

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ABD

**OSTEOJENİK POTANSİYEL AÇISINDAN TROMBOSİTTEN
ZENGİN PLAZMA (TZP - PLATELET RİCH PLASMA-PRP)
İLAVE EDİLMİŞ KAFA KEMİK PARÇALARININ, KAFA
KEMİK TOZLARININ VE PERİOSTEUMUN
KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. MUSTAFA RAŞİD TOKSÖZ
UZMANLIK TEZİ

**KONYA
EKİM 2012**

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ABD

**OSTEOJENİK POTANSİYEL AÇISINDAN TROMBOSİTTEN
ZENGİN PLAZMA (TZP - PLATELET RİCH PLASMA-PRP)
İLAVE EDİLMİŞ KAFA KEMİK PARÇALARININ, KAFA
KEMİK TOZLARININ VE PERİOSTEUMUN
KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. MUSTAFA RAŞİD TOKSÖZ
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NEDİM SAVACI

**KONYA
EKİM 2012**

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kemik Dokusu	3
2.1.1 Kemik Dokusunun Tanımı ve Genel Özellikleri	3
2.1.2 Kemik Histolojisi	3
2.1.3 Hüresel Elemanlar	4
2.1.4 Kemik Matriksi	8
2.1.5 Kemik Dolaşımı	10
2.1.6 Kemikleşme	11
2.1.7 Kemik Yaralanması ve Tamiri	13
2.1.8 Kırık Kaynamasına Etkili Faktörler	16
2.1.9 Kemik Greft İyileşmesi	19
2.2 Trombositler ve Trombositten Zengin Plazma	19
2.2.1 Trombositlerin İçerikleri Ve Fonksiyonları	19
2.2.2 Trombositten Zengin Plazma	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1 Çalışma grupları	24
3.2 Trombositten Zengin Plazma (TZP) Hazırlanması	25
3.3 Hayvan Modeli Ve Cerrahi İşlem	29
3.4 Değerlendirme Yöntemleri	36
3.4.1 Genel Değerlendirme	37
3.4.2 Histolojik Değerlendirme	37

3.4.3 Radyolojik Değerlendirme	40
3.5 İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1 Genel Bulgular	43
4.2 Histopatolojik Bulgular	43
4.3 Radyolojik Bulgular	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	58
6. ÖZET	60
7. ABSTRACT	61
9. KAYNAKLAR	62

TABLÖLAR

Tablo 1: Trombosit granüllerinin içerikleri

Tablo-2: Hayvan çalışmasını gruplarının gösterilmesi

Tablo-3: Grupların haftalara göre defekt alan ortalamalarının % cinsinden ifadesi

Tablo-4: Gruplara göre dansite ortalamalarının gösterilmesi

ŞEKİLLER

Şekil-1: Çalışma gruplarının resimle gösterilmesi

Şekil-2: ACD-A solüsyonu ve bu solüsyon ile karışmış 44 cc rat kanı

Şekil-3: 44 ml kan+4 ml ACD-A karışımının ilk santrifüjden sonraki hali

Şekil-4: Kırmızı kan hücreleri atılmış ve ikinci santrifüje hazırlanmış olan Plazma ve Trombosit ve Lökosit karışımı

Şekil-5: İkinci santrifüj sonucu TZP'nin eldesi

Şekil-6: Sığır kaynaklı trombin preparatı

Şekil-7: Ratta kritik boyutta kemik defektinin oluşturulması

Şekil-8: Ratta kritik boyutta kemik defektinin kemik tozları ile doldurulması

Şekil-9: Ratta kritik boyutta kemik defektinin kemik tozları + TZP ile doldurulması

Şekil-10: Ratta kritik boyutta kemik defektinin kemik parçaları ile doldurulması TZP konmadan hemen önceki görüntüsü

Şekil-11: Ratta kritik boyutta kemik defektinin kemik parçaları + TZP ile doldurulması

Şekil 12: Ratta kritik boyutta kemik defektinin bütün kemik grefti+ TZP ile doldurulması

Şekil-13: Tomografik görüntülerden defektin ebatlarının ve hacminin ölçülmesi

Şekil-14: 8.hafta görüntülerden kemikleşmenin olduğu alanlardan her hayvanda 6 ayrı ölçüm yapılarak ortalama yeni kemik dansite değeri Hounsfield Unit (HU) olarak hesaplandı

Şekil-15: Kemik tozu ve kemik spikülü içermeyen yalnızca inflamatuvar hücreler içeren görünüm izlenmektedir. (Grup-1,Hematoksilen-Eozin x10)

