparlar, bu noktada ECM bu sürecin gerçekleştiği ve fibroblastların göç ettiği ortamı oluşturur. Granülasyon dokusundaki bu fibroblastların bir kısmı miyojenik hücrelerden kaynaklanırlar (45). Daha da önemlisi, bu yeni oluşan doku; yaralanmış kasın maruz kalacağı kuvvete ve gerime dayanıklılığı belirler. Sonrasında fibroblastlar ECM'in protein ve proteoglikanların tamirini üstlenir (46-48).

Kas içindeki bağ dokusu miktarı, kas belli bir süre tam olarak immobilize edilmediği sürece yeteri kadar gelişmez (49).

Başarılı kas hasarı tamiri için miyofiber rejenerasyonu ve kollajen sentezi arasında hassas bir denge vardır. Yeterli kas gerim gücü ve MTJ kuvvet aktarımında bağ doku sentezi gereklidir. Öte yandan bağdokusu skar ve fibrozisle iyileşir. İskelet kasında 4 çeşit kollajen 1, 2, 3 ve 4 bulunur. Tip 1, major kollajen fibrilleri epimisyum ve perimisyumda yer alır. Gerilme gücü ve sertliği yüksek olduğundan kas ve tendon kuvveti için elverişlidir. Tip 3 kollajense çoğunlukla perimisyum ve endomisyumda mevcuttur; ince ve elastik bir yapısı vardır. Tip 1 ve 3 kollajenin yanında yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda Tip5 kollajenin miyofiber rejenerasyonunda; Tip4 kollajenin ise kas hasarından sonra matriks iyileşmesinde önemli olduğu ortaya çıkmıştır (10, 12, 50).

Bağ dokusu skarı travmanın erken döneminde hasarlı iskelet kasının en zayıf noktasında oluşmaya başlar, bu bağ dokunun gerim gücü tip 1 kollajen sentezi arttıkça artar (49, 51, 52). Travmadan yaklaşık olarak 10 gün sonra skar doku maturasyonu hasarlı kasın en zayıf kısmındaki noktaya ulaşır, fakat nadiren de olsa, bu bağ dokusu yeterince oluşmazsa rejenere miyofibriller ile skar doku arasındaki yeni oluşturulan MTJ'lerde rüptür meydana gelebilir. Ancak kasın hasardan önceki kuvvetine ulaşabilmesi için daha uzun zamana ihtiyaç vardır. İskelet kası hasarlarının çoğunluğunda fibröz skar dokusu olmadan iyileşme sağlanırken, fibroblast proliferasyonu bazı yaralanmalarda abartılı olabilir, yoğun skar doku oluşumuna neden olabilir. Bu durum sıklıkla büyük kas travmaları ve rüptür olgularında gelişir ve skar mekanik bariyer görevi yapar ancak hasar alanında kas rejenerasyonunu tamamen bozabilir (51, 53, 54).

Deneyisel çalışmalar, iskelet kası içindeki skar oluşumuna yeni bir bakış açısı getirmiştir, hasarlı çizgili kas dokusuna direkt olarak lukrinden zengin proteoglikan (SLRP), decorin, suramin ve gama-interferon gibi anti-fibrotik ajanların uygulandığı durumlarda skar oluşumu engellenmektedir (55-57). Decorin, suramin, gama-interferon, yaralı iskelet kasının tamiri boyunca skar doku oluşumundan sorumlu olan TGF- β 'nın inhibitörleridirler (33, 35, 55, 58). TGF- β 'nın inhibisyonunun yanında, decorin ve diğer lukrinden zengin proteoglikanlar sadece farklı kollajenlere

bağlanmakla kalmaz, ayrıca fibrilogen ve tip I kollajen fibrillerinin oluşumunu da düzenlerler (59-61).

Yapılan bir çalışmada kas yaralanmasından sonra oluşan fibrozisin tekrar yaralanmayı arttırdığı iddia edilmiş. Anti TGF- β ajanları (suramin, decorin, γ -interferon ve relaxin) kullanılmış. Fibrozisi azalttıkları ve kas iyileşmesini hızlandırdıkları gözlenmiş (62, 63).

Yaralı Kas Dokusunun Vaskülarizasyonu; Hasarlı bölgeye vasküler destek, rejenerasyonun ilk basamağıdır ve hasarlı dokunun morfolojik ve fonksiyonel iyileşme sürecinin başlangıcıdır. Yeni kapillerler kan damarlarının güdüklerinden hasarlı bölgelere doğru gelişirler, böylece hasarlı alana yeterli oksijen desteği sağlayarak miyofibriller rejenerasyon için metabolik ihtiyaçlar karşılanmış olur (54, 64). Genç miyotübler birkaç mitokondri ve sınırlı aerobik metabolizma kapasitesine sahiptirler. Ancak, yüksek miktarda anaerobik metabolizma kapasitesine sahiptirler. Rejenerasyonun son aşamalarında, aerobik metabolizma multinükleer kas lifleri için temel enerji kaynağını oluşturur. Bu süreçte, yeni oluşan ince miyotübül evresinde kas lifi rejenerasyonunun oluşmamasının akla yatan açıklaması, bu evrede aerobik metabolizma için gereken oksijen desteğini sağlayacak kapiller ağın henüz gelişmemiş olmasıdır.

Miyofibrillerin ECM'e Adezyonu; Kas lifleri kırıldığında, tendon-kas-tendon ünitesinin devamlılığı rüptür kısmında bozulmuştur ve rüptüre kas güdüklerinde kontraktıl kuvvet yolları aracılığıyla iletilenmemektedir. Böylece kas güdükleri kontraksiyon sırasında itilirler. Rejenerasyon olan kas liflerinin uçları skar dokusuna nüfuz etmesiyle, rejenerasyonun görece uzun süresi boyunca yaralanan kas güdüklerinin huni şeklindeki görüntüsüne neden olur (12, 65). Rejenerasyon olan kas lifleri miyofibrillerin intakt ve rejenerasyon olan kısımlarında bulunan ECM'e adezyon kuvvet yaparlar (66-68). Bu kas liflerinin lateral ECM'e tutunması kas güdüklerinin hareketini kısıtlar, hala frajil olan skar dokusuna itilmesini engeller ve iyileşme tamamlanmadan önceki hasarlı kasın tekrar rüptüre olmasını engeller (67, 69, 70). Çok ilginç bir şekilde mekanik stres bu yan adezyonlar kuvvet için gereklidir, son çalışmalarda da gösterildiği gibi, bu fenomenler mekanik stres olmadan oluşmamaktadır. ECM; Büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin aktivitesini modifiye

eder. Büyüme faktörlerinin ihtiyaç halinde hızla salıverilebilmesi için rezervuar görevi görür. Büyüme faktörlerini parçalanmaktan korur.

2.5. Kas Hasarlarının Sınıflaması

Kas hasarı klinik olarak strain, kontüzyon, laserasyon şeklinde olabilir. Kas içi kan damarları travma sonucunda kolayca torsiyone olur ve kas arası ve kas içi hematoma yol açar.

Strain; en sık kas yaralanma türüdür. Ani eksantrik kontraksiyona bağlı oluşan gerilmeye ve zorlanmaya bağlı myotendinöz fibrillerde parsiyel ya da komplet yırtıklar oluşur. En sık kas-tendon bileşkesinde (myotendinöz bileşke paterni %97) görülür. Kas periferinde sinyal değişiklikleri ile karakterize olan epimisyal patern sıklığı ise %3'dür.

Kontüzyon; genellikle künt travmaya bağlı gelişir. Kasın bütünlüğü bozulmaz. İntramusküler ve interstisyel hemoraji gelişir.

Kas yaralanmasının sınıflaması ile ilgili kullanılan ortak bir sınıflama bulunmamakla birlikte; genelde semptomlara göre sınıflama yapılmıştır. Geçmişte yapılmış Ryan's sınıflaması değiştirilerek kullanılmaktadır (71) (tablo1).

Tablo 1. Kas yaralanması sınıflaması

Grade	Doku hasarı	Semptom
Grade 1	Birkaç kas lifinin yırtılması	Aktiviteyle ağrı, minimal şişlik ve ağrı
Grade 2	Orta derecede kas lifinin yırtılması Fasya complet	Ağrı var, yara yeri palpasyonla hassas
Grade 3	Çok sayıda kas lifinin yırtılması Fasya incomplet	Ağrı var, yara yeri palpasyonla hassas kas fonksiyonunun tamamında kayıp
Grade 4	Kas lifi ve fasyanın tamamı yırtılmış	Ağrı, ekimozun palpasyonunda defekt

2.6. Kas Hasarının Tanısı

Kas hasarının tanısı travmanın oluşum mekanizmasının dikkatlice öğrenilmesi ile başlar ve inspeksiyon, palpasyonu içeren fizik muayene ile devam eder. Sonrasında yaralı kasın fonksiyonlarının test edilmesi gerekir. Hematom kasın

derinlerinde yerleşik ve küçükse fark edilmesi güç olabilir, fakat görüntüleme yöntemleri (USG, BT, MR) hasarın saptanmasında daha kesinlik sağlar (72-74). Kas yaralanmalarında, MR kas hasarının varlığını doğrular ve lezyonun çok iyi karakterize edilmesini sağlar. MR'ın USG'den daha üstün olduğu gösterilmiştir (10).

Hasarın görsel ve miktarsal olarak tanımlanabildiği magnetic resonance imaging (MRI) yöntemi ve ışık ya da elektron mikroskobu ile biyopsi bulgularının değerlendirildiği histokimyasal yöntemler kas hasarının tanımlanmasında kullanılan doğrudan yöntemlerdir (58). Bu yöntemlerden biyopsi yöntemi invaziv olduğu için biyopsi sırasında kasta hasar oluşabilme ihtimalide oldukça yüksektir.

1999 yılına kadar yapılan kas hasar çalışmalarında kullanılan ölçüm yöntemlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, kas hasarının değerlendirilmesinde % 63 kas ağrısı, % 52 kan proteinleri, % 50 de maksimal istemli kasılma gücü kullanıldığı belirtilmiştir (75). Kolay ve subjektif değerlendirme olan kas ağrısı ile objektif ama pratikte pek uygun olmayan histolojik değerlendirme arasında kas hasarını tanımlamak ve boyutlarını ortaya koymak için çeşitli parametreler vardır. Gerek fonksiyonel parametreler, eklem hareket genişliği, ortaya konan kuvvet ve gerekse biyokimyasal parametreler (bazı serum enzim ve proteinlerinin varlığı) özellikle histokimyasal verilerin alınamadığı durumlarda kas hasarı tayininde kullanılmaktadırlar.

Bunlardan en önemlisi CK (Kreatinin Kinaz) olmasına rağmen miyoglobin, laktat dehidrogenaz ve kas yapı proteinleri hasarın göstergesidir. LDH (Laktat Dehidrogenaz) ve AST (Aspartat aminotransferaz), duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük olması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir (76).

Son yıllarda ise; daha farklı maddelere ortaya çıkmıştır. Heart-fatty acid binding protein, troponin I (TnI), α -actin bunlardan bazılarıdır. α -actin kas zedelenmelerinin saptanmasında yeni ve oldukça güvenilir bir iskelet kasi belirteçidir. α -actin'in erken ölçümü kas zedelenmesi şüphesinin aydınlanmasını dolayısıyla etkin ve zamanında tedaviye başlanmasını ve optimal sürede spora dönüşü sağlayacaktır. Fast ve slow myosin (48-72 saat), Grade 1 yaralanmaların tanınmasında faydalıdır. (77, 78)

2.7. Kas Yaralanmalarında Tedavi Prensipleri

Erken mobilizasyon yaralı alana daha hızlı ve yoğun damar desteğinin kurulmasını sağlamaktadır. Hatta immobilizasyonla karşılaştırıldığında rejenere olan kas liflerinin paralel organizasyonu daha iyi olmaktadır.

Ancak, hasarlı kasın mobilizasyonu en uygun şekli tam olarak açıklanmamıştır. Deneysel çalışmalar göstermiştir ki; aktif mobilizasyon (yaralı kasın hafif kullanımı), yaralanmadan hemen sonra yapılırsa daha geniş bağ doku skarı meydana gelir. Buna bağlı olarak gelişen bağ doku skarı kasın kompresyonunun bozulmasına neden olmaktadır. (53). Ek olarak orjinal kas travması ve tekrarlayan rüptür yaralanmaları, yaralanmadan hemen sonra başlayan mobilizasyonda ortaya çıkmaktadır. Immobilizasyon yeni oluşan granülasyon dokusunun, kas kontraksiyonları ile meydana gelecek olan gerim kuvvetine dayanıklılığını arttırmaktadır (10, 49, 53, 79).

Eğer immobilizasyona akut faz (ilk birkaç gün) döneminden sonra devam edilirse kas iyileşmesindeki remodeling fazında zararlı etkiler oluşturacaktır (53). Yaralı kas dokusunun acil tedavisinde, istirahat, soğuk uygulama, kompresyon ve elevasyon (RICE) temel prensiptir. Bu dört uygulamadaki amaç yaralanan alana kanamayı önlemektir. Yumuşak doku yaralanmalarında RICE'in yararlarını araştıran deneysel çalışmalarda bu tedavinin faydalı olduğu anlaşılmıştır. (78)

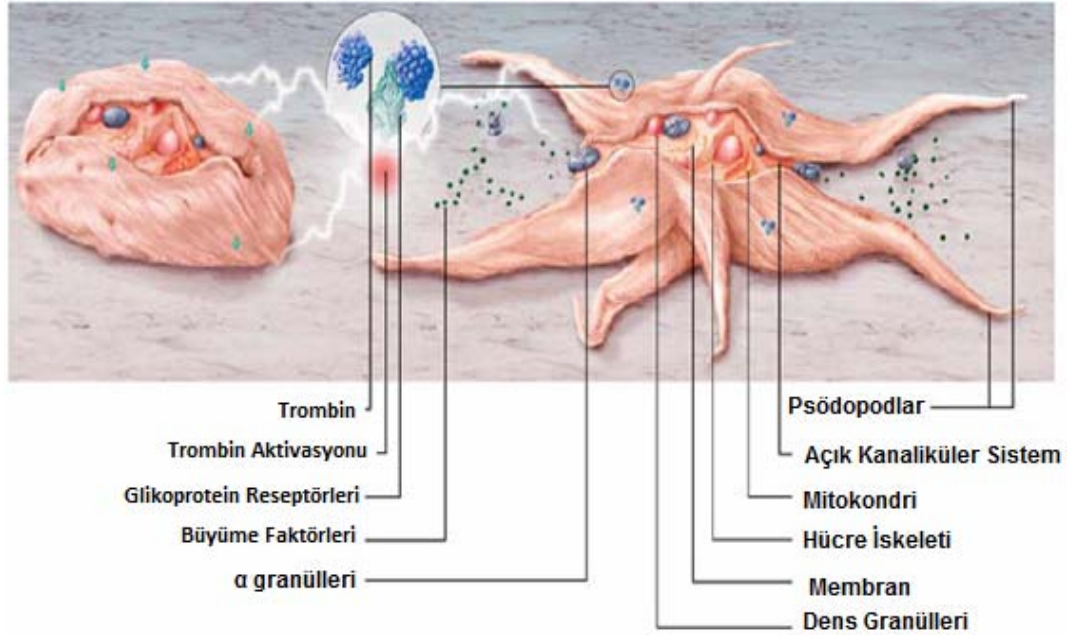
Ancak, yaralanma semptomları travmadan 3 ila 5 gün sonra yok olduğunda, doku hasarının tekrar değerlendirilip intramuskuler hematoma, aşırı doku hasarına dikkat edilmelidir. Böylece cerrahi müdahalenin gerekebileceği durumlar atlanmamış olacaktır. Görüntüleme yöntemleri (USG, MR) bu durumlarda oldukça yol göstericidir (2). Fluktuasyon mevcutsa hasar alanına aspirasyon uygulaması bazen gerekebilir.

İyileşmenin erken fazında farklı NSAİİ'lerin (Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaç) kullanımının inflamatuvar hücre reaksiyonunu azalttığı, iyileşme sürecine, gerim kuvvetine, hasarlı kasın kontraksiyon yeteneğine yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir (80, 81). Dahası, NSAİİ'lar in situ olarak aktive olmuş satellit hücrelerinin ve miyotübüllerin proliferasyon yeteneğini bozmamaktadır (82). Ancak NSAİİ'lar kontraktür yaralanma modellerinde kas iyileşmesinin erken fazında

kullanılmalıdır, uzun dönem kullanımlarında iskelet kasının rejenerasyonuna zarar vermektedir (83).

2.8. Trombosit

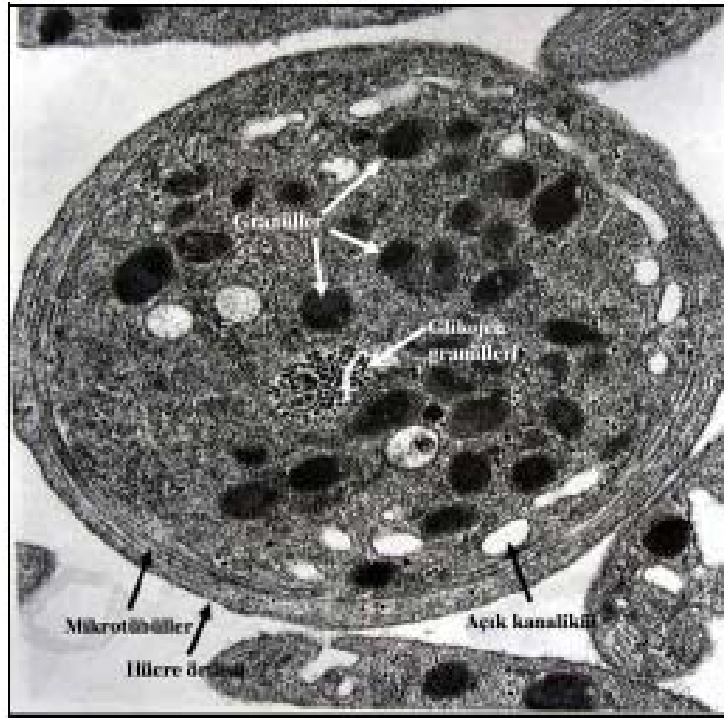
Trombositler en küçük kan hücreleridir ve yuvarlak ya da oval şekilli olabilirler. Hacimleri 7,8-11 fL, kemik iliğindeki megakaryositler tarafından üretilen 2–4 µm çapında, mitokondri ve mRNA içermesine rağmen çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Dolayısıyla sınırlı bir ömürleri vardır. Dinlenme halinde tipik olarak disk şeklinde olmalarına rağmen aktive olduklarında 5 µm'ye kadar ulaşabilen psödopodlar içeren globüler bir şekil alırlar (Şekil 4) (88). Trombositler dalakta yüksek oranda bulunurlar. Dolaşımda yaklaşık 10 gün kadar kalırlar ve daha sonra retikuloendotelial sistem makrofajları tarafından dolaşımdan temizlenirler (84, 85).



Şekil 4. Aktive trombosit yapısı

Trombositlerin hücre zarı, sitoplazma içerisinde parmak şeklinde uzantılardan oluşan ve ‘açık kanaliküler sistem’ adı verilen bir kanal sistemine sahiptir. Bu sistem, sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmalarını sağlayan fonksiyonel bir yapıdır. Diğer bir sistem olan ‘yoğun tübüler sistem’ ise, kapalı bir kanaliküler sistem olup, trombosit aktivasyonu için gereken kalsiyum iyonlarını depolar. Ayrıca

tromboksan gibi prostoglandinlerin sentezinde rol alır (Şekil 5) (90). Trombosit hücre iskeletinin %20-%30 kadarını, hücre zarına yakın yerleşim gösteren aktin mikrofilamanları oluşturur. Trombositler aktive olduklarında, hücre iskeleti yapısında değişiklikler meydana gelir; aktin mikrofilamanları hücre hareketi ve agregasyonu sağlayan, ‘filapod’ adı verilen yüzey çıkıntılarını oluştururlar. Hücre iskeletinde bulunan bir diğer protein yapı mikrotübüllerdir ve aktivasyon sırasında oluşan trombosit şekil değişikliklerinden sorumludurlar (86).



Şekil 5. Trombosit elektron mikroskopik fotoğrafı

Trombositlerin sitoplazmalarında, çoğu alfa (α) granül olmak üzere, delta (δ) ve lambda (λ) granüller bulunur. Bu granüllerin içerikleri ve işlevleri birbirlerinden farklıdır.