Şekil-16: Cansız kemik spikülleri (ok) ve etrafında yoğun yabancı cisim reaksiyonu görülmektedir

Şekil-17: Kemik tozları (ok) ve hemen bunların sağında uzanan kemik spikülü gözlenmektedir. (Grup-2,Hematoksilen-Eozin x20)

Şekil-18: Canlılığını kaybetmiş kemik tozları (ok) ve hemen yanında canlı kemik spikülü görülmektedir. (Grup-2,Hematoksilen-Eozin x10)

Şekil-19: Canlılığını kaybetmiş kemik tozları görülmektedir(oklar) (Grup-2,Hematoksilen-Eozin x20)

Şekil-20: Kemik spikülleri ve etrafta yoğun inflamatuvar hücreler görülmektedir. (Grup-3,Hematoksilen-Eozin x10)

Şekil-21: kalın kemik parçaları ve canlı kemik iliği (kalın ok), kemiğin arasına giren bağ doku mevcuttu (ince ok) (Grup-4,Hematoksilen-Eozin x4)

Şekil-22: Canlı kemik doku arasına girmiş canlı bağ dokusu hücreleri (Grup-4,Hematoksilen-Eozin x10)

Şekil-23: Normal kemik yapısının korunamadığı ve dejenere olduğu, birbirinden ayrılan kemik dokuların arasına bağ dokunun girdiği kesit görülmektedir. (Grup-4,Hematoksilen-Eozin x4)

Şekil-24: Rezorbsiyonun çok belirgin olduğu Grup-4'e ait bir preparat görülmektedir.

Şekil-25: Parçalanmış ve etrafa dağılmış kemik dokular izlenmektedir. Ayrıca kemik yoğunluğunun azlığı dikkat çekmektedir. (Grup-4,Hematoksilen-Eozin x10)

Şekil-26:Dev hücre ve etrafında kemik rezorbsiyonu (ince ok) ve etrafında gelişen bağ dokudan zengin yabancı cisim reaksiyonu izlenmektedir.(Grup-3,Masson-Trikrom,x10)

Şekil-27: Hiç boyanmanın olmadığı, yani osteoblastik aktivitenin olmadığı Grup-2 ye ait bir görüntü izlenmekte (Anti-Runx-2, x20)

Şekil-28: Şekilde kemik etrafında Anti-Runx-2 ile +++ boyanan Grup-4'e ait bir görüntü izlenmektedir. (Anti-Runx-2, x20)

Şekil-29: Gruplara göre Runx ekspresyon yüzdeleri

Şekil-30: Hiç boyanmanın olmadığı Grup-1'e ait bir kesit izlenmektedir. (Anti-Sp7, x10)

Şekil-31: Osteoblastik farklılaşmanın olduğu ve ++ boyanan Grup-3'e ait bir kesit görülmektedir. (Anti-Sp7, x20).

Şekil-32: Gruplara göre Sp7 ekspresyon yüzdeleri

Şekil-33: Grup-2'ye ait örnekte ++ boyanma gözlenmektedir. (Anti-Sparc, x10)

Şekil-34: Grup-2'ye ait örnekte ++ boyanma gözlenmektedir. (Anti-Sparc, x20)

Şekil-35: Gruplara göre Anti-Osteonektin boyanma yüzdeleri

Şekil-36:Gruplardaki kemik spikül kalınlık ortalamaları

Şekil-37: İnce kesit tomografiden defekt alnın hesaplanması

Şekil-38: Bütün kemik greftinin olduğu grupta gerçek defekt alnın hesaplanması

Şekil-39: Sıfırncı, ikinci, beşinci ve sekizinci haftalarda grupların kalan defekt alan ortalamaları

Şekil-40: Grupların haftalar içindeki iyileşmeleri gösterilmektedir

Şekil-41: Grupların dansite ortalamaları

Şekil-42: Normal kemik dansitesinin ölçümü

SİMGELER VE KISALTMALAR

- PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
TGF- α : Transforme edici büyüme faktörü- α
TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü- β
IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
EGF: Epidermal büyüme faktörü
ALP: Alkalane fosfataz
PTH: Parathormon
TNF- α : Tümör nekrozis faktör- α
IL-1: İnterlökin-1
IL-3: İnterlökin-3
IL-4: İnterlökin-4
IL-6: İnterlökin-6
IL-11: İnterlökin-11
IL-13: İnterlökin-13
IL-18: İnterlökin-18
IFN- γ : İnterferon- γ
Ca: Kalsiyum
P: Fosfat
BMP: kemik morfojenik proteini
TZP: Trombositten zengin plazma
HU: Hansfield Unit