Alfa (α) granüller: 300-500 nm çapında olan bu granüller diğerlerine oranla çok daha heterojen bir içeriğe sahiptirler. Her bir trombositte, ortalama 50–80 adet α -granül mevcuttur. Boyut ve sayıları nedeniyle trombositlerin majör granülleri olarak kabul edilirler. 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 depolanmaktadır. Alfa granüller hemostaz,

inflamasyon, yara iyileşmesi ve hücre-matriks etkileşimi üzerinde kritik öneme sahip otuzdan fazla biyoaktif protein ve büyüme faktörü içerirler. Biyoaktif proteinlerin bazıları (83,84): PDGF, TGF, platelet faktör 4 (PF-4), IL-1, trombosit kökenli anjiogenetik faktör (PDAF), VEGF, EGF, trombosit kökenli endotelial büyüme faktörü (PDEGF), epitelial hücre büyüme faktörü (ECGF), IGF. Ayrıca osteokalsin (Oc), osteonektin (On), trombospondin-1 (TSP-1), adenosin difosfat (ADP), trombosit aktive edici faktör (PAF), serotonin gibi bu komponentlerin trombosit adezyonu, aktivasyonu ve fibroblast proliferasyonunda çeşitli rolleri vardır (86, 87) Aynı zamanda osteokondüksiyon ve osseointegrasyon için gerekli olan hücre adezyon molekülü vitronektin açısından da zengindirler.

Delta (δ)granüller (yoğun cisimler): 250-300 nm çapa sahip olan bu granüller elektron mikroskopta ışınları yoğun olarak absorbe etmeleri nedeniyle dens görünmektedirler. Bu nedenle delta granüller “yoğun cisimler” olarak da adlandırılırlar. Kalsiyum iyonları, pirofosfat, 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. Ayrıca diğer trombositleri toplayıp aktive etmede görevli adenosin difosfat’ı (ADP) depolar ve salgılar. Her bir trombositte, ortalama 3–8 adet δ -granül mevcuttur.

Lambda (λ) granüller (lizozomlar): Çapları 175–250 nm arasında değişen ve lizozomal enzimleri (glikozidaz ve proteinaz) içeren veziküllerdir. Bu granüllerin bakterisidal etkilerinin yanı sıra, pıhtılaşma sürecinde oluşan fazla pıhtıyı da eritici rolleri vardır (85) (tablo 2).

Tablo 2. Trombosit granüllerinin içerikleri (87)

Alfa Granül	Delta Granül (Yoğun Cisim)	Lambda Granül (Lizozomlar)
Glikoproteinler <ul style="list-style-type: none"> • Fibronektin, vWF, Trombospondin,vb. Hemostaz Faktörleri <ul style="list-style-type: none"> • Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Protein S, Plazminojen,vb. Hüresel Mitojenler <ul style="list-style-type: none"> • PDGF, TGF-β, EGF, VEGF, FGF-II, vb. Proteoglikanlar <ul style="list-style-type: none"> • PF4, HRGP, PBP, vb. Proteaz İnhibitörleri Albumin-immü nglobulinler	Nükleotidler <ul style="list-style-type: none"> • ATP,ADP • GTP,GDP Aminler <ul style="list-style-type: none"> • Serotonin • Histamin Çift değerlikli Katyonlar <ul style="list-style-type: none"> • Kalsiyum • Magnezyum 	Asit Proteazlar <ul style="list-style-type: none"> • Katepsin D, E • Karboksipeptidazlar • Kollajenaz • Asit Fosfataz • Arisülfataz Glikohidrolazlar <ul style="list-style-type: none"> • Heparinaz • Diğerleri

2.8.1. Trombosit Aktiviteleri

Hemostaz; trombositlerin dengeli interaksiyonları, vaskülarite, plazma pıhtılaşma proteinleri ve düşük moleküler ağırlıklı maddeler ile sağlanır. Yaralanma sırasında hasarlanan kan damarları duvarları altındaki subendotelyal kollajen açığa çıkar, plazmadaki von Willebrand faktörü bu kollajene bağlanır, takiben yapısı değişmiş olan trombositler kan damarı duvarına adeze olurlar. Bu süreç, *trombosit adezyonu* olarak bilinir ve bu adezyon trombosit membranında yer alan glikoprotein Ib ve IIb/IIIa reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu olayı takiben, trombositler aktive olur ve agrege olurlar. Aktivasyon sonrasında trombositlerin hücre iskeleti diskoid şekilden psödopodları olan sferik şekle döner, böylece yaralı dokulara doğru süzülebilir ve bu fenomene *trombosit agregasyonu* denir.

Agregasyondan sonra, kanaliküler sistem aracılığıyla granüler içerik salgılanır. Salınan serotonin büyük olasılıkla dokuda vazokonstriksiyona neden olur. ADP granüler içeriklerin diğer trombositlerden salınımını provoke eder; bu da trombositleri sertleştirir ve hemostatik plak oluşur. Diğer birçok ajan trombosit

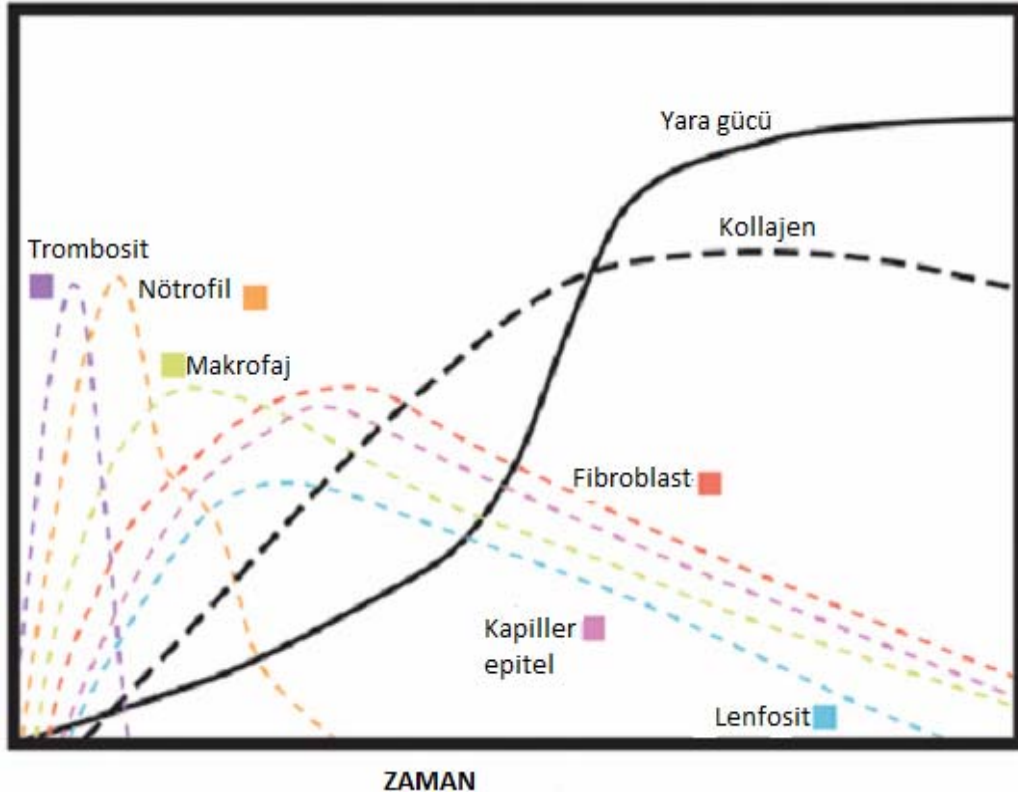
agregasyonuna yol açar ve ayrıca trombosit membranında bulunan fosfolipaz A2'yi aktive eder.

Takiben, membran fosfolipidleri araşidonik asit salgılar ve bu da trombosit agregasyonu ve PDGF salınımına yol açan tromboksan A2'ye dönüştürülür.

Tromboksan ve ADP'den bağımsız olarak trombosit agregasyonu ve trombosit granül salınımına yol açan başka bir mekanizma trombinin indüksiyonudur. Böylece trombosit aktivasyonundaki bu üç mekanizma ile aktive olan trombositler trombosit plağını oluşturur ve bu plak hasarlı damardaki kan akımını durdurur. Dahası, koagülasyon sistemi salınan partiküllerle de aktive edilir (88). En iyi bilinen trombosit fonksiyonu, pirimer olarak hemostazın kontrolünün yanında, trombosit plağının oluşumudur. Bundan sonra sekonder hemostaz olan koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu ve plağı stabilize eden fibrin ağının oluşumu ile başlatılır (89). Son basamak etkilenmiş alanı invaze eden lökositlerin sitokin salınımı ile aktive edilmesidir ve bununda plak yıkımını sağlayan fibrinolitik sistemin aktivasyonu takip eder. Trombosit alfa- granülleri salgılandıktan sonra yara alanındaki PDGF'ler yara tamirinde önemli görev alır, yaralanmış kan damarlarının ve dokuların tamiri yeni bağdokusu oluşumu ve revaskülarizasyon ile devam eder. Ayrıca yara bölgesinde trombosit ve fibrin plağının oluşumu mikroorganizmaların bu alana girişine engel olur.

2.8.2. Yara İyileşmesinde Trombositlerin Yeri

Yara iyileşmesi çok yönlü yönetilen ve hücre-hücre, hücre-matriks ilişkisini içeren ve büyüme faktörlerinin haberci molekül işlevi yaparak bir sürü süreci kontrol ettiği karmaşık bir olaydır. Yara iyileşme süreci; sırasıyla iyileşmenin derecesini etkileyecek olan lezyonun tipine bağlı olarak gelişecektir. Yaralarda ve cerrahi insizyonlardan sonra, iyileşme trombosit pıhtı oluşumu ile başlar, koagülasyon kaskadının aktivasyonu sonrasında trombosit degranülasyonu ile büyüme faktörleri salınımı ile devam eder.

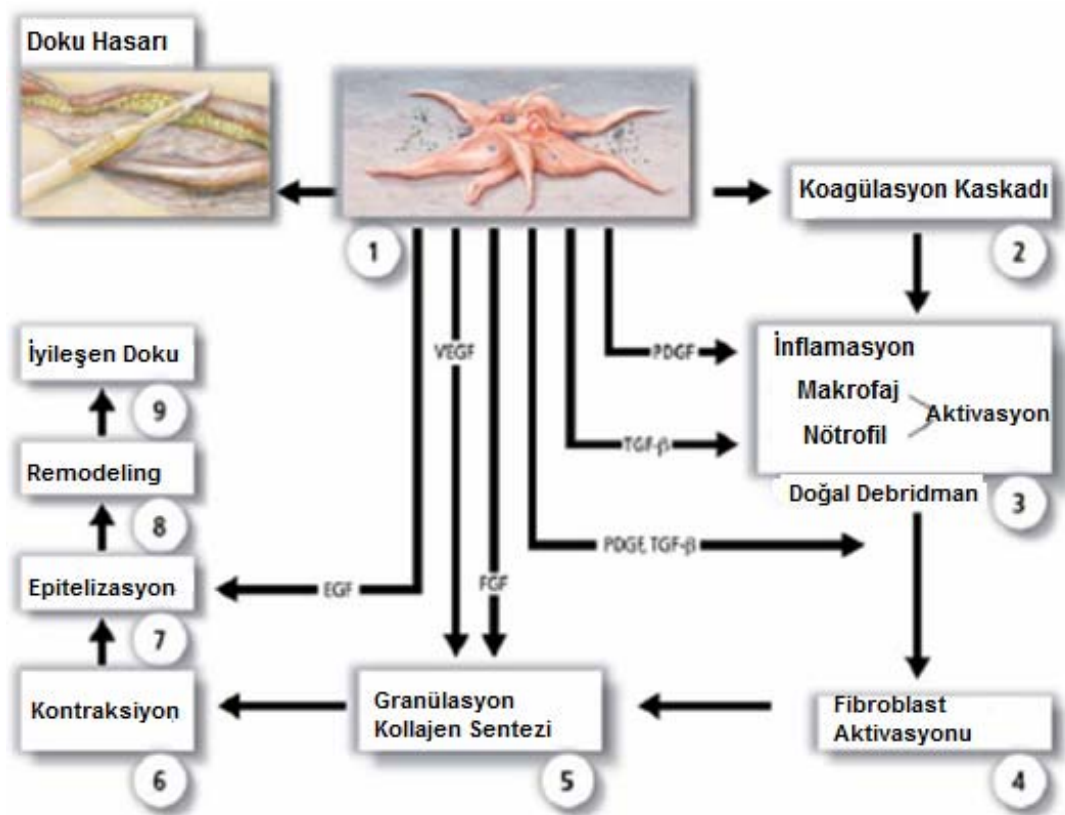


Şekil 6. İnflamasyon sırasında hücrelerin ortaya çıkış sırası

Pıhtı içindeki sinyal moleküller, nötrofil ve monositlerin yara bölgesine gelmesini sağlarlar. Nötrofiller, yarayı, yabancı cisimler, doku artıkları ve bakterilerden temizlerler. Komşu fibroblast ve keratinositleri aktive eden proinflamatuvar sitokinlerin kaynağı olarak da görev yapan nötrofillerin sayısı takip eden bir kaç gün içinde azalır ve sonunda makrofajlar ya da fibroblastlar tarafından fagosite edilirler. Bu aşamada, periferel kan monositleri yara bölgesinde artmaya devam etmektedir ve aktivasyonla makrofaj haline dönmektedir. Fibrin, pıhtıdaki fibronektin aracılığıyla, monosit ve fibroblastların toplanması için geçici matriksi oluşturur. Makrofajlar yaradaki bakteriyel, hücresel veya matriks kaynaklı artıkları fagosite etmeye devam ederler. Sırasıyla aktive makrofajlar; TGF-alfa ve beta, PDGF, IL-1 ve FGF gibi multipl büyüme faktörleri salgırlar (96). Anjiogenesisiz ve fibroplazi iyileşmenin 3. gününde yavaşça başlar, 3 ya da 5. günde kollajen sentezinin başlaması ile devam eder (Şekil 6)(99). Yaranın kırılma geriminin erken arttırılabilmesi, epitelizasyon ve remodeling süreçleri ile gelişir. Çeşitli evreler boyunca yara iyileşmesinde BF anahtar rol oynar (95,97). Şekil 7’de PDGF’nin iyileşme sürecindeki rolü gösterilmiştir (95). Böylece degranüle olan trombosit ve

nötrofillerin başlattığı ve yaranın tamirini yönlendiren sinyaller, makrofajlar tarafından devam ettirilmiş olur (98).

Büyüme faktörleri, hücrelerin büyüme ve fonksiyonlarını kontrol etmek amacıyla sistemik ya da lokal etki gösterebilirler. Kendilerini üreten hücrelerin de etkilenmesini sağlayan *otokrin* yolla etkilerini gösterebilecekleri gibi, daha sıklıkla, üretildikleri hücre tipinden farklı bir hücre tipini etkileyecek *parakrin* yolla etki gösterirler. Büyüme faktörleri aynı zamanda hücrelerin fenotipik durumlarını da kontrol ederler.



Şekil 7. TZBF inflamasyon basamaklarındaki etkileri

Doku iyileşmesinde yer alan diğer ajanlar; IGF I-II, PRGF (Plasminogen relate growth factor), HGF (Hepatocyte GF), MSP (Macrophage stimulating protein), NGF (Nerve growth factor), Aktivinler, BMP (Bone morphogenic protein), Kemokinler Proinflamatuvar sitokinler, GM-CSF, Leptin, IL-10

Trombosit kaynaklı BF yara iyileşmesindeki başlıca rolleri (90):

- Anjiogenezisteki artış sayesinde doku vaskularizasyonunu arttırmaları,
- Monositler, makrofajlar ve fibroblastlar için kemotaktik özelliklerinin olması,
- Kollajen sentezini arttırmaları,
- Epitel ve granülasyon doku üretim oranını arttırmaları,
- Osteogenezisi hızlandırmaları,
- Yüksek lökosit konsantrasyonu ile antimikrobiyal etki göstermeleri, yarada hemostatik ve lenfatik tampon görevi yaparak postoperatif sızıntıları önlemeleri ve ağrıyı azaltmaları,
- Acil cerrahide hemostatik ilaç olarak biyolojik uygunluk göstermeleri, etkili ve güvenilir olmalarıdır.

2.9. TZP'nin Tarihçesi

Fibrinojen ve trombin kombinasyonu klinik olarak ilk defa 1944'te askerlerin yanık tedavisinde deri greftlerinin adezyonunu arttırmak için kullanılmıştır (91). Koagülasyon faktörlerinin izolasyonu ve konsantrasyonu ile ilgili tekniklerin ilerlemesiyle 1970'lerde "fibrin yapıştırıcı"yla yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. TZP, fibrin yapıştırıcı değildir. TZP'de trombosit konsantrasyonu fibrin yapıştırıcıya göre daha fazladır. Ayrıca TZP'deki fibrinojen konsantrasyonu fibrin yapıştırıcıya oranla daha azdır. Daha az fibrinojen içerdiği için uygulandığı ortamda çok katı bir fibrin oluşmaz, bu nedenle yara iyileşmesini engellemeyip, aksine içindeki büyüme faktörleri sayesinde bu olayı hızlandırdığı düşünülmektedir. TZP'nin içindeki doğal fibrinojen konsantrasyonu TZP'nin cerrahi alana uygulanmasını kolaylaştıran jelatinöz, yapışkan kıvamını verir (92). Fibrin adezivleri birçok alanda başarılı sonuç vermesine rağmen bu ürünün kompleks olması ve çapraz enfeksiyon görülmesinden dolayı çok fazla ilgi çekmemiştir. Günümüzde trombosit konsantrasyon teknolojilerinin gelişmesiyle fibrin adezivlerin ve konsantre TZP elde edilmesi sabitleştirilmiş ve optimize edilmiştir (93).

Yapılan bir araştırmada (94), kronik iyileşmeyen ũlserlerin tedavisinde granũlasyon dokusunun epitelizasyonunu hızlandırmak için otolog trombosit faktörlerin kullanılabilceği ortaya konmuştur. Bu çalışmanın, kronik deri ũlserlerinin iyileşmesini hızlandıran, otolog kandan elde edilen aktive edici faktörlerin kullanıldığı ilk klinik uygulama olduğu bildirilmiştir.

1990 yılında BF'lerinin yara iyileşmesine etkisini inceleyen çalışmalar, önemli bir yer tutmaktadır. Öncelikle Kinghtons'un *platelet-derived wound healing factor (PDWHF)* ve sonra topikal uygulanan insan *platelet-derived growth factor bb (PDGFbb)* (Regranex, Ortho McNeal) ve bugün *platelet-rich plazma (PRP)*, yara iyileşmesinde kullanılan tedavi yöntemleri arasına girmiştir (95).

Otolog TZP ilk olarak Ferrari ve arkadaşları tarafından 1987 yılında kardiak cerrahide kullanıldı, açık kalp operasyonundan sonra homolog kan ürünlerinin transfüzyonundan kaçınmak için otolog transfüzyon komponenti olarak kullanıldı (96). Bu zamandan itibaren sayısı artarak birçok merkezde yumuşak doku iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda kullanılmaya başlandı. Maalesef çoğu olgu sunumlarından oluşan, küçük kontrolsüz olgulardan bazıları yayınlanmıştır (97-99). Bu çalışmaların çoğunluğu yumuşak doku iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda TZP kullanımının önemli etkilerini göstermiştir. Bununla birlikte, TZP uygulamasının hiç etkisinin olmadığını klinik ve deneysel olarak gösteren çalışmalarda vardır. Krupski ve arkadaşları ise plasebo ve TZP ile yaptıkları kontrollü çalışmada yukarıdaki araştırmacıların tam tersi sonuçlar elde etmişlerdir (100).

Rekombinant büyüme faktörleri saf insan büyüme faktörleridir, ancak doğal büyüme faktörü değildirler. Çoğunlukla çekirdeğine bir bakteriyel plazmid vektör yoluyla insan geni eklenmiş hamsterin over hücre kültürlerinde sentezlenirler (101, 102). TZP içinde biyolojik olarak oranları belirlenmiş, doğal büyüme faktörleri bulunur. TZP bir BF'ün özelliğini değiştirebilmekte veya düzenleyebilmektedir. Bu özellik TZP BF'lerini rekonbinant büyüme faktörlerinden ayıran en önemli farktır. Rekombinant büyüme faktörleri, yara bölgesinde yeterli fonksiyon göstermez çünkü doğal seviyedeki düzenleyici büyüme faktörlerinin oranı TZP büyüme faktörlerine göre oldukça düşüktür (103).

2.9.1. TZP'nin Avantajları

TZP nin daha fazla kullanılması için birçok özellikleri vardır. Bunların bazıları;

- Orijinal donörden alındığında otojen materyal olduğu için immün reaksiyona sebep olmaması. (Aktive edilmesi için kullanılan sığır trombinine karşı alerji riski olmasına karşın, çok küçük dozlarda kullanıldığı için, sistemik dolaşıma geçmeden uygulama yerinde tüketilip makrofajlarca artıkları temizlenir.)