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik vücudun şekil almasından ve önemli organların korunmasından sorumlu bir dokudur. Kemik kırıkları, defektleri ve iyileşmesi literatürde sık araştırma yapılan konulardır. Kemik kırık ve defektlerini onarıırkenki amaç tam ve kısa sürede gerçekleşen bir iyileşme sağlamaktır. Kemik defektlerinde belli bir kritik büyüklüğün altındaki defektler kendiliğinden kapanabilirken, bunu aşmış olan defektlerin onarımı için cerrahi gerekir.(1) Cerrahi müdahale ile yapılan rekonstrüksiyonda metaller, alloplastik materyaller ve hayvan kaynaklı greftler kullanılabileceği gibi otogreftler de tercih edilebilir.(2) Bunlardan en hızlı ve doğal çözüm otogreftlemedir. Konjenital nedenlerle ya da travmatik nedenlerle orataya çıkan defektlerin onarımında yapılan otogreftlemede her zaman tam bir kemik greftine ulaşmak mümkün olmayabilir.(3) Ayrıca cerrahi sırasında kırılan, parçalanmış ve toz halinde açığa çıkan kemik elemanlarını da kullanmak gerekebilir. Bu anlamda tam kemik grefti, kemik fragmanları ve kemik toz parçalarına eklenmiş Trombositten zengin plazma kullanımı çalışılmıştır. Trombositten zengin plazma Plastik cerrahinin dışında çene cerrahisi, Ortopedi ve Beyin Cerrahisi ve Genel Cerrahi hekimlerince de yara iyileşmesi ve kemik uygulamalarla birlikte kullanılmaktadır.

Trombositten zengin plazma PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü), VEGF(Vasküler endotelial büyüme faktörü), TGF- α (Transforme edici büyüme faktörü- α), TGF- β , IGF (İnsülin benzeri büyüme faktörü), FGF (Fibroblast büyüme faktörü) ve EGF (Epidermal büyüme faktörü) içerir ve otolog kanın 2 sefer santrifüj edilmesiyle elde edilir.(4) Böylece normal plazmadakine oranla trombosit miktarı artmış bir plazma eldesi sağlanır. Bu plazmaya trombine eklenerek kemik iyileşmesinde rol alan ve trombositlerde bulunan mediatörlerin salınımı sağlanır. Bu aşamada jel haline gelen ürün periost üzerine doğrudan konabileceği gibi kemik toz, parça ve bütün kemik greftlerine karıştırılıp da kullanılabilir.

Hastanın kendisinden ve az bir maliyetle üretiliyor olması Trombositten zengin plazmanın klinikte kullanım bulmasını kolaylaştırmış ve yapılan çalışmalarda kemik iyileşme ve kemik greft tutmasında faydaları gösterilmiştir.(5) Önemli bazı faydaları kaynamayı hızlandırma, enfeksiyona yatkınlığa azaltma, kanama kontrolüne yardımcı olmaktır. Ancak yine de bu faydaların sonuçlar konusunda şüpheler uyandırması bu konuda daha yapılacak çok klinik çalışmaya ve deney hayvan çalışmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.(6)

Bu çalışmanın amacı sabit bir etken olarak trombositten zengin plazmanın eklendiği kemik tozları, kemik parçaları ve bütün kemik greftinin iyileşme ve yaşayabilirliğini kıyaslamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik dokusu

2.1.1 Kemik dokusunun tanımı ve genel özellikleri

Kemik doku, embriyolojik olarak mezenkimal hücrelerden encondral ya da membranöz kemikleşme ile gelişen bir dokudur. İskelet sisteminin en önemli yapı taşını oluşturan kemik doku hayati organlara koruma sağlar, vücudu destekler, kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içerir ve metabolik önemi olan kalsiyum deposu olarak görev alır. Ayrıca üzerine yapışan kasların düzenli kontraksiyonu ile vücudun hareket etmesini sağlar.(7) Tüm bunlar kemik iyileşmesinde göz önüne alınmalı ve olaya hücresel, mekanik, hormonal, biyokimyasal açıdan da yaklaşılmalıdır.