- Hızlı iyileşme sağlaması: Yara bölgesinde yoğun trombosit konsantrasyonu ve büyüme faktörü sağlaması nedeniyle doku iyileşmesi ve rejenerasyonu artmaktadır. Kök hücre ve primer hücre migrasyon ve farklılaşması için scaffold (yapı iskeleti) görevi vardır.

- Toksik olmaması

- Operasyon sırasında veya öncesinde kısa sürede hazırlanması (Operasyon sırasında zaman kaybına neden olmaz.)

- Doku uyumlu olması

- Enfeksiyöz hastalıkların geçiş riskinin bulunmaması. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bir bulgu saptanmamıştır (95,109,110).

- TZP'nin içeriği, her yara yerindeki kan içeriği ile aynı olduğu için normal iyileşme halindeki yarada oluşan bakterilerden daha fazla bakteri oluşmaz. Olgun kan pıhtısının pH'sı 7.0-7.2 arasında değişir. TZP'nin pH'sı 6.5-6.7 olduğu için bakteri artışı engeller çünkü bakteriler düşük pH'lı asidik solüsyonlarda çoğalmazlar. Daha dogrusu TZP'nin normal kan pıhtısından daha az asitli olması, enfeksiyon riskini artırmaz. Bununla beraber TZP hazırlanmasında doktorların, aseptik çalışmaya dikkat etmeleri aynı zamanda FDA(Food and Drugs Administration) tarafından onaylanmış alet ve araçları kullanmaları gerekmektedir. Standart laboratuvar santrifüj aletlerinin kullanılması, kontaminasyon riskini artırmaktadır (95, 103, 104).

- GAG, kondrosit sentezi ve kıkırdak matriks sentezini artırır. Hyaluronik asidin eklem içi restorasyonu ve eklem içi damarlanmanın dengelenmesinde önemli bir rol alır. Ayrıca anti-inflamatuar, antibakteriyel, analjezik özellikleri vardır.

2.9.2. TZP'nin Kontrendikasyonları

TZP uygulamalarının genel olarak kanama bozuklukları ve hematolojik hastalıkların varlığında uygulanmasının kontrendike olduğu bildirilmiştir. Bunların yanı sıra, şiddetli hipovolemik durumlarda, anstabil anjina, hematokrit seviyesi %30'un altında olan hastalarda, akut miyokardial iskemi, hemodinamik instabilite, sepsis, fibrinolitik ilaç tedavisi, doku plazminojen aktivatörü (TPA, Tissue plasminogen activator) ya da streptokinaz kullanımı, ana koroner arter hastalıkları, trombosit sayısının 100'ün altında olması gibi durumlarda da TZP uygulamalarının kontrendike olabileceği belirtilmiştir.

TZP uygulamasının relatif kontraendikasyonları ise; 10^5 m/L'den daha az sayıda trombosit, HGB seviyesinin 10 g/dL'nin altında olması, metastatik hastalık yada yara yatağında tümör varlığı, hamilelik, aktif enfeksiyonun varlığıdır. HIV ve hepatit gibi hastalıkları olan ya da immünojenik reaksiyonları olanlarda otolog kan TZP üretiminden önce elimine edilmelidir.

2.10. TZP'nin Etki Mekanizması

Pıhtılaşma işlemi trombositleri aktive ettikçe hücrenin hücre membranı içerisinden büyüme faktörleri salgılanmaktadır (105). Bu sırada, α granülleri trombosit hücre membranı ile birleşir ve burada histon ve karbonhidrat zincirlerinin eklenmesiyle protein büyüme faktörleri biyoaktif hale geçer. Bu yüzden, TZP yapımı sırasında trombositler zarar görür ve varlığını sürdüremez hale gelirse biyoaktif büyüme faktörleri salgılayamazlar, bu da başarılı sonuçların alınmasını engeller (95). BF dokuya uygulandıktan sonra pıhtı retrakte olur ve degranüle olur, BF ekstrasellüler matrikste depolanır. Bundan sonra matriksin kimyasal yapısının değişmesi ile büyüme faktörleri salınır, trombositlerin hücre membranında bulunan tirosin-kinas reseptörlerine bağlanır ve bu hücreleri aktive eder. Gerçek bağlanma bölgesi hücrenin diğer yüzündedir. Büyüme faktörlerinin reseptörlerle birleşmesi sonrası, TKR'nin external parçası ile sitoplasmadaki messenger protein aktive olur.

Aktive olmuş TKR sitoplazmik kuyruğu artık messenger proteinler için bağlanma bölgesi olarak görev yapar. Bu aktivasyon ile hücre çekirdeğine girip hücre bölünmesini sağlayan hedef genlerin aktivasyon kaskadı başlar. Takiben, messenger RNA transkripsiyonu olur ve hücre tamiri ve rejenerasyonu kaskadı başlar (106, 107). Bunun önemi; mümkün olan en yüksek konsantrasyonda bile olsalar, büyüme faktörlerinin eksojen uygulanmasının neden hiperplazi, benign/malign tümör gibi uzun süreli bir aşırı reaksiyon oluşturmadığını açıklamasıdır. Büyüme faktörleri mutajenik değildir; normal gen regülasyonu ve normal yara iyileşmesi “feed-back” kontrol mekanizması ile çalışan doğal proteinlerdir (108).

2.11. TZP'nin Elde Edilmesi

Kan bankaları tarafından TZP'nin hazırlanması, plasmaferez metodu ile olabilir ancak yatak başı ayrıştırma araçları ile kıyaslandığında yüksek üretim maliyetine sahiptir ve TZP'nin elde edilmesi başarısız olabilir. Dahası kan bankasının hazırladığı TZP, klinisyenin ulaşabileceği yerde olmayabilir ve hastaya uygulamadan önce karşılaştırma yapılması için yüksek kontrollü lojistik sistemi gerektirmektedir.

TZP ilk olarak 1970'lerde geliştirilmesine rağmen kullanılan sistemlerin yüksek miktarda hasta kanı gerektirmesi kullanımlarını kısıtlayıcı etken olmuştur. Son yıllarda hızlı bir şekilde yeni cihazlar ve ekipmanlar geliştirilerek çok daha az miktarda kanla trombosit konsantrasyonu olarak ayrıştırılmakta ve trombosit konsantrasyonu dışındakiler yeniden hastaya verilmektedir (109). Literatürde tanımlanmış olan başlıca TZP hazırlama yöntemleri Apheresis, Platelet Concentrate Collection System (PCCS), Harvest SmartPREP, Curasan, Friadent-Schütze, Platelet Rich-in-Growth Factors (PRGF) olarak sayılabilir.

Aferezis yöntemi ile hastadan 400–450 ml venöz kan alınarak TZP hazırlanmaktadır. Alınan venöz kan direkt olarak santrifüj sistemine geçmektedir. Bu esnada kan iki aşamalı bir sedimentasyon işlemi ile eritrosit, trombosit ve plazma komponentlerine ayrılmaktadır. İstenen komponent istenen hacime ulaştıkça ayrı bir kısma geçip sistemden ayrılmaktadır. Tüm işlemler istenen hacimde TZP elde edilene kadar tekrarlanmakta ve artan kan komponentleri sistem aracılığı ile hastaya geri döndürülmektedir (110).

PCCS metodunda ise hastadan 60 ml kadar venöz kan alınıp 3000rpm'de 3 dk 45 sn santrifüj edilmektedir. Daha sonra trombosit içeren plazma kısmı cihazdaki farklı bir bölmeye aktarılarak 3000 rpm'de 13 dk süreyle ikinci santrifüj işlemi uygulanmaktadır. İkinci santrifüjü takiben elde edilen komponent (TZP) yaklaşık 10 ml'dir (111).

Harvest SmartPRep yönteminde hastadan 50 ml kadar venöz kan alınıp 12 dk süreyle iki aşamalı bir santrifüj işlemine tabi tutulmaktadır. Bu aşamanın sonunda kan trombositten fakir plazma (PPP), TZP ve eritrositler olmak üzere üç komponente ayrılmaktadır. Daha sonra TFP kısmı atılıp kalan kısım TZP ve eritrositler tamamen ayrılana kadar santrifüj işlemi yapılmaktadır. İşlem sonucunda 7 ml kadar TZP elde edilmektedir (112).

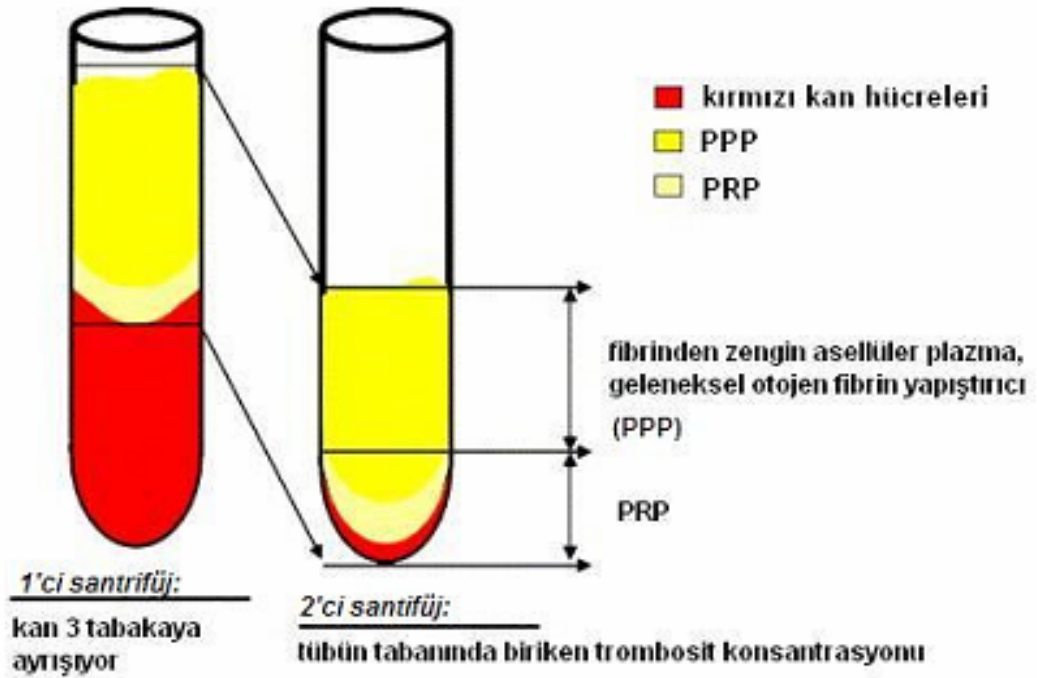
PRGF yönteminde tüp başına 5 ml venöz kan alınıp 1500 rpm'de 6 dk santrifüj edilmekte ve kan 3 komponente ayrılmaktadır. Bu komponentlerden orta kısımda trombositlerin yoğun olduğu düşünülerek bu tabaka ve üstteki trombositlerin en fazla %15'ine sahip olduğu düşünülen fakir tabakanın bir kısmı alınarak operasyonda kullanılmaktadır. İşlem sonucunda tüp başına 1.2 ml TZP elde edilmektedir (113).

Curasan yönteminde hastadan 8.5 ml venöz kan alınıp ilk olarak 2400 rpm'de 10 dk santrifüj edilmektedir. Bu ilk santrifüj sonunda dipte kalan eritrosit kısmı atılıp kalan kan komponenti içerisinde trombositleri ayırmak için 3600 rpm'de 15 dk süreyle ikinci bir santrifüj işlemi yapılmaktadır. Bu aşama sonunda yaklaşık 0.8 ml TZP elde edilmektedir (116).

Friadent-Schütze metodu ise Curasan metodu ile oldukça benzerdir. Yalnız hazırlık sırasında kullanılan tüpler farklılık göstermektedir (114). PRGF, Curasan gibi yöntemlerde hastadan az venöz kan alınarak işlemlerin gerçekleştirilmesi özellikle sistemik problemi olan hastalarda uygulama yönünden avantaj olarak gözükmektedir. Ancak geniş cerrahilerde daha fazla TZP jeline ihtiyaç duyulan durumlarda bu yöntemlerle elde edilen TZP yetersiz kalabilmektedir. Apheresis sisteminde çok fazla kanın sisteme girip çıkması dezavantajlı bir durum olarak göze çarpmaktadır.

Antikoagüle edilmiş kan belli bir merkez kaç kuvvetine maruz bırakılır. Buradaki amaç kanda bulunan şekilli elemanların ağırlıklarına göre çökmesini sağlayarak istenen kan fraksiyonunu (trombosit) belirli bir bölgede toplamaktır. Antikoagülan ile karıştırılmış ve tüpe yerleştirilmiş kan ilk santrifüj sonrasında iki kısma ayrılmış gibi görünmektedir. Ağırlıklarından dolayı eritrositler tüpün alt kısmında birikirken (dansite 1.09), üst kısımda sarı renkli plazma bulunur (dansite 1.03). Demarkasyon hattı: Kırmızı kan hücreleri tabakasının üstünde beyaz bir hattır. Bol miktarda trombosit ve beyaz kan hücresi içerir. Aşağı inildikçe trombosit konsantrasyonu düşmektedir (84, 85). (Şekil 8) (115)

Oransal olarak %55'i kırmızı kan hücreleri (eritrositler), %40'ı TFP (trombositten fakir plazma) ve %5'i *buffy coat*'dır (kombinetrombositler ve lökositler).



Şekil 8. Trombosit santrifüjü.

2.12. TZP'nin Saklanma ve Etki Süresi

TZP'nin PDGF ve TGF- β içeriğinin uzun saklama periodlarında azaldığı ve venöz kan alımı sonrasında 4 saat ile 3 gün arasında hücre büyümesini stimüle edici etkilerinin kademeli olarak azaldığı bildirilmiştir (116). Trombositlerin agregasyon cevaplarında da saklandıkları süreç içinde belirgin bir düşüş saptandığı rapor

edilmiştir. Otojen hazırlanan TZP materyalinin, hazırlandıktan sonra en kısa zaman içinde kullanılması gerektiği, özellikle ilk 6 saat içerisinde kullanımının materyal kontaminasyonu ve hastalık taşıyıcılığı risklerini düşük tutmada önemli olduğu bildirilmiştir (117, 118).

Kan pıhtısının TZP olarak nitelendirilebilmesi için gereken minimum trombosit sayısı tartışmalıdır ancak yaklaşık 1.000.000 trombosit/ μL konsantrasyondaki veya başlangıç trombosit sayısının (200.000 trombosit/ μL) yaklaşık 4-7 katı trombosit konsantrasyonunun klinik yarar sağladığı gösterilmiştir. Günümüzde, trombosit yoğunluğunun TZP'nin rejenerasyon kapasitesini direkt olarak etkilediği bilinmekte ve buna dayanarak doku iyileşmesinin artırılabilmesi için trombosit konsantrasyonun 1.000.000/ μL olması gerektiği düşünülmektedir (101, 114).

Normal kan pıhtısında %94 eritrositler, %6 trombositler ve %1'den daha az lökositler bulunurken; TZP kan pıhtısında ise %94 trombositler, %5 eritrositler ve %1 lökositler bulunur. İyileşmeyi stimüle etmeyen hücrelerden (eritrositler); iyileşmenin tüm safhalarını stimüle eden hücrelere (trombositler) yer değiştirme şeklinde gerçekleşen bu olay, iyileşmenin hangi yolla gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca bu durum, trombosit sayısını artırarak aynı zamanda iyileşmede önemli olan büyüme faktörlerini de arttırmada TZP'nin stratejisini ve faydasını ortaya koymaktadır (113).

TZP koagüle olmamış durumda hazırlanıp, pıhtılaşma başlamasından 10 dakika içinde grefte, flebe veya yaraya uygulanmalıdır (105). TZP'nin 8 saatten fazla saklanması önerilmemektedir. Bunun dışında kriyopresipitat olmadan buzdolabında saklanırsa trombosit membranlarına zarar verilir (113).

2.13. Doku İyileşmesi ve Sitokinler

Büyüme faktörleri, hücre bölünmesi ve büyümesini sağlayan maddelerdir. Bunun için iki mekanizma vardır;

- Hücrelerin komponentlerini bölünmeye hazırlarlar,
- Bölünme olayındaki gelişmeyi sağlarlar.

Sitokinler (polipeptid büyüme faktörleri) hücreler arasındaki tüm etkileşmeyi sağlar. Son yıllar içerisinde sitokinlerin yara iyileşmesi üzerine olan etkileri açıkça belirlenmiş olup, potansiyel klinik uygulamaları yeni anlaşılmaktadır. Yara iyileşmesinin birçok evresinde sitokinler önemli farmakolojik roller üstlenmektedir. Örneğin sitokinler fibrozisin, kronik yara iyileşmesinin ve vaskülarizasyonun regülasyonunda, tamirden sonra tendon kuvveti ve kemiğin büyümesinde rol oynamaktadır.

Sitokinler yara alanına hücre migrasyonunu stimüle eder ve matriks onarımı için gerekli spesifik komponentleri açığa çıkarırlar. Bu spesifik komponentler proteinler, enzimler, proteoglikanlar ve glikoprotein yapılarıdır. Sitokin terminolojisi kompleks, biraz da karışıktır. PDGF gibi bazıları orijin aldığı hücreden isimlendirilir, epidermal growth faktör gibi bazıları etkilerine göre isimlendirilir. Bazıları da ilk rapor edilen etkilerine göre isimlendirilir (119).

Normal bir yara iyileşmesinde sinyal molekülü olarak görev alan pek çok polipeptid büyüme faktörü bölgedeki ve komşu alanlardaki hücrelerin aktivasyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (120). Polipeptid büyüme faktörleri proliferasyon (mitogenez), kemotaksis (yönlendirilmiş migrasyon), farklılaşma ve matriks sentezi (biyosentez) gibi rejenerasyona ait kilit hücrel olayları düzenleyen bir doğal biyolojik medyatör grubudur (121).

2.14. Trombositteki Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörlerini iki grupta sınıflandırabiliriz, morfometrik ve mitojenik. Morfometrik büyüme faktörleri, kemik büyümesini içeren sınıflanmamış multipotent mezenkimal kök hücre (MSC) leri immatür ve matür osteoprogenitör hücrelere, kemik morfojenik proteinleri (BMP) varlığında dönüştürmektedir (122). Bu BMP büyüme faktörleri TGF- β süper ailesinin üyeleridir ve ayrıca TZP içinde de bulunur.

TZP içindeki çoğu BF'nin iyileşme hücrelerinin bölünen populasyonunun arttıran mitojenik aktivitesi vardır. Ancak bu aktivite daha fazla farklılaşmış MSC (Mesenchymal Stem Cells) varlığına bağlıdır.

2.14.1. PDGF (Platelet derived growth factor) Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

30 kD ağırlığında, yüksek derecede bazik özellikli, dimerik bir glikoproteindir. Isıya dayanıklı, katyonik, polipeptid yapıda ve pıhtılaşmış kan serumunda ençok miktarda bulunan büyüme faktörüdür. İlk olarak fibroblast ve düz kas hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinden dolayı ‘trombosit kaynaklı mitojen’ olarak tanımlanmıştır. İki adet disülfid bağı ile bağlanmış polipeptid yapıdaki A ve B zincirlerinden oluşur. A ve B zincirlerinin olgun formları yaklaşık 100 aminoasit içerir ve bu aminoasitlerin 50 kadarı birbiri ile aynıdır. A ve B polipeptid zincirlerinin oluşturdukları homo ve heterodimerlere göre, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB olmak üzere 3 farklı izoformu vardır. İki adet tirozin kinaz reseptörü vardır; alfa (α) ve beta (β). Reseptörlerden α -reseptör A ve B zincirlerini bağlarken, β -reseptör sadece B zincirini yüksek afinite ile bağlar. Klasik hedef hücreleri, her iki reseptörü de içeren fibroblastlar ve düz kas hücreleri olmasına karşın, glial öncü hücreleri, trombositleri ve endotel hücrelerini de etkiler. İn vivo olarak embriyonik gelişimde, santral sinir sistemi gelişiminde, vasküler sistem gelişiminde, doku homeostazında ve yara iyileşmesinde çeşitli görevleri vardır (123, 124).

PDGF sadece trombositlerin alfa-granüllerinde değil, ayrıca monositler, makrofajlar, düz kas hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, epidermal keratinositler gibi pek çok farklı hücre tarafından da sentezlenir ve salgınır. PDGF, fibroblast, mezenşimal hücreler ve düz kas hücrelerine güçlü mitojenik etkisinin yanı sıra, nötrofil ve makrofajların kemotaksisini artırır (125, 126). Ayrıca etkisi interferon- γ sayesinde daha da artar.

Yara iyileşmesinde fibroblast çoğalmasını ve bu hücreler aracılığı ile hücre dışı matriks yapımını artırır. Fibroblastları kollajen matriks ile temas etmeleri için uyarır ve bu hücrelerde miyofibroblast fenotipini arttırmaya çalışırlar (127).

2.14.2. CTGF (Connective tissue growth factor) Bağ Doku Büyüme Faktör

Kubota ve arkadaşları CTGF olarak bilinen yeni bir BF tariflemişlerdir (128). Yara bölgesindeki hasarlı dokudaki CTGF'ye trombositler göç eder. Deneylerinde

aktive olmamış trombositlerin yeterli miktarlarda CTGF içerdikleri ve aktive TZP ile salındıkları gösterilmiştir. Ayrıca CTGF bileşiği trombositlerde BF'den 20 kat daha fazla bulunur ve CTGF angiogenik aktivite, kırıldak rejenerasyonu ve fibrozisi sağlamaktadır. Cicha ve arkadaşları CTGF'nin kemik iliği hücrelerinden salındığını göstermişlerdir, sadece trombosit üreten megakaryositlerde değil ayrıca trombositlerdeki bu kadar yüksek miktardaki CTGF kemik dokunun ekstraselüler ortamdan hücre içine endositozu ile sağlandığı düşünülmektedir (129). CTGF BF ailesinin önemli bir üyesi olarak düşünülmektedir.

2.14.3. TGF- β (Transforming growth factor-beta) “Transforming” büyüme faktör- β

İlk olarak 1983 yılında plasenta kaynaklı olarak elde edilmiş ve kültür ortamında fibroblast proliferasyonunu sağladığı görülmüştür. Asidik yapılı, 25 Kd ağırlığında homodimerik bir büyüme faktörü olup, orijinal olarak normal hücreleri malign hücelere çevirdiği düşünüldüğü için bu isim konmuştur; ancak daha sonra malign dönüşüm etkisi olmadığı anlaşılmıştır. Transforme edici büyüme faktörü α ve β (TGF- α ve TGF- β), sağlıklı ve neoplastik dokulardan izole edilen büyüme faktörüdür. TGF- α tek zincirli bir polipeptid iken, TGF- β disülfid bağlı iki amino asit zincirine sahip, dimerik bir polipeptiddir.

TGF- β 'nin kendisi, aktivinler, bone morfojenik proteinler gibi 30'dan fazla protein TGF- β ailesini oluşturur (130). TGF- β farklı dokularda üç farklı izoform şeklinde bulunmaktadır. (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) ve bu formların polipeptid dizilimleri %60 oranında aynıdır. Hedef hücrelerde RI, RII ve RIII olarak adlandırılan membran reseptörlerine bağlandıklarında, hücre içi serin-treonin protein kinaz aktivasyonuna neden olurlar. TGF β 1 ve TGF β 2' nin etkileri;

- Hücre replikasyonunu uyarırlar.
- Matriks üretimini uyarırlar.
- Osteogeneziste osteoblastların proliferasyonunu uyararak kemik kollajen sentezini direkt olarak etkilerler.

TGF- β vücutta trombosit, makrofaj, lenfosit, fibroblast, kemik hücreleri ve keratinositler gibi pek çok farklı hücreden sentezlenebilir ve hemen hemen tüm

hücrelerin duyarlı oldukları bir faktördür; ancak her hücre tipinin bu faktöre yanıtı farklılık gösterir çift fonksiyonlu ve pleotropiktir. Makrofajlardan kendi salınımını regüle ederken, monositleri FGF, PDGF gibi diğer büyüme faktörlerinin salınımı için uyarır. TGF- β hücre tipine, büyüme koşullarına ve ortamda bulunan diğer büyüme faktörlerine göre, çeşitli hücrelere stimülatör ya da inhibitör etkiler gösterebilir TGF- β MSC dışındaki çoğu dokuda hücre büyümesini inhibe edici etkidedir.

İnflamatuar hücre kemotaksisini, ekstra-sellüler matriks sentezini fibroblastlarda fibronektin ve tip 1 kollajen üretimini stimüle eder. TGF- β matriks metalloproteinaz ve plazminojen aktivatörlerinin sentezini azaltarak bağ dokusu matriksinin yıkımını yavaşlatır (131).

Özellikle yara iyileşmesinde esas görevi olan hücrelerin proliferasyonu, diferansiasyonu ve gen ekspresyonunu etkileyerek, bazı fibrotik hastalıkların da patogenezinde rol alır. Ekstra-sellüler matrikse mitojenik, kemotaktik ve anabolik etkileri olup, inflammatuar ve immun cevabın hem hücresel hem de hümorale basamaklarında rol alır (128). Yara iyileşmesinde özellikle keratinositlerin proliferasyon ve göçüne neden olur. Anjiogenezin başlaması için gerekli olan fibroblastlardan kollajenaz üretimi ve kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar (132). Granülasyon dokusu oluşumunu başlatmayada yardımcı olur. Yara iyileşmesinin geç fazı olan güçlenme ve remodeling fazında da etkileri vardır (125, 133).

İnaktif şekilde salgılanırlar. Plasmin, trombin, matriks metalloproteinazlar (MMP2 ve MMP9), trombospondin 1 aktivasyonunda rol alır. TGF- β aynı zamanda yara matriksi tarafından da üretilir ve burada sekestre edilerek proteolitik enzimler aracılığı ile sürekli salınımı sağlanır. Birçok çalışmada TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin hızlı bir şekilde yaralanmanın erken döneminde uyarıldığı, TGF- β 3'ün ise doku onarımının geç dönemlerinde arttığı gösterilmiştir.

TGF- β 1, kendi gen transkripsiyonuna neden olarak kendi kendinin yapımını uyarır ve doku iyileşmesinin tüm süreçleri boyunca varlığını sürdürür. Miyofibroblastların yaşamını, sinyal yolağını tetikleyerek uzatır ve fibrozis oluşumunda etkilidir. Dermal fibroblastlardaki TGF- β 1, CTGF (connective tissue growth factor) yapımını da uyarır (134). TGF- β in vitro olarak PDGF ile birlikte

fibroblastların büyümesini stimüle ederken EGF ile birlikteyken inhibe etmektedir (135) VGF ve TNF- α ile birlikte olduğunda maksimum anjiyenik etkisini gösterir.

2.14.4. PDEGF (Platelet-Derived Epidermal Growth Factor=Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü)

İlk kez 1962 yılında Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibuler bezinden izole edilmiştir ve tanımlanan ilk BF dır. Cohen elde ettiği bu maddeyi yeni doğan farelere anjekte ettiğinde erken göz kapağı açılması ve epidermis gelişimini arttırıcı etkisinden dolayı; bu maddeye Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) adını vermiştir. Birçok memeli türünün doku ve vücut sıvılarında bulunan tek zincirli, 53 aminoasit içeren bir proteindir ve yapısal olarak TGF- α ile benzerdir. Mitojenik etkili bir polipeptittir. Subkutan yolla enjekte edildiğinde 48 aminoasit'e dönüşüp etkin forma dönüşmektedir. Endotel hücreleri, fibroblastlar ve sinir sistemi destek doku hücreleri için mitojeniktir (139,123). Primer olarak trombositlerde üretilir, ancak makrofaj ve monositlerde de bulunur. Tükruk bezleri, duodenal bezler, böbreklerde, idrar ve sütte bolca bulunur. EGF, yaraya keratinositlerin migrasyonunu arttırarak epitelizasyonu hızlandırırken, yaranın fazla kontraksiyonunu da engelleyerek skar oluşumunu azaltır.

2.14.5. PDAF (Platelet-derived Angiogenesis Factor =Trombosit Kaynaklı Anjiogenezis Faktör)

Deneyssel olarak PDAF'nin vaskularizasyonu arttırıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Vasküler endotelyal hücreleri direkt veya indirekt yoldan etkilerler. Damarlanmanın olmadığı dokularda yeni kan damarlarının gelişmesini sağlarlar. Bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin düzenlenmesi PDAF tarafından yapılır. Bunlar, IGF-I, TGF α ve β , PDGF, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), PDEGF ve interlökin 1 β (IL-1 β) dir. Bu faktör hipoksi durumunda oldukça hızlı bir şekilde bölgede yerini alır (139).

2.14.6. VEGF Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular endothelial growth factor)

VEGF'ün, tümör hücrelerinden salgılanan, damar geçirgenliğini arttırarak asit oluşumuna katkıda bulunan bir madde olduğu düşünölmüş ve bu nedenle 1983'te "vascular permeability factor" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar doğrultusunda VEGF olarak ismi değiştirilmiştir, en kuvvetli fizyolojik ve patolojik anjiogenez uyarıcısı olduğu tespit edilmiştir (136, 137). Homodimerik yapıda, 34–46 kDa ağırlığına, glikoprotein yapıda bir faktör olup, plasental büyüme faktörü ve PDGF ile yapısal benzerlik gösterir. 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.

Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast, inflamatuvar ve endotelial hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir ve vasküler geçirgenliği arttırır (138-140).

İlk olarak tümör hücreleri tarafından sentez edildiği bulunmasına rağmen, endotel hücreleri, makrofaj, düz kas, lenfosit, monosit, nötrofiller, trombositler, keratinositler ve astrositler gibi birçok farklı hücre tipi tarafından da doku hipoksisine ve düşük glukoz değerlerine cevap olarak salınır. İnsanlarda, yara ve kırık iyileşmesi sırasında normal olarak salınmaktadır.

Yaralanma sonrası hasar bölgesinde, VEGF ve VEGF mRNA hızla artar ve bu artıştan birincil olarak nötrofil ve fibroblastlar sorumludur. Yaralanma alanında vasküler zedelenmeye bağlı oksijen miktarı azalır; oluşan hipoksi VEGF mRNA'sını güçlü şekilde stimüle eder (138).

2.14.7. IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I=İnsülin benzeri büyüme faktörü)

Ağırlığı 7.500 dalton olan tek zincirli polipeptit bir hormondur. İnsülin büyüme faktörü (IGF-I ve IGF-II) ailesi, proinsülin ile % 49 benzerlik gösteren tek zincirli serum proteinleridir. Somatomedinler olarak da anılırlar. IGF-I ve IGF-II, 7,7 kd ve 7,5 kd moleküler ağırlığı ile diğer büyüme faktörlerine göre daha küçük

proteinlerdir, kendilerine ait hücre membrane reseptörüne bağlanarak fonksiyon görürler. İnsanda en çok IGF-II bulunmaktadır (141).

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. Dolaşımdaki IGF-1'in protein sentezini, periferel glukoz alımını, glikojen sentezini, sinir sağkalımını, miyelin sentezini, kemik oluşumunu arttıran anabolik etkileri arttırdığı, kaslardaki protein yıkımı gibi katabolik etkileri azalttığı bilinmektedir (142).

Doku büyümesi, gelişimi ve rejenerasyonunda etkileri vardır. Büyüme hormonu etkisini IGF-1 üzerinden göstermektedir. Embriyonel gelişimde ise IGF-2 daha etkin olarak rol oynar. Deneysel olarak diyabetik hayvanlarda, steroid kullanımı ile inflamatuvar yanıtı baskılanmış hayvanlarda ve yanık yaralarında olumlu etkileri olduğu görülmüştür (124, 126).

IGF-I transkriptleri yaradaki makrofajlardan izole edilmiştir. Bu da bu büyüme faktörlerinin lokal haberci (parakrin etki) olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir. IGF-I in PDGF ile kombinasyonu yara iyileşmesinin kalite ve kantitesini arttırabilir (143).

2.14.8. FGF-1 ve FGF-2 Fibroblast Büyüme Faktörü 1 ve 2 (Fibroblast growth factor)

İlk olarak sığır hipofiz bezinden elde edilmiştir. Fibroblast büyüme faktörleri mitojenik polipeptid ailesidirler. Aminoasitleri benzer, ancak izoelektrik potansiyelleri farklı olan iki proteini içerir: FGF-1 asidik fibroblast büyüme faktörü, FGF-2 bazik fibroblast büyüme faktörü. (bFGF) Polipeptid yapıda 22 üyeden oluşan bir ailedir.

Endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, nöral hücreler ve keratinositler tarafından üretilebilirler ve ikisi de mezoderm ve nöroektoderm kökenli hücreler için kuvvetli mitojenik etkilidir. TGF- β 'nın dağılımını arttırıcı etki yapar (144, 145). Yara iyileşmesinde rolü olan endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, epitel hücreleri, kondrositler ve myoblastlar gibi pek çok hücrede, proliferasyonu ve

migrasyonu stimüle ederler. Kollajen, fibronektin, proteoglikan sentezini arttırlar (128).

VEGF ve TNF- α ile birlikte olduğunda maksimum anjiojenik etkisini gösterir. Yara iyileşmesinde özellikle keratinositlerin proliferasyon ve göçüne neden olur. FGF7 (keratinosit büyüme faktörü), epitelyal hücrelere spesifik etkiye sahiptir. FGF'lerin ifadesi yaralanmadan sonra artar en dramatik etki FGF7'de gözlenir (24 saat içinde 100 kat artar) (131).

2.14.9. PF-4 (Platelet Factor 4=Trombosit faktör 4)

Trombositlerin α granüllerinden salınan PF-4 nötrofiller ve fibroblastlar için bir kemoatraktandır. Aynı zamanda güçlü bir antiheparin ajandır (78).

2.15. TZIP'nin Kullanım Alanları

Periodontal, oral cerrahi ve kemik iyileşmesi: TZIP'nin olumlu etkileri ilk olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki saptanmış olup, maksillofasiyal ve çene cerrahisi alanlarında klinik kullanıma girmiştir. TZIP, in vitro ortamda fetal osteoblast benzeri hücrelerin rejenerasyonunu ve fonksiyonel aktivitelerini arttırmanın yanı sıra, mezenkimal kök hücrelerin bölgeye migrasyonunu da sağlamaktadır (92, 119, 146). Ayrıca in vitro çalışmalarda, TZIP içerisinde bulunan PDGF ile insan trabeküler kemik hücrelerinde ve osteoblast benzeri hücrelerde proliferasyonun stimüle olduğu gösterilmiştir (147). Ek olarak, antikoagülan tedavi almakta olan hastalarda diş çekimi sonrası kanama kontrolü sağlamak amacıyla kullanılmış, hemostazı başarılı bir şekilde sağladığı görülmüştür (148).

Plastik ve kozmetik cerrahi: TZIP'nin özellikle adeziv ve hemostatik etkileri göz önüne alınarak, yüz germe operasyonlarında, üst ve alt göz kapağı blefaroplastilerinde, cilt greftlerinde, kemik greft donör alanlarında, kemik rekonstrüksiyonunda ve insizyonların dikişsiz kapatılmasında kullanımı mevcuttur. Lazer ile yüz gençleştirme sonrası biyolojik pansuman olarak kullanıldığında, daha hızlı iyileşme ve eritemde daha hızlı azalma gözlenmiştir. Yağ greftlerine TZIP eklendiğinde, emilmeden daha uzun süre kontur revizyonu sağladığı saptanmıştır (149). Jackson'ın yaptığı bir çalışmada, abdominoplasti sonrası flep altlarına TZIP

enjekte edilmiş ve bu uygulama ile seroma oluşumunda belirgin azalmanın yanı sıra, daha kaliteli ve hızlı yara iyileşmesi elde edilmiştir (150). Man ve ark. estetik amaçlı cerrahilerde TZP ve fibrin yapıştırıcının kombine kullanımı ile operasyon süresinde kısalma, diren gereksiniminin ortadan kalkması, kapalı pansuman ihtiyacının azalması, ameliyat sonrası dönemde ağrı ve ödem şikayetlerinde azalma gibi avantajlar sağladığını bildirmişlerdir (151).

Spinal cerrahi: Ortopedik cerrahide ilk kullanım alanı diyabetik yaralar ve omurga füzyonu olmuştur (152). Spinal füzyon ameliyatlarında titanyum implantlar etrafına uygulanan TZP ile kemik rejenerasyonunda artış olduğu görülmüştür (153). Lowery ve ark. (154) büyüme faktörlerinden zengin TZP kullanımı ile lomber omurilik bölgesinde kemik füzyonunda erken maturasyon elde etmişlerdir.

By-pass cerrahisi: Del Rossi ve ark. (155), kardiyo-pulmoner by-pass cerrahisi sonrası otolog TZP infüzyonu ile postoperatif dönemde daha kolay kanama kontrolü ve hematolojik parametrelerde düzelme sağlanabileceğini bildirmişlerdir.

Ligaman ve tendon iyileşmesi: TZP içerisinde bulunan büyüme faktörlerinden PDGF ile yapılan tendon ve ligaman iyileşmesi üzerine çeşitli deneysel çalışmalar mevcuttur ve bu büyüme faktörünün ligaman ve tendon onarımını desteklediği gözlenmiştir. Bu gözlemden yola çıkarak Aspenberg ve ark.'nın (156) sıçanların aşil tendonlarında yaptıkları çalışmada, aşil tendon rüptürünün onarımında TZP ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Hücre kültür çalışmaları, tendon iyileşmesi ile ilişkili olan olayları TZP'nin stimüle edebileceğine dair kanıtlar sağlamıştır. Bazı araştırmalar TZP ile muamele edilmiş insan tenositlerinde artmış kollajen gen ekspresyonu ve vasküler endotelial büyüme faktörü ve hepatosit büyüme faktörü üretiminde artış olduğunu bulmuştur (157, 158). TZP ile muamele edilmiş insan tenositlerinde aynı zamanda MMP (matriks metalloproteinaz) gen ekspresyonunda artış olduğu bulunmuştur ama tendon iyileşmesinde matriks metalloproteinazların önemi halen bilinmemektedir (159). Ek olarak, Kajikavva ve ark. yakın zamanda TZP'nin dolaşımdan sağlanan hücrelerin enjeksiyon sahasına mobilize olmasını uyardığını ve tip I kollajen üretimini uyardığını bildirmiştir (160). TZP'nin tendon tamirinde başlangıç inflamatuvar fazını

hızlandırabileceğini ve erken mekanik yükleme için hücreleri daha hazır duruma getirileceği sonucuna varmıştır (161).

Yara iyileşmesi: TZP ile muamele edilen yaralarda epiteliyal diferansiasyon, dermal matrikste organizasyon daha düzgün olmakta ve vasküler büyüme, fibroblast proliferasyonu, kollajen üretimi artarak epitelizasyon daha hızlı gerçekleşmektedir (94, 162, 163). Haynesworth ve arkadaşları erişkin insan mesenkimal kök hücrelerinde (ahMSC) in vitro koşullarda TZP'nin hücrel mekanizmalar üzerindeki cevaplarını araştırmıştır. Yumuşak doku ve kemik doku iyileşmesinde, ahMSC'ler tamir sürecinin çok önemli komponentleridir (164, 165). TZP büyüme faktörlerinin salınımı ahMSC'lerin proliferasyonunu ve migrasyonunu uyarır. Önemli hücrel cevap ile trombosit sayısını 4-5 katına çıkmasını sağlamaktadır. Başka bir çalışmada ise; Liu ve arkadaşları fibroblast proliferasyonu ve tip I kollajen üretiminin TZP'deki trombositlerle 4 ila 5 katı artışının sağlandığını bildirmektedirler. (166).

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 (167).

İskelet kasında, TZP'deki büyüme faktörlerinin laboratuvar çalışmalarında inflamatuvar fazı düzenlediği ve iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir. Tartışma bölümünde daha ayrıntılı bahsedilecektir.

Yumuşak doku iyileşmelerinde, TZP'nin fleplerin revaskülarizasyonu ve reepitelizasyonu ile hücre proliferasyonunu hızlandırdığı için, yumuşak doku iyileşmesini de hızlandırdığı düşünülmektedir. Bu nedenle, flep sınırlarına ve altta kalan dokulara uygulanması daha iyi sonuç verebilir (108).

Marx ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, TZP'nin yumuşak doku iyileşmesine üzerine olan etkileri araştırılmış ve elde edilen sonuçlarda, split-thickness deri greftlerinde TZP'nin etkilerine bakıldığında, yara izinin azaldığı ve ilk hafta boyunca ağrının minimuma indiği (% 40), yara kontraksiyonu ve düzelmiş pigment rejenerasyonu ile daha erken normal deri rengine döndüğü rapor edilmiştir (108).

Sinir iyileşmesi: Sinir iyileşmesi üzerine TZP kullanılarak yapılmış fazla çalışma mevcut değildir. Özellikle PDGF'ün nörotrofik aktivitesi gösterildikten sonra, TZP'nın sinir iyileşmesinde de etkili olabileceği üzerinde durulmaya başlanmıştır

Oküler cerrahi: Maküladaki tam kat eksikliklerin tedavisinde ve retinal yaralanmalarda proliferatif hücre cevabını artırdığı bildirilmiştir (168).