2.1.2 Kemik Histolojisi

Kemik Tipleri

Kemik dokunun morfolojik tipleri nonlameller, kortikal ve kansellöz kemiktir. Embriyonik dönemde, kırık iyileşmesinde, hiperparatiroidizm ve Paget hastalığı gibi patolojik süreçlerde bulunan immatür kemik örgülü (nonlamellar yapı) iken normal kemik lamellar yapıdadır. Örgülü kemik döngüsünün arttığı zayıf, esnek, histolojik olarak da rastgele dizili kollojen lifler ve osteoblastlar ile döşeli düzensiz vasküler boşluklardan oluşan bir yapıdır. Daha sonra bu yapı remodeling ile kortikal ya da kansellöz kemiğe dönüşür.(7)

A. Kortikal Kemik

Lameller (kompakt) kemik olarak da adlandırılır. İskeletin %80' ini oluşturur. Nonlameller kemikten remodeling sonucu oluşur. Uzun kemiklerin dış yüzünü yassı kemiklerin ise iç ve dış yüzünü oluşturur. Kortikal kemiğin ana yapısını "Havers sistemi" olarak da adlandırılan osteonlar oluşturur. Osteon uzunlamasına dizili vasküler kanalları (Havers kanalları) saran silindirik şekilli vasküler kemikten oluşur. Horizontal dizilimli kanallar (Volkmann kanalları) ise komşu osteonları birleştirir. Bu kanallar sayesinde, Havers kanalları kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokuda difüzyon olanağı yoktur. Kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar taşınır. Kortikal kemiğin dayanıklılığı osteonların sıkı

dizilimine bağlıdır. Osteonlar arasında intersitisyel lamellalar vardır ve sement hatları osteonun dış sınırını yapar. Besinler intraosseoz dolaşım ile sağlanır.(7) Kortikal kemik, spongioz kemiğe göre daha yavaş bir döngüye, daha yüksek bir Young modülüsüne, torsiyon ve bükülmelere karşı çok daha yüksek bir dirence sahiptir.

B. Spongioz Kemik

Spongioz kemik bal peteği görünümlü, boşluklarında kan elemanları içeren, 1 mm kalınlığında trabeküllerden oluşur. Spongioz kemik, uzun kemiklerin uçlarında ve vertebralarda bulunur. Burada trabeküllerin kortekse dik yerleşimli dizilimi sayesinde dış yüklenmeye yapısal karşı koyma gücü oluşturur. Yoğunluğu daha azdır ve stres çizgilerine bağlı olarak daha fazla remodeling meydana gelir. Daha yüksek bir dönüşüm hızı vardır. Young modülüsü daha küçüktür, bu nedenle kortikal kemikten daha elastiktir. Trabeküler kemiğin plaklar halinde, birbiri ile bağlantılı, üç boyutlu dantele benzer yapı oluşturması, yüksek yüzey/alan oranı oluşturarak yüksek metabolik aktivite işlevi görür, aynı zamanda kemiğe yansıyan çeşitli yüklere (özellikle kompresif) karşı kemiğin dayanma gücünü de artırır. Spongioz kemik iç endostal yüzeyde sürekli yeniden yapılanma oluşturur. Diğer isimleri trabeküler kemik, kansellöz kemik ve süngerimsi kemiktir.

2.1.3 Hücresel Elemanlar

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

Osteoblastlar

Osteoblastlar olgunlaşmış, metabolik olarak aktif, kemik üreten hücrelerdir. Bu hücreler matriksi oluşturan osteoidi üretirler. Mezenkimal kök hücrelerden gelişen osteoblastlar, ortalama 1–10 hafta yaşarlar. Osteoblastlar 20–30 µm büyüklüğünde olup kemiğin yüzeyinde tabaka halinde yan yana dizili bulunurlar.

Osteoblastlar kemik matriksin organik kısımlarının, kollojen liflerin, proteoglikanların ve glikoproteinlerin sentezinden sorumludur. Henüz kalsifiye olmamış olan bu dokuya osteoid adı verilir. Osteoblastlar meydana getirdikleri osteoid içinde gömülü beklerler. Bu

doku kalsifiye olunca osteoblastik aktiviteler azalır, osteoblastların şekilleri basıklaşır ve birer osteosit olurlar. Kemığın inorganik kısımlarının yapılabilmesi osteoblastların varlığına bağlıdır. Matriks sentezini yapmaya başladıklarında şekilleri kübikten prizmatığe kadar değişen bu hücrelerin aktivite durumlarına göre şekilleri oval de olabilir. Osteoblastların diğer osteoblastlar ile temaslarını sağlayan sitoplazmik uzantıları vardır. Hücresel ve sitoplazmik uzantıların etrafında matriksin oluşması laküna ve kanalcıkları belirginleştirir. Osteoblastlar polarize hücrelerdir. Matriksin sekresyonu, daha önce yapılmış kemik matriksi ile temas halinde olan osteoblast yüzeylerinden olur. Böylece yeni ama kalsifiye olmamış matriks, osteoblastlar ile daha önceden oluşan kemik matriksi arasında yer alır. Bu olay kemik apozisyonudur. Kemik yapımı süresince kemik trabekül ve lamellerin üzerinde devamlı bir osteoblast zinciri vardır.