3. MATERYAL ve METOD

Çalışmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 02.03.2010 tarih ve 01 sayılı etik kurul kararı ile Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarında (HÜDAL) gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan tavşanlar bu merkezden temin edildi. Tavşanların izlemi, tavşanlara yapılan tüm girişimler yine bu merkezde gerçekleştirildi. Çalışma 03.05.2010 ile 09.06.2010 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmamızda 20 adet, ağırlıkları 2400- 2700 gr arasında değişen Yeni Zellanda tipi tavşanlar kullanıldı. Tavşanların bakımı ve beslenmesi merkez çalışanları tarafından sağlandı. Tavşanların hepsi standart tavşan yemi ile beslenip, aynı ölçüdeki kafeslerde ayrı olarak tutuldu. Sağlık durumları sıklıkla kontrol edildi. Tavşanlar çalışma döneminde aynı besinlerle ve aynı miktarlarda beslendiler.

3.1. Standart Hazırlık

Anestezi ve travma uygulamaları için; eldiven, ketalar (ketamin hidroklorid), alfaziline (xylazine hidroklorid), betadine (povidone-iodine), enjektör (5 cc,2cc,10cc), mavi uçlu branül, travma cihazı, Heraeus Labofuge 300 (Kendro Laboratory Products, Osterrode, Germany) santrifüj cihazı, vortex mikser (Vortex–Genie), monovet rafı ve Curasan PRP kiti kullanıldı.

3.2. Deneyin Yapılışı

Anestezi yöntemi: İntramüsküler olarak sağ M.Tensor fasya lata ya ketalar (Ketamin Hidroklorid 35 mg/kg) ve sol M.Tensor fasya lata ya Alfaziline (Xylazine Hidroklorid 5mg/kg) yapıldı.

Travma yöntemi: Literatürdeki çalışmalarda lokal yaralanma meydana getirebilecek ve tekrar tekrar uygulanabilecek farklı cihazlar kullanılmıştır. Cihazların düzeneği bir tüp içerisinde ağırlık kaydırılarak hasar oluşturulacak alana düşürülmesi şeklindedir. Bunları gözönünde bulundurularak yüksekliği ve şekli ayarlanabilen bir düzenek ve demirden ağırlık oluşturduk. (Resim 1,2)

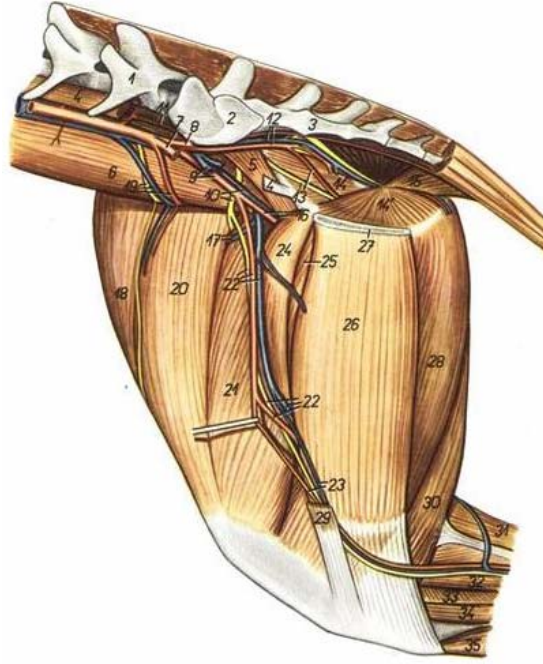


Resim 1. Travma cihazı



Resim 2. 12 cm demir ağırlık

Çalışmamızda tavşanın arka bacağında yüzeyde en büyük kas olan grasilis kasını kullandık. (Şekil 9)



Şekil 9. 26 numarada Gracilis kası görülmektedir (169)

Tavşanlar anestezi altındayken travma modeline yerleştirilerek ağırlığın düşürüleceği alan belirlendi. Ağırlık yardımı ile alan kalemle işaretlendi ve o bölgedeki tüyler traş edildi. Travma modelinde; dizi hiperekstansiyonda tutarak tavşanın M.Gracilis kasının femura yakın bölgesine 40 cm yükseklikten 272 gr demir ağırlık bırakıldı. (Resim 3,4)

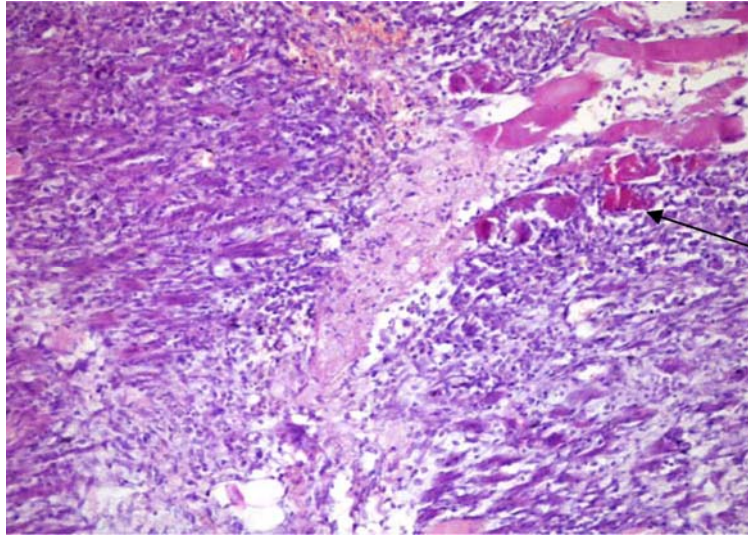


Resim 3. Ağırlığın düşeceği alanı belirleme



Resim 4. Ağırlığın düşürülmesi

Deneye başlamadan önce pilot çalışma yapıldı. 2 adet tavşanda daha önceki literatürler gözönüne alınarak; 30 ve 40cm yükseklikten 200 ve 272 gr ağırlık düşürülerek doğru ağırlık saptandı. 40cm yükseklikten 272 gr demir ağırlık bırakıldığında histopatolojik olarak kas hasarı ve inflamasyonun olduğu gözlemlendi (Resim 5) .



Resim 5. İnflamasyon hücrelerini, atrofi, ödem görülmektedir. Siyah okla parçalanmış kasları görmekteyiz.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Tavşanlar üç gruba ayrıldı. Travma modeli deney gruplarına standart olarak uygulandı.

1.Grup: Travmadan hemen sonra PRP yapılan çalışma grubu (A grubu); Toplam 6 adet tavşanın sađ bacaklarına diz hiperekstansiyondayken 40cm den 272 gr dűřürüldü. Kulaklarından 9cc kan alınarak PRP elde edildi (Resim 6). Tavřanlar uyanmadan travma bölgesinin orta noktasına elde edilen 0,6-0,7 cc PRP enjekte edildi.

2.Grup: Travmadan 1 gün sonra PRP yapılan çalışma grubu (B grubu); Toplam 6 adet tavşanın sađ bacaklarına diz hiperekstansiyondayken 40cm den 272 gr dűřürüldü.1 gün sonra tavşanlar uyutuldu. Kulaklarından 9cc kan alınarak PRP elde edildi. Tavřanlar uyanmadan travma bölgesinin orta noktasına elde edilen 0,4 cc PRP enjekte edildi.

3.Grup: Travmadan sonra PRP yapılmayan çalıřma grubu (K grubu); Toplam 6 adet tavřanın sađ bacaklarına diz hiperekstansiyondayken 40cm den 272 gr dűřürüldü. Bu gruba PRP verilmeden 5 gün boyunca takip edildi.



Resim 6. Tavşanın kulağından kan alınması

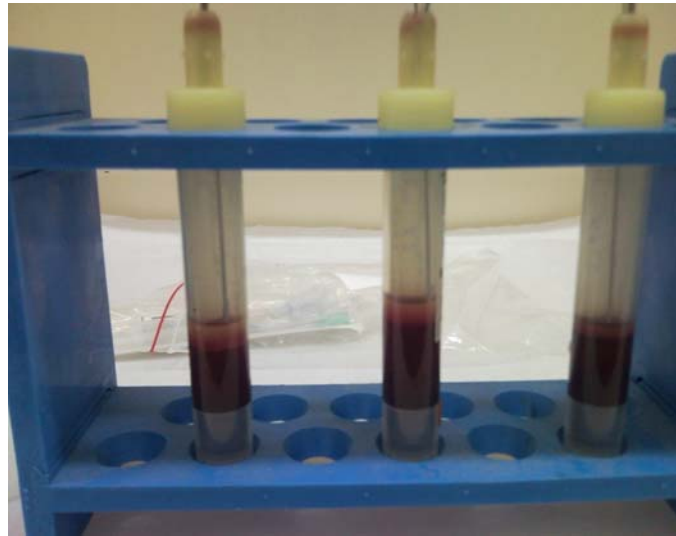
3.4. TZP'nin Elde Edilmesi

TZP hazırlanmasında, Curasan PRP sistem (PRP kit, Curasan, Klenostheim, Germany) kullanıldı. Santrifüj yapım sahası sterilildi. Heraeus Labofuge 300 (Kendro

Laboratory Products, Osterrode, Germany) santrifüj cihazı, vorteksmikser (Vortex-Genie), monovet rafı ve Curasan PRP kiti kullanıldı (Resim 7,8,9). Tavşanın kulağından alınan kan; 10 dk. süreyle 2400 devir/dk. santrifüj edildi. Üstte kalan trombosit zengin kısım alındı. Santrifüj yuvasına yerleştirildi, 15 dk. süreyle 3600 devir/dk. santrifüj edildi. Santrifüj edilmiş monovet dikey konumda dikkatlice çıkartılarak monovet rafına dik olarak yerleştirildi. 8 ml'lik kan için elde edilen TZP miktarı yaklaşık 0.6–0.7 ml'dir.



Resim 7. Heraeus Labofuge santrifüj cihazı



Resim 8. İlk santrifüjden sonra TZP ve TFP



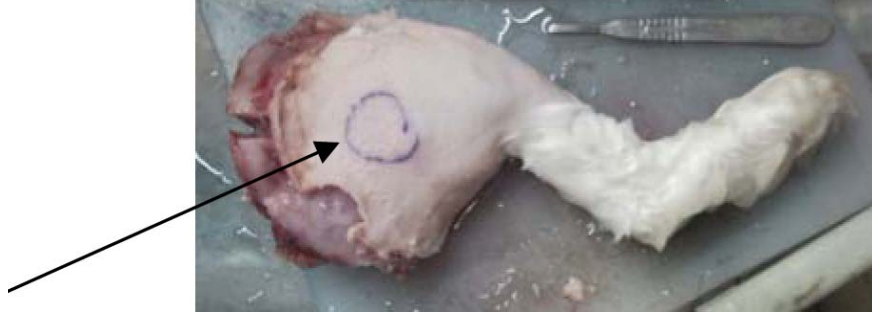
Resim 9. Curasan kit

3.5. Yöntemin Değerlendirilmesi

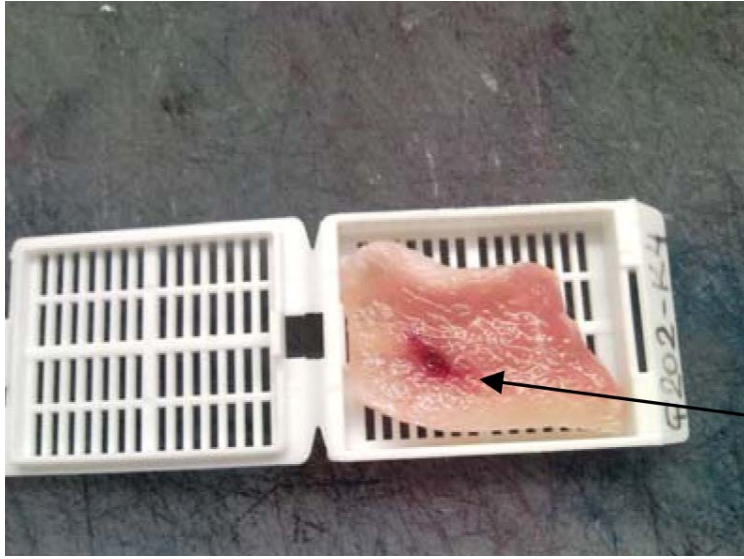
Bu çalışmada hiçbir grupta ölüm meydana gelmedi. Tavşanların travma oluşturulan ekstremitelerinde cilt ülserasyonu, yara yeri enfeksiyonu oluşmadı. Beşinci günün sonunda tüm tavşanlara aynı seansta ötenazi işlemi uygulandı. Ötenazi işlemi intrakardiak alfaziline (xylazine hidroklorid) verilerek uygulandı. İnflamasyonda hücrelerin ortaya çıkış süreleri gözönünde bulundurularak 5. gün tavşanlar sakrifiye edildi.

3.5.1. Histopatolojik Değerlendirme

Ötenazi uygulanan tavşanlar sakrifiye edilmelerini takiben sağ bacakları foramen obturatoriumdan ayrılarak kesildi (Resim 10). Alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formolin sıvısına konularak patoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Travma hattını içine alan ortalama 3 cm. lik doku örnekleri alındı (Resim 11).

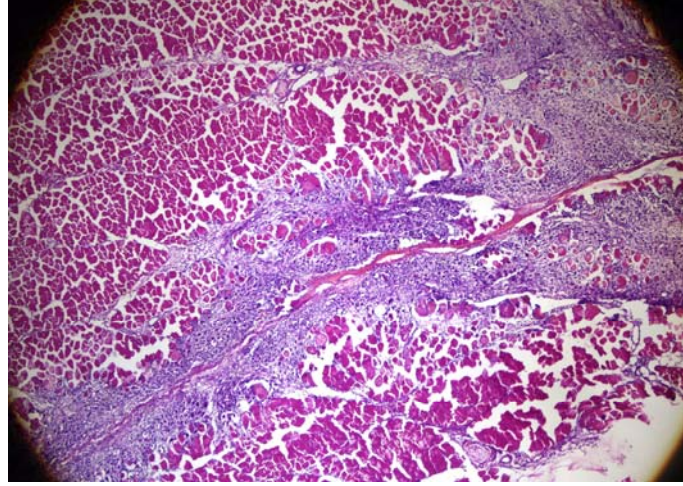


Resim 10. Tavşan arka bacağı

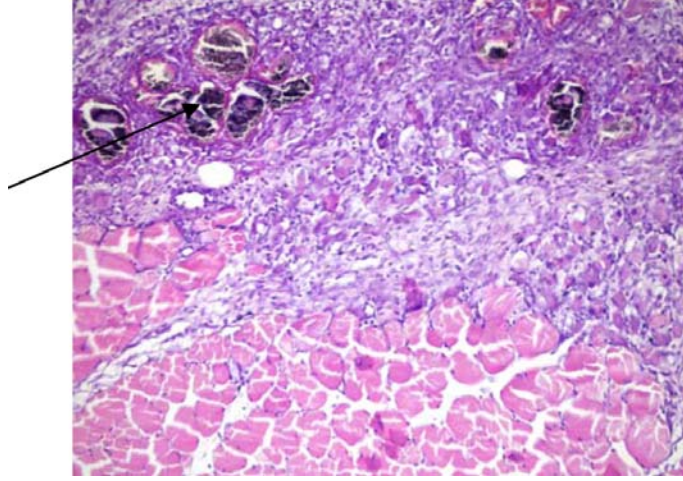


Resim 11. Kasete yerleştirilen travmalı kas

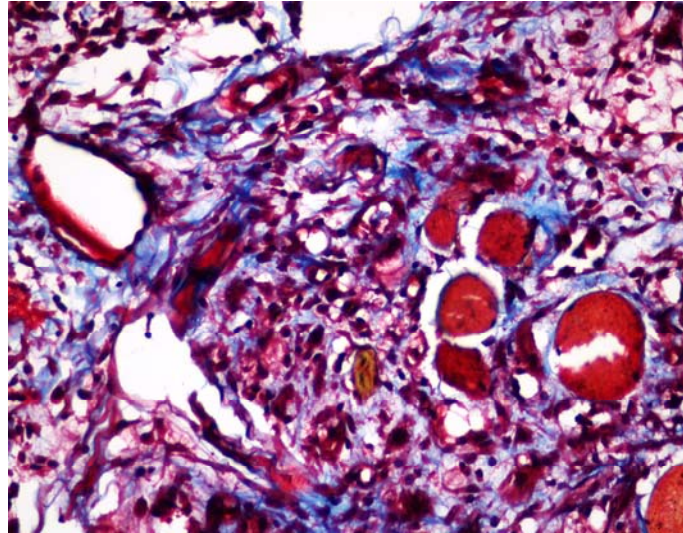
Formolde bir gün bekletilen örnekler otomatik doku takip makinasında 14 saatlik işleme alkol, toluen ve parafin basamaklarından geçirilerek tümüyle parafin blok haline getirildi. Rotary mikrotomla 5-6 mikron kalınlığında kesitler alındıktan sonra Hematoksilen Eosin (HE) ve fibrozisin değerlendirilmesi için masson trichrome boyası ile boyandı. Olympus BX50 marka binoküler çift başlı ışık mikroskopunda değerlendirmeler yapıldı (Resim 12,13,14,15,16).



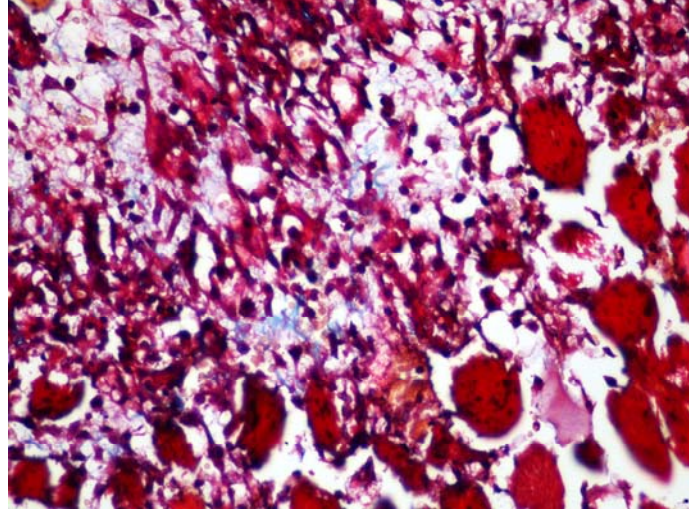
Resim 12. Kasın kenarları boyunca başlayan nekroz derinde bant tarzı yüzeye doğru şimşek şeklinde düzensiz sınırları olan travma etkisi görülmekte HE



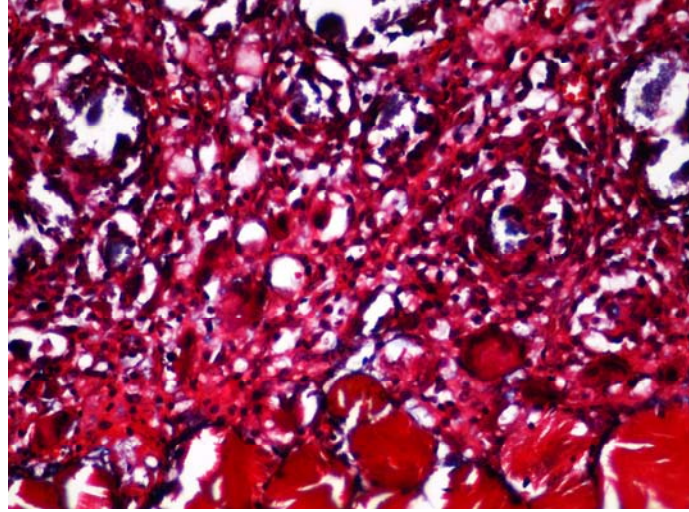
Resim 13. Distrofik kalsifikasyonlar HE boyası ile siyah renkte görünmektedir



Resim 14. Yoğun kollajen lifleri, koyu mavi renkte görülmektedir



Resim 15. Az miktarda kollajen lifleri açık mavi renkte görülmektedir



Resim 16. Kollajen neredeyse hiç görülmemekte

3.5.2. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm istatistiksel analizler SPSS 15 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) ile yapıldı. İstatistiksel degerlendirmede tanımlayıcı istatistikler (medyan [minimum-maximum]) ve ki-kare testleri kullanıldı. Ki kare koşullarının sağlanmadığı durumlarda Fisher Exact test sonuçları dikkate alındı. Araştırmada kontrol grubu (K), 1 saatte (A) ve 1. günde (B)TZP uygulanan olmak üzere üç grup bulunmaktaydı. Bağımlı değişkenler olan nekroz, fibrozis ve distrofik kalsifikasyon bakımından gruplar arası farklılıklar analiz edildi. Analiz aşamasında bağımlı değişkenlerin bulunup bulunmamasına (var/yok) (ki kare testi kullanılarak),

bulunması durumunda ise derecelerine (çok/az/yok) göre (eğimde ki kare testi kullanılarak) değerlendirme yapıldı. Değerlendirmede $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızın tanımlayıcı istatistiğine göre; tavşanların ortalama ağırlıkları ve doğum tarihleri Tablo 3 de görülmektedir.