Osteoblastlar, osteosit ve ekstrasellüler matriks ile olan iletişimi transmembran proteinler ve integrinler aracılığıyla sağlarlar. Lokal sitokinler ve paratiroid hormon, D vitamini metabolizmasının yan ürünleri, gonadal ve adrenal steroidler gibi moleküllere spesifik reseptör içerirler. Bu reseptörler ile aktif hale gelen osteoblastlar, osteoklastları aktif hale getirecek mediatörler salgılar ve ayrıca hematopoetik hücrelerin değişimine katkıda bulunurlar.

Osteoblastların görevi kemik matriksindeki kollojen ve kollojen dışı protein senteziyle beraber, ekstrasellüler matriks fibrillerinin düzenini ve osteoid materyalin mineralizasyonunu sağlamaktır. Alkalin fosfataz enzimi sayesinde içerdikleri adenzintrifosfatazın ortama saldığı Ca^{+} iyonu ile bu mineralizasyonu sağlarlar. Sentezlediđi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler ile osteoklastların rezorbsiyonuna yardım ederler.

Osteoblastlar aktif olduktan sonra bir kısmı kemik yüzeyinde metabolizmasını yavaşlatıp istirahat hücresi olarak kalır. İstirahat halindeki az sayıda organel içerdikleri için yassılaşımlardır. Sialoprotein, osteonektin, osteopontin ve ALP sentezlerler. Osteoklastların kemik yüzeyinde yerleşmesine PTH etkisiyle aracılık ederler. Kemik yapımı sonlanmaya başladığında, osteoblastların bir kısmı osteositlere dönüşür ve diğer kısmı periost ve endostal yüzeyin örtücü hücrelerine dönüşürler. Diğer bir kısmı da apoptozis ile ortamdaki kaybolur.

Osteositler

Osteositler badem şekilli, stoplazmik uzantıları olan, küçük mononükleer hücrelerdir ve osteoblastlara göre daha az miktarda golgi aparatı, mitokondri ve endoplazmik retikulum içerirler. Daha yoğun çekirdek kromatini taşırlar. Tüm kemik hücrelerinin %90' ı osteosit hücrelidir ve kemik dokuda osteoblastlardan 10 kat fazla osteosit hücresi bulunur. Osteositler mineralize matriks içerisinde yer alırlar. Osteositler kemik doku içerisindeki haberleşmesinden ve yeniden yapılanmadan sorumlu hücrelerdir. Kemiğe uygulanan fiziksel kuvvetlerin yorumlayıp ve uygun cevabın verilmesini sağlayan da osteositlerdir.

Osteositler uzun yaşayan hücrelerdir ve ömrü birkaç yıl kadardır. Osteositlerin zamanla matriks üretme özellikleri kaybolur ve hücre küçülür. Çevredeki matriksi rezorbe ederek osteositik lakünaları oluştururlar. Oluşan her bir lakünada bir osteosit vardır. Kemiğin sert yapısı içinde yerleşmiş osteositler, lakünalar sayesinde vücut sıvılarıyla ve diğer osteositlerle bağlantı halindedir. Lakünalardan her yöne uzanan dar, ince tünellere de kanalikuli denir. Her bir osteositten çıkan sitoplazmik uzantılar kan damarlarına ve diğer osteositlere uzanarak bir ağ oluştururlar. Her bir osteositten çıkan sitoplazmik uzantılar kan damarlarına ve diğer osteositlere uzanarak bir ağ oluştururlar. Böylelikle gerekli iyon ve metabolitlerin transferini ve besin alışverişini sağlarlar.(7)

Osteoklastlar

Hematopoetik mononükleer / fagositik seri hücrelerinden gelişen öncü hücreler, kemik yüzeyinde füzyona uğrayarak osteoklast olarak bilinen 5–50 arası çekirdeği olan dev hücrelere dönüşürler. Temel olarak bu hücreler kemik yıkımından sorumludur.(7) Kıvrımlı kenarlara sahip bu hücreler, mitokondri ve vakuolden zengin sitoplâzması, kalsitonin reseptörleri vardır ve asit fosfataz, kollojenaz ve diğer proteolitik enzimler üretirler ve kemiğin inorganik ve organik matriksi ile kalsifiye kartilajı çözerler. Bu süreç sonunda “Howship Lakünaları” olarak bilinen kemik yüzeyi erozif alanları oluşur. Bu kavite kortikal kemikte Haversiyen kanalını oluşturur. Osteoklast gelişimi için osteoblastik aktiviteye ihtiyaç vardır. Osteoblastlar tarafından salınan makrofaj koloni uyarıcı faktör, osteoklast differansiyasyon faktör, kalsitriol, PTH, D vitamini, tiroksin, TNF- α , IL-1, IL-3, IL-6, IL-11 prostoglandin E2 osteoklastları aktive ederken, osteoblast kaynaklı osteoprotogenin, kalsitonin, östrojen, bifosfonat, TGF- β , IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-18 inhibe eder.

Osteoklastları hormonlar da etkiler. Parathormon, kalsitonin ve osteoblast stimule edici faktör bağlayan reseptörlere sahiptir. Kemik yıkımı, kemiğin şekillenmesi, kemik rezorpsiyonu sırasında meydana gelen artıkların da ortadan kaldırılmasında aktif olarak rol alırlar. Bu olayların hepsi osteoklast ve osteoblastların uyum içinde çalışmasıyla olur.

Osteoprogenitör Hücreler

Mezenkim kaynaklı ana hücrelerin alt grubudur ve sonucu 2 tipi vardır. Birincisi endoplazmik retikulum ve az gelişmiş golgi cisimciği bulunan preosteoblastlardır, bu hücrelerden osteoblastlar gelişir. İkinci ise osteoklastlara öncülük eden, belirgin mitokondri ve serbest ribozomları ile tanınan hücrelerdir. Özelleşmiş kemik hücreleri kemiğin oluşumundan, rezorpsiyonundan ve kemik yapısının devamlılığını sağlamaktan sorumludur. Bu hücreler uyarılmadıkları zaman kemik yüzeyi yakınlarında, periostun iç yüzeyinde, endostta ve Havers kanallarında bulunurlar. Kırık sonucu uyarıldıklarında, belirgin nükleuslu füziform iri hücrelere dönüşürler. Osteoprogenitör hücrelerin her zaman mitoz özelliği ve kondroblast, osteoblast ve osteoklastlara farklılaşma yetenekleri vardır. Kemikteki iki ana hücre olan osteoklastlar ve osteoblastlar, kaynağını hemopoetik ve stromal hücre sistemi olarak adlandırılan iki farklı hücre soyundan alırlar

Osteoprogenitör Hücreler (Osteojenik Pre-kürsör Hücreler)

Osteoprogenitör hücreler kemiğin tüm yüzeylerinde bulunur. Periostun derin tabakasını ve internal medüller yüzeye uzanan endosteumu yaparlar. Periost; kaba, vasküler konnektif doku tabakasıdır. Kemiğin eklem oluşturmayan yüzlerinde bulunur. “Fibröz tabaka” olarak adlandırılan kalın dış tabakası, düzensiz, yoğun konnektif dokudan oluşur. Daha ince ve zayıf iç tabakası ise “osteojenik tabaka” olarak adlandırılır ve osteojenik hücreler tarafından oluşturulur. Endosteumun fibröz içeriği yoktur. Tek tabaka osteojenik hücre içerir.

Kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenkim hücreleridir. İğ şeklinde fibroblastlara benzerler. Mitozla bölünüp çoğalırlar, çoğalan hücrelerin bir bölümü osteoblastlara dönüşür. Kemiklerde yıkılan, kemik dokusunun birim yapısı olarak kabul edilen osteonların yerine yenilerinin yapımı sırasında ya da kırıklarda yeni kemik dokusu şekillenirken aktifleşerek bölünürler. Bölünerek osteoblastları oluştururlar. Periostun iç katında, Havers ve Volkman kanallarındaki bağ dokusunda, endosteumda bulunurlar.

Kemik Zarları

Kemiklerin iç ve dış yüzeyleri kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan tabakalarla örtülüdür. Bunlardan dış yüzeyde olanı periosteum, iç yüzeyde olanı ise endosteum olarak isimlendirilir.