Tablo 3. Grupların tanımlayıcı özellikleri

Gruplar	1.Saat	1.Gün	Kontrol
Doğum Tarihi(ay) Median (min-max)	6 (3 - 7)	6 (4 – 9)	5 (3 - 6)
Ağırlık Median (min-max)	2650 (2200 – 3100)	2400 (2100 – 2800)	2150 (1900 – 2300)

Nekroz 3 grupta da oluştu. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Kontrol grubu ile birinci gün TZP uygulanan grup Fisher'in ki-kare testi ile analiz edildiğinde iki grupta da eşit sayıda nekroz geliştiği gözlemlendi ve istatistiksel olarak değerlendirilemedi. Eğitimde ki-kare testi uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 4. Bağımlı değişkenlerin nekroz sonuçları

Nekroz	yok	var	X^2	P*
1.saat	%16,7	%83,3	0,393	0,500
Kontrol	% 0,0	%100,0		
1.saat	%16,7	%83,3	0,393	0,727
1.gün	%0,0	%100,0		

* Fisher'in ki-kare testi

Fibrozis 3 grupta da oluştu. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Fakat kontrol grubu ile birinci gün TZP uygulanan grup eğitimde ki-kare testi ile karşılaştırıldığında. Birinci gün TZP uygulananda giderek azaldığı kontrolde ise giderek arttığı görüldü.

Bir saat sonra TZP uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında Bir saat sonra TZP uygulananda giderek azaldığı kontrolde ise giderek arttığı görüldü. Fakat istatiksels olarak anlamlı sonuç bulunamadı.

Bir saat sonra TZP uygulanan grup ile birinci gün TZP uygulanan grup karşılaştırıldığında fibrozisin iki grupta da aynı oranda azaldığı gözlemlendi. İstatiksels olarak anlamlı fark bulunamadı.

Tablo 5. Bağımlı değişkenlerin fibrozis sonuçları

Fibrozis	yok	az	çok	P değeri*
1.saat	%33,3	%50,0	%16,7	0,275
Kontrol	%16,7	%33,3	%50,0	
1.gün	%33,3	%50,0	%16,7	0,275
Kontrol	%16,7	%33,3	%50,0	
1.saat	%33,3	%50,0	%16,7	1,000
1.gün	%33,3	%50,0	%16,7	

*Eğimde ki kare

Distrofik kalsifikasyon 3 grupta da oluştu.

Bir saat sonra TZP uygulanan ile kontrol grubu Ki-kare ile analiz edildiğinde; bir saat sonra TZP uygulananda az (%33,3) gelişirken kontrol grubunda daha çok (%100) gelişti. Tek yönlü hipotez kurulduğunda sonuç anlamlı(p= 0,03) bulundu. Eğimde ki-kare testi ile karşılaştırıldığında, sonuçlar çok anlamlı çıkmaktadır. Biz bu yüzden iki istatistik kullandık. Bir saat sonra uygulanan da distrofik kalsifikasyon az gelişirken (%0) kontrol grubunda daha fazla (%83,3) gelişti(p= 0,02).

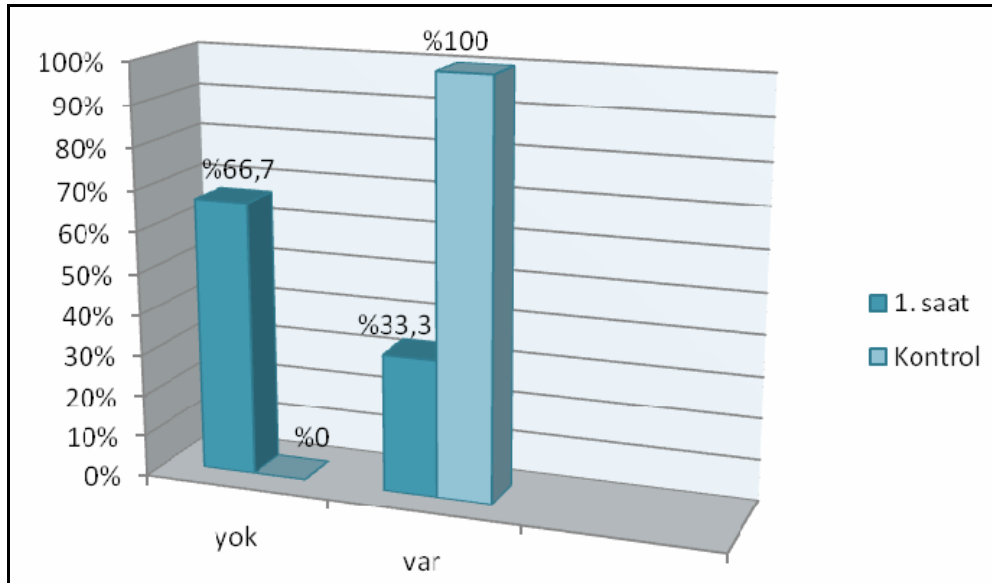
Kontrol grubu ile birinci gün TZP uygulanan gruba Fisherin Ki-kare testi yapıldığında; bir gün sonra uygulanan da az gelişirken (%50) kontrol grubun da ise daha fazla (%100) geliştiği bulundu. Fakat sonuç anlamlı değildi. Eğimde ki-kare testi ile karşılaştırıldığında 1. saatte azaldığı (%16,7) kontrolde ise arttığı (%83,3) görülmektedir.

Birinci gün TZP uygulanan ile bir saat sonra TZP uygulanan grup eğitimde ki-kare ile analiz edildiğinde; bir saat sonra TZP uygulanan grupta az (%0). Birinci gün TZP uygulanananda ise arttığı (%16,7) görülmektedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 6. Bağımlı değişkenlerin distrofik kalsifikasyon sonuçları

Distrofik kalsifikasyon	yok	var	P*
1.saat	%66,7	%33,3	0,030
Kontrol	%0,0	%100,0	
1.gün	%50,0	%50,0	0,091
Kontrol	%0,0	%100,0	
1.saat	%66,7	%33,3	0,500
1.gün	%50,0	%50,0	

*Fisher'in ki-kare testi

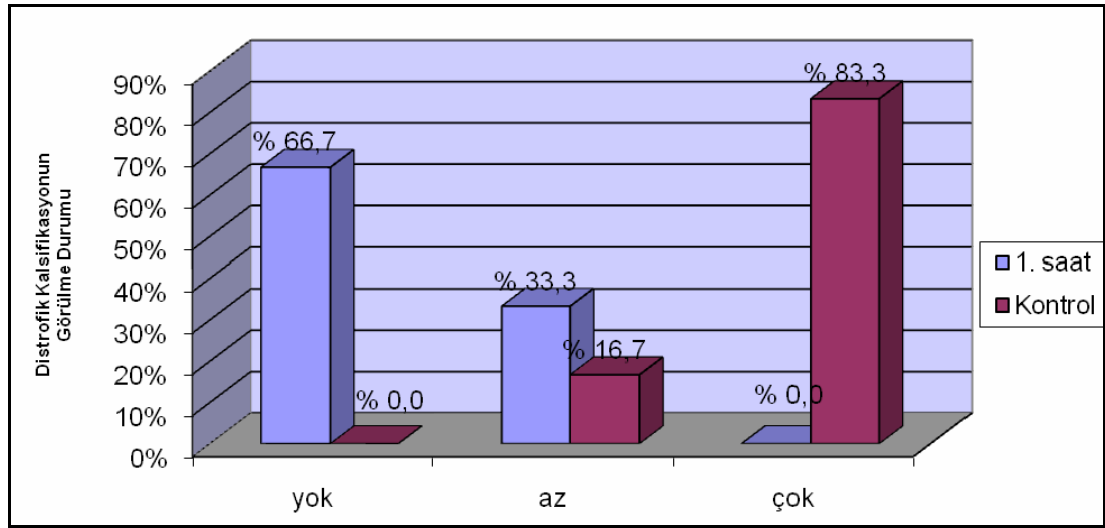


Grafik 1. 1. saat ve kontrol grubundaki distrofik kalsifikasyon

Tablo 7. Bağımlı değişkenlerin distrofik kalsifikasyon sonuçları

Distrofik kalsifikasyon	yok	az	çok	<i>P</i> *
1.saat	%66,7	%33,3	%0,0	0,004
Kontrol	%0,0	%16,7	%83,3	
1.gün	%50,0	%33,3	%16,7	0,020
Kontrol	%0,0	%16,7	%83,3	
1.saat	%66,7	%33,3	%0,0	0,392
1.gün	%50,0	%33,3	%16,7	

* Eşimde ki-kare testi

**Grafik 2.** 1. saat ve kontrol grubundaki distrofik kalsifikasyon sıralaması

5. TARTIŞMA

Sporcuların sakatlık döneminden sonra iyileşmeye nasıl müdahale edebileceğimizi araştırdığımız bu çalışmada; en büyük sıkıntımız daha önceki literatürlerde kas yaralanmasının patolojik bir sınıflamasının yapılmamış olmasıydı.

Yaralanma sonrasında insanda kas hasarının belirlenmesi ve tedaviye cevabın değerlendirilmesinin zorluğunu göz önüne alarak hayvan çalışması yapmayı tercih ettik. İnflamasyon sürecini araştırmak üzere başladığımız çalışmada beklemediğimiz bir veri olarak, distrofik kalsifikasyonla karşılaştık ve istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar elde ettik ($p=0,004$). TZP uygulanmayan grupta çok yüksek oranda distrofik kalsifikasyon gözlenirken TZP yapılan gruplarda neredeyse hiç distrofik kalsifikasyon ortaya çıkmadı. Distrofik kalsifikasyonu hatırlayacak olursak;

Patolojik kalsifikasyon kalsiyum tuzlarının anormal depolanmasını gösterir. Kalsiyum ile birlikte az miktarda demir, magnezyum ve diğer mineral tuzları da vardır. Bu depolanma *ölü yada ölmekte olan* dokularda görülürse distrofik kalsifikasyon adını alır, bu durum kalsiyumun normal serum seviyelerinde ve kalsiyum metabolizmasında bir bozukluk olmadığı durumda da görülebilir. Distrofik kalsifikasyon nekrotik dokularda ve nekrotik dokunun uzun süre kaldığı yerlerde görülür. Histolojik olarak hematoksilen eosin boyama ile kalsiyum tuzları bazofilik amorf granüller veya bazen de kümelenmiş görünümündedir. İntrasellüler, ekstrasellüler veya her iki lokalizasyonda olabilirler (170).

Yani hücre öldüğünde veya ölmek üzereyken distrofik kalsifikasyon birikimi olmaktadır. Bu çalışmada TZP uygulaması ile distrofik kalsifikasyon sayısında azalma olduğu gösterilmiştir. TZP'nin iyileşme üzerine olan bu olumlu etkisinin sporcu için iyileşme döneminden sonra, kuvvet ve tekrar yaralanmasında etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bundan sonra yapılacak olan kas sınıflamalarında distrofik kalsifikasyon incelenmesi yararlı olabilir.

Bu çalışmada TZP'nin yaralanmadan hemen sonra ve bir gün sonra yapılması açısından iyileşme yönünden fark olup olmadığına baktık. Kas yaralanması ile ilgili çalışmalar trombositlerin özellikle iki gün içinde etkin olduğunu göstermektedir. Deney grubumuzda bir saat sonra ve bir gün sonra uygulama arasında anlamlı bir fark elde edilmedi. Sporcu yaralandıktan sonra hekime ulaşana kadar geçen zaman

gözönüne alındığında; bir gün sonra enjeksiyon yapılmasının önemli bir fark oluşturmayacağı söylenebilir.

Fibrozis gruplar arasında değerlendirildiğinde hepsinde de oluştu. İstatiksel olarak birinci saati, birinci günü ve kontrol grubunu karşılaştırdığımızda fibrozisin arttığını fakat anlamlı bir fark oluşmadığını gördük. Eğitimde ki-kare uyguladığımızda birinci saat ve birinci gün artışının aynı oranda olduğunu görmekteyiz. Fakat birinci saat ve kontrol grubuna baktığımızda birinci saatte %16,7 kontrolde ise %50 artış olduğu görülmekte. Aralarında iki kattan fazla fark bulunmaktadır. Aynı şekilde birinci gün ve kontrol grubu arasındada iki kattan fazla fark vardır. Bu farkın istatiksel olarak anlamlı olabilmesi için gruplardaki n sayılarını arttırmak gerekir. Bu çalışmada yirmi tavşan için etik kurul onayı verilmesi , gruplardaki hayvan sayısını arttırmamızı engellemiştir.

Nekroz; grupların hepsinde oluştu. İstatiksel olarak birinci saati, birinci günü ve kontrol grubunu karşılaştırdığımızda nekrozisin arttığını fakat anlamlı bir sonuç çıkmadığını gördük. Eğitimde ki-kare uyguladığımızda birinci saatte % 33,3 kontrolde ise % 66,7 artış olduğu görülmekte. Aralarında iki kat fark bulunmaktadır. Aynı şekilde birinci saat ve birinci gün arasındada benzer oranda artış vardır. Bu farkın anlamlı olabilmesi için gruplardaki n sayılarını arttırmak gerekir. Birinci gün ve kontrol grupları arasında aynı oranda artış vardır.

TZP' nin elde edilebilmesi için 8-10 cc kana ihtiyaç duyulmaktadır. Hayvan çalışmalarında, özellikle küçük hayvanlarda, TZP hazırlamak için gereken kanı aynı hayvandan almak mümkün olamamaktadır; çünkü hayati tehlike ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde yapılan deneylerde kullanılan TZP, otolog değil homolog hazırlanmaktadır. Bu nedenle oluşabilecek immün reaksiyonlara bağlı olarak, deneylerde yanlış-negatif sonuçlar oluşabilir. Bizde sonuçların klinik uygulamalara daha fazla benzemesi için fare yerine tavşan kullandık.

Oluşturduğumuz travma modeliyle hasarın mikroskopik olarak kasa etkilerini de gözlemlemiştir olduk. Elde ettiğimiz sonuçlara göre travmanın etkisini 2 şekilde yorumlayabiliriz;

- Yüzeyden sınırları düzensiz olarak başlayıp kemiğe yakın bölgede yoğunlaşarak derine inen,

- Derinde kas ve kemik arasında sıkışan etkinin bant tarzında başlayıp; şok dalgasının yüzeye şimşek tarzında yayılması.

Literatürde bu etki; eksternal güçlerin kompresyonu ile iskelet kasında yaralanma ortaya çıkar, rüptür darbe alanının yakınında yada darbe alanında meydana gelir şeklinde açıklanmaktadır. Hasar kemiğe yakın yerde olduğunda darbenin basıncı kas, kemik yüzeyi ile komprese olur ve kas liflerine iletilir (171). Elde ettiğimiz sonuçlarla travmanın etkilerine bağlı olarak meydana gelecek cevabın değişkenlik gösterebileceğini söyleyebiliriz. Örneğin; şok dalgası yüzeyde kalınca nekroz daha fazla, şok dalgası derinde ise nekroz daha az oluyor.

Kasın kenarlarında kemiğe yakın bölgede fibrozis daha yoğun olduğundan darbenin etkisi bu bölgelerde daha uzun sürüyor gibi gözükmektedir. Kasın sınırlarının değişikliği klinik incelemelerde önem taşıyabilir. Hasarlı doku etrafındaki yağ ve bağ dokuda meydana gelen fibrozis USG yapılırken bant tarzında görülerek değerlendirmede kolaylık sağlayabilir. Tanı ve tedavi aşamasında yol gösterici olabilir.

Aldığımız örneklerde ödemli alan ile nekrozlu alanların örtüştüğünü fakat ödemin nekrozdan uzakta da geliştiğini gözlemledik.

Şimdiye kadar yara bölgelerine TZP uygulayarak yapılan çalışmalarda başlıca amaç, yara iyileşmesini tetikleyen büyüme faktörlerini yoğunlaştırılmış şekilde yara bölgesine vererek iyileşme sürecini hızlandırmaktır. Çünkü; klinik olarak ciddi birer problem olan kronik yaralarda, bu faktörlerin miktarlarının azaldığı gösterilmiştir. Bu durum, üretimde veya salınımında azalma, yıkımda artma ya da hepsine birden bağlı olabilir. TZP'nin yara iyileşmesini arttıran proteinlerin yanında bakterisidal proteinleri de içermesi, enfeksiyonların kontrol altına alınmasına ve hastanede yatış sürelerinin kısalmasına, ağrı ve şişlikte azalmaya neden olmuştur (120).

Bununla birlikte TZP'nin tek başına ya da greft materyalleri ile birlikte kullanıldığında elde edilen çelişkili sonuçların nedeni; insan yaralarının iyileşmesinde yüksek konsantrasyonda trombosit varlığı iyileşmeyi hızlandırırken, bazı hayvan türlerinde ise ek trombosit olmadan da iyi bir iyileşme olabilmekte ve hayvan modellerde TZP'nin ek olarak kullanımı yararsızmış gibi görülebilmektedir (172).

TZP kullanımındaki esas amaçlardan birisi bölgedeki BF yoğunluğunu artırmak olduğuna göre TZP hazırlama prosedürlerinin hazırlık sonunda ne kadar BF sağladığının tespiti ve yöntemlerin BF elde etme miktarı yönünden de karşılaştırılmaları önemlidir. Bu karşılaştırma ve elde edilen trombosit oranları tablo 8’de gösterilmiştir (110).

Tablo 8. Farklı yöntemlerle elde edilen TZP’lerdeki BF miktarlarının karşılaştırması (110)

YÖNTEM	Trombosit (adet/ml)	PDGF (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)	TGF-β1 (ng/ml)
Curasan	908500	233.7	101.7	95.0
Apheresis	1434300	133.6	85.4	268.7
Friadent-Schütze	1440500	251.6	72.8	196.8
Smart prep	1227890	208.3	91.4	77.2
PCCS	2232500	251.8	91.0	467.1
PRGF	513630	47.0	-	73.0

Üniversitemizde bulunan curasan kitle çalışmayı tercih ettik. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda güvenilirliği kanıtlanmış ve FDA onayı almıştır. Tabloda elde edilen BF oranlarına bakacak olursak; inflamasyon için negatif etkisi olan TGF-β ‘nın curasan kitte diğer yöntemlere göre düşüktür. Diğer BF oranlarında önerilen düzeylerdedir.

Standart laboratuvar santrifüj makineleri ile TZP hazırlamak mümkün olmasına karşın, bu teknikte birkaç santrifüj işlemi ve çoklu transfer gerekir ki, bu işlemde trombosit fragmantasyonunu engellemek, sterilitiyi sağlamak ve elde edilen plazmadaki trombosit miktarını belirlemek güçtür. Ayrıca kullanılan tekniğin trombositleri, kırmızı kan hücrelerinden zarar görmeden ayırabilmesi bu hücrelerin BF’leri salgılayabilmesi açısından önemlidir (95).

Thor ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada yüksek konsantrasyonlarda TZP’nin kemik iyileşmesini engelleyici etkisi bulunduğunu ve 1,000,000 trombosit / μ L’nin altındaki konsantrasyonlarda ise etkinin vasat olduğunu bildirmektedir (173).

Weibrich ve arkadaşları da, yüksek konsantrasyonların inhibitör etkileri olabileceğini saptamıştır (174). Sonuçta elde ettiğimiz maddedeki trombosit miktarı önem kazanmaktadır. İleride bu miktarın tespiti ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalar planlanabilir.

TZP'de bulunan biyolojik mediyatorlerin konsantrasyonlarını tespit etmek amacıyla 25 hastada yapılan bir araştırmada, ELİSA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılarak TZP'de bulunan trombosit sayısı, TKBF'ler ve sitokin miktarları incelenmiştir. Buna göre TZP'de bulunan trombosit sayısının, venöz kanda bulunandan 7.9 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. TZP'nin BF içeriği ile venöz kandaki ya da TZP içeriğindeki trombosit sayımı arasında iyi bir korelasyon bulunamadığı bildirilmiştir (175).

Bowen- Pope ve arkadaşları, her 1milyon trombosit başına yaklaşık 0.06 nanogram PDGF üretildiğini ya da trombosit başına 1200 molekül PDGF üretildiğini bulmuştur (176). Ortaya çıkan bu rakam aslında PDGF'nin etki kuvvetini göstermekte ve TZP ile arttırılan trombosit miktarının yara iyileşmesini ne denli hızlandırıp geliştirebileceğini ispatlamaktadır.

Weibrich ve arkadaşları 2003 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 21-62 yaşları arasındaki 115 sağlıklı vericiden elde edilen TZP preparasyonlarını trombosit, lökosit ve BF açısından değerlendirmişlerdir (110). Sonuçta, ne venöz kan örneğindeki, ne de hazırlanan TZP'deki trombosit sayımlarının herhangi bir TZP preparasyonu içerisindeki final BF miktarını tahmin etmede kullanılamayacağını bildirmişlerdir. Kan verenlerin yaşı ya da cinsiyeti ile trombosit sayımları ya da BF miktarları arasında da bir ilişki saptanamamıştır. Trombositler ve TZP içeriğindeki BF içeriğinin henüz tanımlanamamış başka faktörlere bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.