Periosteum

Kemik dokusunu dıştan saran ve eklem yüzeyi hariç kemiği dıştan çevreleyen vasküler konnektif bağ dokusuna periost (periosteum) adı verilir. Periosteum kemiğe destek sağlarken beslenme ve tamir olaylarında da görev alır. Yapısal olarak kollajen ve elastik lifler içeren yapı "Sharpey lifleri" adı verilen kollajen uzantılar ile kemiğe bağlanır. Perikondrium bol damar içeren, iki katmanlı bir zarıdır. Kalın dış tabaka fibröz tabaka olarak da adlandırılır ve düzensiz, yoğun konnektif dokudan oluşan ipliksel bir yapısı vardır. Daha ince ve zayıf iç tabaka ise osteojenik tabaka olarak bilinir ve gevşek bağ dokusunda olup, hücreden zengindir. Bu hücreler genelde osteoprogenitör hücrelerdir. Tabakaların her birinin ayrı fonksiyonları vardır. Dış kat metabolizmada rol alan damarları ve lenfatikleri içerir.(7) İç tabakanın hücreleri ise kemik hasarında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik oluşumunda aktif görev alırlar. Kemik onarımına katılan bu hücreler normal koşullarda aktif değildir.

Endosteum

Periosttan daha ince olan ve retiküler bağ doku niteliğindeki bu tabakada tek sıra osteojenik hücre içerir. Bu hücreler osteoblastlara dönüşerek kemik yapımına katılırlar. Ayrıca kemik iliği kaynaklı retiküler bağ dokudan oluştuğu için kemik doku yanında, hemopoetik hücreleri yapabilme özelliği de vardır. Endosteum kompakt kemiklerin iç yüzlerini ve spongios kemikleri oluşturan trabeküllerin dış yüzlerini örter. Kemik zarlarının temel işlevi; kemik dokusunun beslenmesi, büyümesi ve onarımını sağlamaktır.

2.1.4.Kemik matriksi

Diğer destek dokuları gibi kemik dokusunda da hücreler arası madde (fundamental substans, temel madde) çoğunlukta, hücreler azınlıktadır. Temel maddenin diğer destek dokulardan farkı ise inorganik maddeler de içermesidir. Kemik matriksi genellikle asidofilik özelliktedir. Bunun nedeni; bazofiliyi sağlayan proteoglikanların (kondriodin 4,6 sülfat) kemikte az bulunmasıdır. Kemik ağırlığının yaklaşık %20'si sudur. Hacminin ise çoğunu kollajen oluştururken, kuru kemik ağırlığının %60-70'ini inorganik kalsiyum fosfat, %30-35'ini ise organik fibröz protein ve kollajen oluşturur. Kemik iliğine kıyasla, kemikteki hücre sayısı daha azdır.

Kemik matriksin organik kısmı, Tip I kollajenden ve proteinler ile ilgili glikozaminoglikanları içeren amorf temel maddeden oluşur. Kemik dokusunda az miktarda bulunan şekilsiz temel maddeyi oluşturan; proteoglikanlar; kondroitin-4-sülfat, kondroitin-6-sülfat, keratan sülfat ve yine bir glikoprotein olan osteonektin, osteokalsin, osteopontin, kemik sialoproteini meydana getirir. Kalsiyum fosfat kemikte iğne biçimli Hidroksiapatit (HA) kristalleri formunda bulunur. Bunun dışında; inorganik kısımda bikarbonat, sitrat, sodyum, potasyum, magnezyum, florid bulunmaktadır. Ayrıca vücuttaki kalsiyumun %99'u, fosforun %85'i, magnezyum ve sodyumun %40-60'ı iskelet sisteminde bulunur. Hidroksiapatit kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte iç içe organize olmuşlardır ve kemikteki önemi, osteoid mineralizasyonu sayesinde, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. Kemiğin üç temel ögesi olan kollajen, hücreler ve mineraller durağan olmayıp devamlı bir döngü içindedirler. Bu döngü kemik üzerine etki eden kuvvetlerle bağlantılı olup, basınç altındaki kemikte rezorpsiyon, gerilim kuvvetleri altında ise apozisyon görülür. Ölen hücrelerin yerine yenisi geçerken, kollojen ve mineraller devamlı olarak rezorbe edilip, yeniden oluşturulur. Remodeling adı verilen, rezorpsiyon ve depozisyon işlemleri arasındaki denge sayesinde kemiğin şekli ve hacmi neredeyse değişmeden kalır. Rezorpsiyon depozisyon kadar hızlı devam edemediğinde kemiğin kırılabilirliği artar (Paget hastalığı). Yeniden yapılanmadaki (remodeling) dengenin rezorpsiyon lehine bozulmasında ise osteoporoz ortaya çıkar. Kemik metabolizması hormonlar ve lokal faktörlerin kontrolü altındadır. Bunlardan en önemlileri; parathormon, kalsitonin ve vitamin D'dir. Osteoblastlar kalsiyum reseptörleri içeren yegâne kemik hücreleridir. Bu sebeple osteoblastlar paratiroid hormon etkisindedirler. Parathormon kalsiyumun, kemikte kalsiyum içeren boşluklara geçişini artırarak ekstrasellüler kalsiyum seviyesini düzenler. Vitamin D ise intestinal ve renal kalsiyum bağlayıcı proteinleri uyararak aktif kalsiyum transportunu kolaylaştırır. Kalsitonin de plazma kalsiyum seviyesinde akut artışa cevap olarak tiroid bezinin parafoliküler hücrelerinden salgınır ve kalsiyuma bağlı hücresel metabolik aktiviteyi inhibe eder.