BF'lerinin hasar bölgesine direk uygulanması deneysel olarak test edilmiştir. Mitchell ve arkadaşlarının 3 farklı kas hasarını incelediği çalışmalarında; yaralanma bölgesine FGF-2 enjeksiyonunun yararlı etkileri olmadığını saptamıştır (177). Ek olarak IGF-1'in iskelet kasına spesifik izoformunun aşırı ekspresyonu model çalışmalarında iskelet kası rejenerasyonunu arttırmadığı saptanmıştır. Bunlara zıt olarak, FGF-2'nin iskelet kası rejenerasyonunda güçlü stimulator etki gösterdiği

yayınlanmıştır. FGF-2, IGF-1'e ek olarak, daha az bir kapsamda, sinir BF'nin kas rejenerasyonunu arttırdığı gösterilmiştir, bu BF ile tedavi edilen yaralı kas dokusunda tedavi edilmemiş kasa göre yük taşıma direncinin arttığı ve iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca, IGF-1'in fibröz skar formasyonunun inhibitörü olan TGF- β antagonisti decorin ile beraber kombinasyonunun çok başarılı olduğu, fibröz skar oluşumunu engellediği ve kas iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (178). Bizim çalışmamızda tüm gruplarda da fibrozis gözlenmiştir. Fakat önemli olan bu fibrozisin ne kadar süre devam ettiği ve fonksiyonu nasıl etkilediğidir. İleride yapılacak olan çalışmalarda bu etkiler incelenebilir.

Pierce ve arkadaşlarının çalışmasında PDGF'nin insizyonel yaralara uygulandığında; yara yerine nötrofil ve makrofaj akımının arttığı ve inflamatuvar cevabı hızlandırdığı saptanmıştır (179).

Büyüme faktörleri ve konsantrasyonları ile mikro çevre ve etkileşime girdikleri diğer moleküller arasında kompleks bir etkileşim vardır. Bu da büyüme faktörlerinin çoğu kaynaklarda ifade edilen etkilerinin tersini gösterebilmektedir. Tek bir büyüme faktörü ajanına göre TZP'nin büyüme faktör grubu daha avantajlı görülmektedir.

Fakat BF'lerinin yarı ömürlerinin kısa olması, hedef hücrelerde yeterli konsantrasyonda bulunamamaları, çok pahalı olmaları ve etkin olmaları için kullanım sıklıklarının fazla olması bu büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kullanımlarını oldukça zorlaştırmaktadır (180).

Yapılan çalışmalarda, yara iyileşmesinin son fazında hem FGF'nin hem de PDGF'nin kontraksiyon ve remodeling zamanını arttırdığı bildirilmektedir. Pek çok deneysel çalışmada PDGF ile granülasyon dokusunun, epitelizasyonun ve neovaskularizasyonun arttığı, yara iyileşme sürecinin değişimsiz, iyileşme hızının arttığı ortaya konmuştur (181, 182).

TZP kullanımındaki en büyük endişe fibrozisin oluşmasıdır. Fakat şu an için kas yaralanmalarında TZP'yi değerlendiren çok az klinik rapor mevcuttur. Sâchez ve arkadaşları 20 üst seviye profesyonel sporcunun kas yaralanmasında ultrason eşliğinde TZP enjeksiyonunu prospektif olarak değerlendirmiştir. Bütün hastalarda

beklenen iyileşme süresinin yarısında tam fonksiyonuna ulaştığını bildirmişlerdir ve fibrozis görülmemiştir (183).

Yine 2005 yılında akut kas yaralanması olan 14 profesyonel sporcu incelenmiş (8 futbolcu, 6 basketbol oyuncusu). Direkt darbe sonucu oluşan yaralanmaları sınıflamışlar. USG eşliğinde yapılan hematoma boşaltma işleminden sonra TZP enjekte edilmiş. Spora dönüş zamanlarının kısaltıldığı gözlenmiştir. Takip eden USG kontrollerinde kasın hızlı bir şekilde iyileştiği gözlenmiştir(184)

İyileşmenin final fazı olan fibrozis yani skar dokusu oluşumu, sıklıkla yaralanmanın 2.-3. haftaları arasında başlar. Skar oluşumu kas tamir sürecinin son basamağıdır ve tüm kas yenilenmesine engel oluyor gibi görünmektedir. Daha önceki çalışmalarda TGF- β 1'in hasarlı iskelet kasında fibrozis kaskadını uyarıcı ana faktör olduğu belirtilmiştir (185). Decorin ve gama-interferon gibi antifibrotik ajanların TGF- β 1 ekspresyonunu inhibe ettiği, skar oluşumunu azalttığı, dolayısıyla hasarlanma sonrası kas dokunun iyileşmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (56, 57). Fakat FDA kurumunun onayına rağmen gama-interferonun ciddi yan etkileri vardır ve decorinin insana uygulanabilirliği hakkında yeterli klinik veri bulunmamaktadır. Son yıllarda yayınlanan bir çalışmada; TGF- β 1 ailesinin bir üyesi olan miyostatinin (MSTN) kas büyümesinde negatif regülatör olduğu, kas doku hasarından sonra skar dokusu oluşumunu uyardığı, *in vivo* ortamda gösterilmiştir (186). Suraminin kontüzyon hasarlarındaki etkilerini inceleyen ilk çalışmayı incelersek; kontüzyonel hasarlanmadan sonra, suramin ile tedavi edilen kas dokusunda, kontüzyondan 4 hafta sonra suramin tedavisi edilmeyen kontrol grubundaki kas dokusuna kıyasla, histolojik olarak daha fazla regenere olan miyofiberler ve daha az fibrotik skar dokusu saptanmıştır. Dahası, suraminin tedavi edilmeyen gruba kıyasla tedavi edilen grupta kas gücünde artış sağladığı gösterilmiştir.(187)

Kontüzyon yaralanmalarında iyileşme başarılıdır ve fonksiyonel iyileşmede yetersizlik başlangıçtaki travmanın şekline bağlı olmaktadır. İskelet kaslarının mükemmel iyileşme potansiyeli vardır, kas progenitör hücreleri ve matür multinükleer miyofiberlerin bu progenitör hücreler ile füzyonu mümkündür. Ayrıca kas iyileşme süreci boyunca skar dokusu oluşumu kendiliğinden gerçekleşir ve kas rejenerasyonu ile tamamlanır (56). Yaralanmaya müdahale etmesekte iyileşme

gelişir; fakat çok fazla hücre kaybı olur. TZP uygulamasıyla sağlam kalan hücre sayısını arttırabiliriz.

Bir fare modelinde insulin benzeri büyüme faktörü-1 (Insulin-like Growth Factor/IGF-1) ve basit fibroblast büyüme faktörünün kas iyileşmesini artırdığı ve l'inci ayda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hızlı kasılan kas kuvvetinde artış olduğu bulunmuştur. Shen ve arkadaşları tarafından, transforme edici büyüme faktörü ve prostaglandin E,'nin iskelet kasının iyileşmesi sırasındaki fibrozis seviyesinin düzenlenmesinde sinerjistik oldukları bulunmuştur, bu durum tam kas fonksiyonunun tekrar sağlanmasında önemli bir faktördür (186). Hammond ve arkadaşları yakın zamanda sıçanlarda trombositten fakir plazma ile TZP'yi karşılaştırarak etkilerini bildirmişlerdir. İyileşme süresinde meydana gelen iyileşmeler sadece yüksek tekrarlı kas yaralanma modelinde meydana gelmiştir. Bu durum TZP'nin sakrolemmal tamirdeki etkisine oranla miyogenez üzerinde daha büyük bir etkisi olduğunu düşündürmektedir (188).

TZP'nin etki süresi araştırıldığında bu süreyi kesin olarak bildiren bir literatür görünmemektedir.

TZP'nin kullanılmasındaki en önemli yan etkinin karsinogenez etki olduğu düşünülmektedir. Sigara ve alkol kullanan bireylerde de potansiyel mitojenlere maruz kalındığı için karsinogenez sürecine başlamış hücreler bulunma olasılığı bulunduğundan TZP uygulamalarının tavsiye edilmemesi gerektiği bildirilmiştir. Fakat; TKBF'nin mitojenik özelliklerinin olmasına rağmen, bu BF'lerinin tümör oluşumunu provoke ettiği veya karsinogenez etkisi olduğuna dair hiçbir kanıt bulunmamaktadır (189).

Tablo 9 ve 10'da en son yapılan klinik ve hayvan çalışmalarından bazılarına görmekteyiz (190,191).

Tablo 9. Trombositten zengin plazmanın spor hekimliğinde kullanımı üzerine klinik kanıt

Çalışma	Uygulama Alanı	Çalışma Tipi (kanıt seviyesi)	Hasta Sayısı	PRP Sistemi	Sonuçlar
Cerrahi dışı					
Mishra ve Pavelko	Lateral ve medial epikondilit	Prospektif kohort (II)	20	GPS III,	8 haftada%60'a karşı%16 VAS iyileşmesi; ortalama 25.6 ayda %93 ilerleme
Gosens ve ark	Lateral epikondilit	Randomize kontrollü çalışma (I)	100	GPS III (Biomet)	Kortikosteroid enjeksiyonu ile karşılaştırılınca, 6. ayda iyileşmiş VAS ve DASH skorları
Kon ve ark.	Patellar tendinopati	Prospektif kohort (II)	20	Bildirilmemiş	% 70 tam veya belirgin düzelmeye; %80 memnuniyet
Barrett ve Erredge	Plantar fasiyit	Retrospektif kohort (IV)	9	Bildirilmemiş	1. yılda dokuz hastanın yedisinde tam ağrı düzelmesi
Sánchez ve ark.	Kas yaralanması	Prospektif kohort (II)	20	PRGF Sistem	Tüm hastalarda beklenenin yarısı kadar zamanda tam iyileşme
Sánchez ve ark.	Diz osteoartriti	Retrospektif kohort (IV)	30	PRGF Sistem	5. haftada HA enjeksiyonları ile karşılaştırıldığında iyileşmiş ağrı ve VVOMAC skorları
Cerrahi					
Sánchez ve ark.	Aşil tendon tamiri	Vaka-kontrol (III)	12	PRGF Sistem	Kontrollerle karşılaştırıldığında daha hızlı eklem ROM'una, zıplama ve jogginge dönüş Yara komplikasyonu yok
Randelli ve ark.	Rotator manşet tamiri	Prospektif kohort (II)	14	GPS II (Biomet)	Tüm hastalarda 2. yılda iyileşmiş VAS, Constant ve UçLA skorları. Yan etki yok.
Everts ve ark.	Açık subakromiyal dekompresyon	Randomize kontrollü çalışma (I)	40	GPS III (Biomet)	Daha hızlı iyileşme, günlük aktivitelere daha erken dönüş, ağrı için daha az medikal tedavi
Orrego ve ark.	Ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu	Randomize kontrollü çalışma (II)	108	GPS II (Biomet)	6. ayda greftte azalmış MRG intensitesi. Tünel genişlemesi veya kemik tendon ara yüzünde farklılık yok.
Silva ve Sampaio	Ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu	Prospektif kohort (II)	40	Mini GPS III	3. ayda MRG sinyal intensitesi farklılığı yok
Sánchez ve ark.	Artiküler kırıldak defekti	Vaka raporu (V)	1	PRGF Sistem	Azalmış ağrı ve aktiviteye erken dönüş

DASH = Kol Omuz ve Elin Maluliyet anketi; HA = hyaluronik asit; PRP= Trombositten zengin plazma; ROM= Hareket Aralığı; UçLA = Kaliforniya Üniversitesi, Los Angeles; VAS = görsel analog skala; WOMAC= VWestern Ontario ve McMaster Üniversiteleri Osteoartrit İndeksi

TZP'lerle yapılan küçük hayvan çalışmaları her zaman arşivlenmemektedir. Bu da literatürdeki çalışmalara ulaşmayı daha da zorlaştırmaktadır. Ayrıca, hayvan çalışmalarında farklı protokollerin uygulanmış olması sonuçların toparlanmasını zorlaştırmaktadır.

Tablo 10. TZP ile yapılan hayvan çalışmaları

Yazar	Yıl	Çalışma Grupları	Çalışma Bölgeleri	N	Etkileri
Kim	2001	tavşan	M-F: kemik	20	+
Kim	2002	köpek	M-F: diş	12	+
Aghaloo	2002	tavşan	kranyal	15	-
Fennis	2002	keçi	M-F: kemik	28	+
Kim	2002	köpek	M-F: kemik	12	
Furst	2003	domuz	M-F: sinus graft	12	+/-
Jakse	2003	koyun	M-F: kemik	12	+/-
Schlegel	2003	domuz	kemik	15	+/-
Zechner	2003	domuz	Diş	12	+
Aghaloo	2004	tavşan	Kranyal	15	+/-
Choi	2004	köpek	M-F: yumuşak doku	8	-
Fennis	2004	keçi	M-F: kemik	28	+
Li	2004	domuz	SS: kemik	10	-
Yazawa	2004	tavşan	M-F: kemik	10	+
Weibrich	2004	tavşan	M-F: kemik	24	+
Aghaloo	2005	tavşan	Kranyal	15	-
Butterfield	2005	tavşan	M-F: diş	12	-
Fennis	2005	keçi	M-F: kemik	6	+
Grageda	2005	koyun	M-F: kemik	10	-
Kovacs	2005	köpek	M-F: kemik	10	+
Pryor	2005	fare	M-F: kemik	30	-
Ranly	2005	fare	OS: Kas	30	-
Scalani	2005	tavşan	WC: greft	?	+

M-F : Maxillofasyal cerrahi,SS: Spinal cerrahi,OS: Ortopedik cerrahi,WC:Wound care

Yaptığımız çalışmayı sadece histopatolojik olarak değerlendirebildik. Kas dokusundaki iyileşmenin biyomekanik açıdan değerlendirilmemiş olması bu çalışmanın eksik kalan tarafı olmuştur. Kas fonksiyonu kas tansiyon-kopma kuvveti gibi özellikleri değerlendirmek anlamlı olabilir.

Sonuç olarak son 10 yıldır dikkatleri çeken TZP'nın kullanım standartlarının belirlenebilmesi için daha çok çalışmalara ihtiyaç vardır. Sporcu için oldukça yararlı olabileceğini düşünerek kurduğumuz hipotezde olumlu sonuçlar elde ettik.

Teknolojik ilerlemeler sayesinde trombositleri de steril şartlar altında izole ve konsantre etmek mümkündür. Otolog elde edildiği için immün reaksiyon ve hastalık

bulaştırma riski olmaması, önemli bir yan etki oluşmaması, gerektiğinde hastadan tekrar tekrar elde edilebilmesi kullanımının yaygınlaşmasını sağlayacak en önemli faktörlerdendir (151).

İleride yapılacak çalışmalarda öncelikle ortaya konulması gereken konular;

- Standart TZP hazırlama tekniği,
- Hastalıklara göre doğru doz,
- TZP enjeksiyon zamanlaması,
- Enjeksiyon sayısı,
- Enjeksiyon sonrası rehabilitasyon programı olabilir.

ÖZET

Tavşanlarda Oluşturulan Kontüzyonel Kas Yaralanmasında Trombositten Zenginleştirilmiş Plazma (TZP) Uygulamasının İyileşme Üzerine Etkisi

Spor Hekimliğinde hastalar, yaralanma öncesi fonksiyonlarına hızlı dönmeyi isterler. Günümüzde spor yaralanmalarında TZP tedavisi oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır. TZP, değişik doku türlerinde yaralanma sonrası iyileşme yanıtını arttırmaya odaklanmış yeni bir teknolojidir.

Kontüzyonel kas hasarı oluşturmak üzere literatürde yer alan çalışmalardakine benzer bir cihaz geliştirdik. Yeterli TZP elde edebilmek için tavşan kullandık. Ortalama ağırlığı 2500 gram olan 20 adet, 6 aylık erkek tavşan kullandığımız çalışmamızda kas yaralanması histopatolojik olarak incelendi. Tavşanları 3 gruba ayırdık. Tavşanları kontrol, travmadan 1 saat sonra TZP yapılan ve travmadan 1 gün sonra TZP yapılan şeklinde 3 gruba ayırdık. Gruplarda 6 adet tavşan vardı ve deney süresince kayıp olmadı. 5. gün sonunda tavşanlar sakrifiye edilerek travmalı kaslardan örnek alındı. Kas örnekleri Hematoksilen Eosin ve masson trichrome boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Nekroz, fibrozis ve distrofik kalsifikasyon açısından incelen örneklerde 3 grupta da nekroz gözlendi. TZP ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda en büyük yan etki olarak fibrozis gösterilse de bizim çalışmamızda gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Bununla birlikte TZP yapılmayan grupta istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha fazla distrofik kalsifikasyon gözlendi.(p=0,004)

Sonuç olarak TZP'nin kontüzyonel kas hasarı sonrası iyileşme sürecine olumlu etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelime: Kas yaralanması, Tavşan, Trombosit, TZP, Spor yaralanması

SUMMARY

The Effect of Platelet Rich Plasma (PRP) Treatment on the Recovery of Muscle Contusion Injury In Rabbits

Sports medicine patients desire to return to their preinjury level of function, rapidly. Today, at the treatment of sports injuries, PRP has been started to be used quite often. PRP is a new technology focused on enhancing the healing response, after injury of different tissue types.

To create muscle contusion, we prepared a similar device which used at the same studies in the literature. We used rabbits to obtain adequate PRP. We used 20 pieces of female rabbits which has the average weight of 2500 grams and 6-months pregnancy to examine histological results of muscle injury. We classified the rabbits into three groups. First group consist of the rabbits, PRP hasn't given as a treatment, named as control group. Second group consist of the rabbits, PRP applied one hour after the trauma and the third group, PRP applied one day after the trauma. Each group was including six rabbits and there had been no loss during the experimental period. Five days after the trauma, we took samples from the injured muscles. Muscle specimens were stained with haematoxylin-eosin and masson's trichrome stains before microscopic examination.

We observed the specimens for necrosis, fibrosis and dystrophic calcification. At all three groups we demonstrated necrosis. Although at previous studies, the major side effect of PRP determined as fibrosis, but in our study we haven't observed such a significant result. On the other hand, the rabbits in the control group which haven't given PRP, we create a statistically significant result($p=0,004$) ; dystrophic calcification.

As a result of this study, we suggest that PRP has positive effects at the healing process of muscle injury.

Key Words: Athletic injury, Muscle injury, Platelet Rich Plasma, Rabbit, Thrombocyte

KAYNAKLAR

1. Tidball JG, Daniel TL. Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. *Cell Tissue Res.* 1986;245(2):315-22.
2. Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports.* 2000 Dec;10(6):321-5.
3. Appell HJ. Skeletal muscle atrophy during immobilization. *Int J Sports Med.* 1986 Feb;7(1):1-5.
4. Guyton AC, Hall, J.E. *Tıbbi Fizyoloji.* (Çavuşoğlu, H. (Ed.), Çev.). Ankara: Nobel Tıp Kitapevi. 2001.
5. Cakmak M, Kanmaz T, Mete UO, Tap O, Kaya M, Dindar H, et al. Ultrastructural and hormonal changes in the contralateral adrenal gland in unilateral adrenal gland ischemia: an experimental study in rats. *Surg Today.* 1998;28(9):907-14.
6. Karahan M, Erol B. [Muscle and tendon injuries in children and adolescents]. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2004;38 Suppl 1.37-46.
7. Skinner HB. *Current Diagnosis & Treatment in Orthopedics, Lange.* 2005.12-23.
8. SMITH LL, MILES, M.P. *Exercise Induced Muscle Injury and Inflammation* Lippincott Williams and Wilkins. 2000:401-11.
9. Garrett WE, Jr. Muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 1996;24(6 Suppl):S2-8.
10. Jarvinen MJ, Lehto MU. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med.* 1993 Feb;15(2):78-89.
11. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med.* 1994 Sep-Oct;22(5):702-10.
12. Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc.* 1991 Jul;23(7):801-10.
13. McNeil PL. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci.* 2002 Mar 1;115(Pt 5):873-9.
14. Miyake K, McNeil PL, Suzuki K, Tsunoda R, Sugai N. An actin barrier to resealing. *J Cell Sci.* 2001 Oct;114(Pt 19):3487-94.
15. Tidball JG. Force transmission across muscle cell membranes. *J Biomech.* 1991;24 Suppl 1.43-52.
16. Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med.* 2003 Aug;37(4):284-6.
17. Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injuries: current treatment options. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001 Jul-Aug;9(4):227-37.
18. Brickson S, Hollander J, Corr DT, Ji LL, Best TM. Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Dec;33(12):2010-5.
19. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003 Dec 8;163(5):1133-43.

20. Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, et al. Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. *Am J Pathol.* 2003 Jul;163(1):203-15.
21. Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc.* 1995 Jul;27(7):1022-32.
22. Rak J, Kerbel RS. bFGF and tumor angiogenesis--back in the limelight? *Nat Med.* 1997 Oct;3(10):1083-4.
23. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med.* 2004 Jan;25(1):73-7.
24. Perrone CE, Fenwick-Smith D, Vandenburg HH. Collagen and stretch modulate autocrine secretion of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins from differentiated skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 1995 Feb 3;270(5):2099-106.
25. Burkin DJ, Kaufman SJ. The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res.* 1999 Apr;296(1):183-90.
26. Best TM, Shehadeh SE, Levenson G, Michel JT, Corr DT, Aeschlimann D. Analysis of changes in mRNA levels of myoblast- and fibroblast-derived gene products in healing skeletal muscle using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Orthop Res.* 2001 Jul;19(4):565-72.
27. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):209-38.
28. Brickson S, Ji LL, Schell K, Olabisi R, St Pierre Schneider B, Best TM. M1/70 attenuates blood-borne neutrophil oxidants, activation, and myofiber damage following stretch injury. *J Appl Physiol.* 2003 Sep;95(3):969-76.
29. Schneider BS, Sannes H, Fine J, Best T. Desmin characteristics of CD11b-positive fibers after eccentric contractions. *Med Sci Sports Exerc.* 2002 Feb;34(2):274-81.
30. St Pierre Schneider B, Brickson S, Corr DT, Best T. CD11b+ neutrophils predominate over RAM11+ macrophages in stretch-injured muscle. *Muscle Nerve.* 2002 Jun;25(6):837-44.
31. Best TM, Hunter KD. Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2000 May;11(2):251-66.
32. Farges MC, Balcerzak D, Fisher BD, Attaix D, Bechet D, Ferrara M, et al. Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Feb;282(2):E326-35.
33. Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract.* 1991 Jan;187(1):1-22.
34. Hurme T, Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc.* 1992 Feb;24(2):197-205.
35. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature.* 1990 Jul 19;346(6281):281-4.
36. Yao CC, Ziober BL, Squillace RM, Kramer RH. Alpha7 integrin mediates cell adhesion and migration on specific laminin isoforms. *J Biol Chem.* 1996 Oct 11;271(41):25598-603.

37. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest.* 1995 Mar;72(3):341-7.
38. Kalimo H RJ, Järvinen M. Muscle injuries in sports. *Baillieres Clin Orthop.* 1997;2:1-24.
39. Aarimaa V, Rantanen J, Best T, Schultz E, Corr D, Kalimo H. Mild eccentric stretch injury in skeletal muscle causes transient effects on tensile load and cell proliferation. *Scand J Med Sci Sports.* 2004 Dec;14(6):367-72.
40. LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell.* 2002 Nov 15;111(4):589-601.
41. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem.* 2002 May;50(5):589-610.
42. Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 2000 Oct;23(10):1456-71.
43. Jarvinen M, Aho AJ, Lehto M, Toivonen H. Age dependent repair of muscle rupture. A histological and microangiographical study in rats. *Acta Orthop Scand.* 1983 Feb;54(1):64-74.
44. Cannon JG, St Pierre BA. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem.* 1998 Feb;179(1-2):159-67.
45. Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2002 Sep;161(3):895-907.
46. Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics.* 2003 Aug 15;14(3):261-71.
47. Hurme T, Kalimo H, Sandberg M, Lehto M, Vuorio E. Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle. *Lab Invest.* 1991 Jan;64(1):76-84.
48. Lehto M, Jarvinen M, Nelimarkka O. Scar formation after skeletal muscle injury. A histological and autoradiographical study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1986;104(6):366-70.
49. Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Joint Surg Br.* 1985 Nov;67(5):820-8.
50. Sacco P, Jones DA. The protective effect of damaging eccentric exercise against repeated bouts of exercise in the mouse tibialis anterior muscle. *Exp Physiol.* 1992 Sep;77(5):757-60.
51. Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Sievanen H, Kalimo H, Jarvinen M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. *J Orthop Res.* 1998 Mar;16(2):197-206.
52. Lehto M, Sims TJ, Bailey AJ. Skeletal muscle injury--molecular changes in the collagen during healing. *Res Exp Med (Berl).* 1985;185(2):95-106.
53. Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle a histological study of the effect of early mobilization and immobilization on the repair processes. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1975 May;83(3):269-82.

54. Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. A micro-angiographical study of the effect of early mobilization and immobilization on capillary ingrowth. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1976 Jan;84(1):85-94.
55. Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, et al. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *J Appl Physiol*. 2003 Aug;95(2):771-80.
56. Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *J Orthop Res*. 2003 Sep;21(5):798-804.
57. Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med*. 2001 Jul-Aug;29(4):394-402.
58. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*. 1994 Sep 1;302 (Pt 2):527-34.
59. Frank CB, Hart DA, Shrive NG. Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments--a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999 Jan;7(1):130-40.
60. Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res*. 2002 Jul;17(7):1180-9.
61. Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, Kaneda Y, Shrive NG, Marchuk LL, et al. Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo. *J Orthop Res*. 2000 Jul;18(4):517-23.
62. Negishi S, Li Y, Usas A, Fu FH, Huard J. The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries. *Am J Sports Med*. 2005 Dec;33(12):1816-24.
63. Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F, Uehara K, Fu FH, et al. Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitory effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. *Am J Sports Med*. 2008 Dec;36(12):2354-62.
64. Jozsa L, Reffy A, Demel S, Szilagy I. Alterations of oxygen and carbon dioxide tensions in crush-injured calf muscles of rat. *Z Exp Chir*. 1980 Apr;13(2):91-4.
65. Hurme T, Kalimo H. Adhesion in skeletal muscle during regeneration. *Muscle Nerve*. 1992 Apr;15(4):482-9.
66. Allikian MJ, Hack AA, Mewborn S, Mayer U, McNally EM. Genetic compensation for sarcoglycan loss by integrin alpha7beta1 in muscle. *J Cell Sci*. 2004 Aug 1;117(Pt 17):3821-30.
67. Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Nissinen L, Heino J, Jarvinen M, et al. Integrin and dystrophin associated adhesion protein complexes during regeneration of shearing-type muscle injury. *Neuromuscul Disord*. 2000 Feb;10(2):121-32.
68. Sorokin LM, Maley MA, Moch H, von der Mark H, von der Mark K, Cadalbert L, et al. Laminin alpha4 and integrin alpha6 are upregulated in regenerating dy/dy skeletal muscle: comparative expression of laminin and integrin isoforms in muscles regenerating after crush injury. *Exp Cell Res*. 2000 May 1;256(2):500-14.

69. Kaariainen M, Liljamo T, Peltö-Huikko M, Heino J, Jarvinen M, Kalimo H. Regulation of alpha7 integrin by mechanical stress during skeletal muscle regeneration. *Neuromuscul Disord*. 2001 May;11(4):360-9.
70. Kaariainen M, Nissinen L, Kaufman S, Sonnenberg A, Jarvinen M, Heino J, et al. Expression of alpha7beta1 integrin splicing variants during skeletal muscle regeneration. *Am J Pathol*. 2002 Sep;161(3):1023-31.
71. Mishra A, Woodall J, Jr., Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med*. 2009 Jan;28(1):113-25.
72. Slavotinek JP, Verrall GM, Fon GT. Hamstring injury in athletes: using MR imaging measurements to compare extent of muscle injury with amount of time lost from competition. *AJR Am J Roentgenol*. 2002 Dec;179(6):1621-8.
73. Aspelin P, Ekberg O, Thorsson O, Wilhelmsson M, Westlin N. Ultrasound examination of soft tissue injury of the lower limb in athletes. *Am J Sports Med*. 1992 Sep-Oct;20(5):601-3.
74. De Smet AA, Best TM. MR imaging of the distribution and location of acute hamstring injuries in athletes. *AJR Am J Roentgenol*. 2000 Feb;174(2):393-9.
75. Warren GL, Lowe DA, Armstrong RB. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med*. 1999 Jan;27(1):43-59.
76. Gibler WB, Lewis LM, Erb RE, Makens PK, Kaplan BC, Vaughn RH, et al. Early detection of acute myocardial infarction in patients presenting with chest pain and nondiagnostic ECGs: serial CK-MB sampling in the emergency department. *Ann Emerg Med*. 1990 Dec;19(12):1359-66.
77. Martinez Amat A, Marchal Corrales JA, Rodriguez Serrano F, Boulaiz H, Prados Salazar JC, Hita Contreras F, et al. Role of alpha-actin in muscle damage of injured athletes in comparison with traditional markers. *Br J Sports Med*. 2007 Jul;41(7):442-6.
78. Guerrero M, Guiu-Comadevall M, Cadefau JA, Parra J, Balius R, Estruch A, et al. Fast and slow myosins as markers of muscle injury. *Br J Sports Med*. 2008 Jul;42(7):581-4.
79. Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta Chir Scand*. 1976;142(1):47-56.
80. Jarvinen MJ, Einola SA, Virtanen EO. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. *Arch Phys Med Rehabil*. 1992 Mar;73(3):253-7.
81. Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, Garrett WE, Jr. Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *Am J Sports Med*. 1994 Jul-Aug;22(4):558-61.
82. Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *Am J Sports Med*. 1998 Mar-Apr;26(2):172-6.
83. Mishra DK, Friden J, Schmitz MC, Lieber RL. Anti-inflammatory medication after muscle injury. A treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. *J Bone Joint Surg Am*. 1995 Oct;77(10):1510-9.
84. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg*. 2005 Nov;16(6):1043-54.

85. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Nov;118(6):147e-59e.
86. Stenberg PE, Hill, R.J. . Platelets and megakaryocytes. *Wintrobe's clinical hematology.* 1999;Volume 1: 615–60
87. Haynesworth S. Platelet-rich plasma stimulates stem cell chemotaxis, proliferation and potentiates osteogenic differentiation. . *The Spine Journal.* 2006;5:68-72
88. Sixma JJ, Sakariassen KS, Beeser-Visser NH, Ottenhof-Rovers M, Bolhuis PA. Adhesion of platelets to human artery subendothelium: effect of factor VIII-von Willebrand factor of various multimeric composition. *Blood.* 1984 Jan;63(1):128-39.
89. Dhall TZ, Shah GA, Ferguson IA, Dhall DP. Fibrin network structure: modification by platelets. *Thromb Haemost.* 1983 Feb 28;49(1):42-6.
90. Nisbet CN, Yárim M, Ozak A. The Efficacy of Platelet-rich Plasma Gel and Topical Estradiol Alone or in Combination on Healing of Full-thickness Wounds. *Wounds.* 2009(7 July 2009):23-5.
91. Cronkite EP, Lozner, E.L. Deaver, J.M. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. *JAMA.* 1944;124:976-8.
92. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov;55(11):1294-9.
93. Doha DM, Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S.L., Dohan, A.J.J., Mouhyi, J., Bruno, G. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part: tehnological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101,37-44.
94. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Nov;114(6):1502-8.
95. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
96. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, Henriquet F, Venere G, Spagnolo S, et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs.* 1987 Jan;10(1):47-50.
97. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002 Feb;22(1):45-53.
98. Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001 Aug;21(4):345-55.
99. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2001 Aug;13(6):487-93
100. Krupski WC, Reilly LM, Perez S, Moss KM, Crombleholme PA, Rapp JH. A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors for treatment of chronic nonhealing wounds: a preliminary report. *J Vasc Surg.* 1991 Oct;14(4):526-32

101. Boyapati L, Wang HL. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant Dent.* 2006 Jun;15(2):160-70.
102. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
103. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.
104. Carlson NE, Roach RB, Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2002 Oct;133(10):1383-6.
105. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):484-8.
106. Antoniades HN, Williams LT. Human platelet-derived growth factor: structure and function. *Fed Proc.* 1983 Jun;42(9):2630-4.
107. Trippel CR, Einhorn TA, Mundy GR, Rosenfeld R. Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg* 1996:1272-86. .
108. Marx, R.E., Garg, A.K. Chapter I: The biology of platelets and the mechanism of platelet-rich plasma. 2005:3-30.
109. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002 Mar-Apr;17(2):184-90.
110. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):357-62.
111. Weibrich G, Kleis WK, Kunz-Kostomanolakis M, Loos AH, Wagner W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001 Sep-Oct;16(5):693-9.
112. Weibrich G, Kleis WK, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Apr;14(2):233-9.
113. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Jan-Feb;20(1):118-23.
114. Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, Hocker P, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.* 2006 Aug;91(2):135-9.
115. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):e37-44.
116. Ferreira CF, Carriel Gomes MC, Filho JS, Granjeiro JM, Oliveira Simoes CM, Magini Rde S. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Aug;16(4):456-60.

117. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol.* 2000 Oct;71(10):1654-61.
118. Kocazeybek B, Arabaci U, Akdur H, Sezgiç M, Erentürk S. Prospective evaluation of platelets prepared by single and random methods during 5 days of storage: aspects related to quality and quantity. *Transfus Apher Sci.* 2002 Feb;26(1):29-34.
119. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jul-Aug;14(4):529-35.
120. Lynch SE, Trippel SB, Finkelman RD, Hernandez RA, Kiritsy CP, Antoniadis HN. The combination of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I stimulates bone repair in adult Yucatan miniature pigs. *Wound Repair Regen.* 1994 Jul;2(3):182-90.
121. Lynch SE, Colvin RB, Antoniadis HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest.* 1989 Aug;84(2):640-6.
122. Hock JM, Canalis E. Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology.* 1994 Mar;134(3):1423-8.
123. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1283-316.
124. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, et al. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc).* 2003 Oct;39(10):787-800.
125. Rudkin GH, Miller TA. Growth factors in surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1996 Feb;97(2):469-76.
126. Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma.* 1996 Jul;41(1):159-67.
127. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):835-70.
128. Kubota S, Kawata K, Yanagita T, Doi H, Kitoh T, Takigawa M. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. *J Biochem.* 2004 Sep;136(3):279-82.
129. Cicha I, Garlich CD, Daniel WG, Goppelt-Struebe M. Activated human platelets release connective tissue growth factor. *Thromb Haemost.* 2004 Apr;91(4):755-60.
130. Schliephake H, Jamil MU. Impact of intraoral soft-tissue reconstruction on the development of quality of life after ablative surgery in patients with oral cancer. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Feb;109(2):421-30.
131. Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jul;36(7):1161-5.
132. Nakamura K, Koshino T, Saito T. Osteogenic response of the rabbit femur to a hydroxyapatite thermal decomposition product-fibrin glue mixture. *Biomaterials.* 1998 Oct;19(20):1901-7.
133. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol.* 1989 Jul;109(1):429-40.

134. Klass BR, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. Transforming growth factor beta1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgrad Med J*. 2009 Jan;85(999):9-14.
135. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Jan-Feb;18(1):93-103.
136. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389-95.
137. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Nov;108(6):1713-26.
138. Colville-Nash PR, Willoughby DA. Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Mol Med Today*. 1997 Jan;3(1):14-23.
139. Becker JC, Beckbauer M, Domschke W, Herbst H, Pohle T. Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury, and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointest Endosc*. 2005 Apr;61(4):560-7.
140. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol*. 2002 Jan-Feb;21(1):33-49.
141. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 2004 Dec;13(4):301-9.
142. Hansson HA. Insulin-like growth factors and nerve regeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Aug 27;692:161-71.
143. H S. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31: 469-84
144. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1991;53:217-39.
145. O'Toole G, MacKenzie D, Buckley MF, Lindeman R, Poole M. A review of therapeutic angiogenesis and consideration of its potential applications to plastic and reconstructive surgery. *Br J Plast Surg*. 2001 Jan;54(1):1-7.
146. Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Thorwarth M, Wiltfang J, Schlegel KA. Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. An explorative study. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Jun;17(3):312-20.
147. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006 May;24(5):227-34.
148. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Jun;60(6):630-5.
149. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg*. 2002 Feb;18(1):27-33.
150. Jackson, RF. Using platelet-rich plasma to promote healing and prevent seroma formation in abdominoplasty procedures. *Am J Cosmetic Surg*. 2003(20(4)):185-94.
151. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Jan;107(1):229-37

152. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Apr;17(2):212-9.
153. Bose B, Balzarini MA. Bone graft gel: autologous growth factors used with autograft bone for lumbar spine fusions. *Adv Ther.* 2002 Jul-Aug;19(4):170-5.
154. Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone.* 1999 Aug;25(2 Suppl):47S-50S.
155. DelRossi AJ, Cernaianu AC, Vertrees RA, Wacker CJ, Fuller SJ, Cilley JH, Jr., et al. Platelet-rich plasma reduces postoperative blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990 Aug;100(2):281-6.
156. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.* 2004 Feb;75(1):93-9.
157. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HT, Weinans H, Verhaar JA, et al. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med.* 2008 Jun;36(6):1171-8.
158. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* 2005 Mar;23(2):281-6.
159. McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res.* 2009 Aug;27(8):1033-42.
160. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A, et al. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol.* 2008 Jun;215(3):837-45.
161. Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop.* 2006 Oct;77(5):806-12.
162. Carter CA, Jolly DG, Worden CE, Sr., Hendren DG, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol.* 2003 Jun;74(3):244-55.
163. Henderson JL, Cupp CL, Ross EV, Shick PC, Keefe MA, Wester DC, et al. The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear Nose Throat J.* 2003 Aug;82(8):598-602.
164. Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, Akino K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol.* 2005 Jul;153(1):29-36.
165. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005 Jul-Aug;11(7-8):1198-211.
166. Liu Y, Kalen A, Risto O, Wahlstrom O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.* 2002 Sep-Oct;10(5):336-40.
167. Dubuisson AS, Beuermann RW, Kline DG. Sciatic nerve regeneration across gaps within collagen chambers: the influence of epidermal growth factor. *J Reconstr Microsurg.* 1993 Sep;9(5):341-6

168. Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Kluter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*. 1999 Feb;39(2):144-8.
169. www.petportall.com Tavşan anatomisi. Erişim tarihi 02.05.2010
170. Black AS, Kanat IO. A review of soft tissue calcifications. *J Foot Surg*. 1985 Jul-Aug;24(4):243-50.
171. Crisco JJ, Hentel KD, Jackson WO, Goehner K, Jokl P. Maximal contraction lessens impact response in a muscle contusion model. *J Biomech*. 1996 Oct;29(10):1291-6.
172. De Obarrio JJ, Arauz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000 Oct;20(5):486-97.
173. Thor A, Wannfors K, Sennerby L, Rasmusson L. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with autogenous bone, platelet-rich plasma, and implants: 1-year results of a controlled prospective 5-year study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005;7(4):209-20.
174. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004 Apr;34(4):665-71.
175. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002 Apr;30(2):97-102.
176. Bowen-Pope DF, Vogel A, Ross R. Production of platelet-derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Apr;81(8):2396-400.
177. Mitchell CA, McGeachie JK, Grounds MD. The exogenous administration of basic fibroblast growth factor to regenerating skeletal muscle in mice does not enhance the process of regeneration. *Growth Factors*. 1996;13(1-2):37-55.
178. Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, et al. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve*. 2003 Sep;28(3):365-72.
179. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem*. 1991 Apr;45(4):319-26.
180. Lynch S.E GRJ, Marx R.E. Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. 1999:71-83.
181. Stenberg BD, Phillips LG, Hokanson JA, Hegggers JP, Robson MC. Effect of bFGF on the inhibition of contraction caused by bacteria. *J Surg Res*. 1991 Jan;50(1):47-50.
182. Sprugel KH, Greenhalgh DG, Murray MJ, Ross R. Platelet-derived growth factor and impaired wound healing. *Prog Clin Biol Res*. 1991;365:327-40.
183. Sanchez M, Anitua, E., Andia, I. Application of autologous growth factors on skeletal muscle healing. *Sports Medicine*. 2005;September 4:66.
184. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg*. 2005 Jun;239(6):866-73

185. Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol.* 2004 Mar;164(3):1007-19.
186. Zhu J, Li Y, Shen W, et al. Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem.* 2007;282:25852-63.
187. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyl G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, et al. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplant.* 1998 Nov-Dec;7(6):585-98.
188. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 2009 Jun;37(6):1135-42.
189. Martinez-Gonzales JM, Sanchez, J.C., La Fuente, J.C.G., Trapero, J.C., Leston, J.M.S. Do ambulatory-use Platelet-rich plasma (PRP) concentrates present risks? . *Medicina Oral.* 2002;7:375-90.
190. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37(11):2259-72.
191. Peter AM, Everts, J.T.K., Weibrich,G., Jacques, P.A.M. Platelet rich plasma and platelet gel. A Review. 2006;Chapter 2:174-87.