Sağlam ve dayanıklı bir kemikte kemik matriksin bu kısımlarının birbirine oranı dengeli olmalıdır. İnorganik kısımda eksiklik olursa kemik lastik gibi bükülebilir. Organik kısım eksik olursa kemik kırılabilir olur.

2.1.5 Kemik Dolaşımı

A. Anatomi

Kemikler kardiyak çıkışın %5–10' unu alır. Uzun kemikler 3 kaynaktan beslenir;

- i. **Besleyici arter sistemi**, Besleyici arterler ana sistemik arterlerden dallanır. Diafizyal kortekse nutrient foramenden girerler ve sonra medüller kanala girerek inen ve çıkan küçük arterlere dallanırlar. Bu damarlar endosteal kortekste arteriollere dallanırlar ve haversian sistemi içindeki damarlar aracılığıyla matür diafizyal korteksin iç yüzünün en az üçte ikisini beslerler.
- ii. **Metafizyal- epifizyal sistem**, Periartiküler vasküler pleksustan kaynaklanırlar.
- iii. **Periosteal sistem**, Primer olarak matür diafizyal korteksin en çok dış üçte birini besleyen kapillerlerden oluşur. Daha düşük basınçlıdır.

B. Fizyoloji

i. Akımın yönü; Matür kemikteki arteryel akım yüksek basınçlı besleyici arteryel sistemin ve düşük basınçlı periosteal sistemin net etkisinin bir sonucu olarak içten dışa doğrudur (sentrifugal). Endosteal sistemin bozulduğu tamamen deplase bir kırığındaki basınç gradienti tersine döner. Periosteal sistem basıncı baskın hale gelir ve kan akımı dıştan içe doğru (sentripedal) hal alır. Gelişmekte olan immatür kemikte arteryel akım sentripedaldir. Çünkü periost yüksek oranda vaskülarizedir ve kemik kan akımının baskın bileşenidir. Matür kemikte venöz akım sentripedaldir. Kortikal kapillerler daha sonra boşaltıcı venöz sisteme drene olan venöz sinuzoidlere drene olurlar.

ii. Kemığın sıvı bileşenleri;

Ekstravasküler	%65
Haversiyan	%6
Laküner	%6
Kırmızı kan hücreleri	%3
Diğer	%20,

iii. Kemik kan akımındaki fizyolojik durumların etkileri;

Hipoksi	Akımı artırır
Hiperkapni	Akımı artırır

C. Kırık iyileşmesi sırasında kan akımındaki değişimler; Kemik kan akımı kırık iyileşmesinin ana belirleyicisidir. Kemik kan akımı ana besinleri kemik yaralanması olan yere getirir. Kırık bölgesinde oluşan damar yaralanmasına bağlı olarak gelişen ilk tepki kemik kan akımındaki bir azalmadır. Saatler ya da günler içinde kemik kan akımı artar. İki haftada zirve yapar ve 3–5 ayda normale döner.

D. Düzenleme; Kemik kan akımı metabolik, humoral ve otonomik olayların etkisi altındadır. Kemiğin arteriyel sisteminin oldukça önemli bir vazokonstrüksiyon ve daha az bir vazodilatasyon potansiyeli vardır. Kemik içindeki damarlar pek çok vazoaaktif reseptör içerir. Bu reseptörler gelecekte kemik kanlanmasındaki bozukluklara bağlı gelişen kemik hastalıklarının farmakolojik tedavisinde faydalı olabilir.

2.1.6. Kemikleşme

Kemik yapımına osteogenez, ossifikasyon, kemikleşme gibi adlar verilir. Kemikleşme paratiroid hormonu ve D3 vitamininin kontrolü altında osteoblastlar ve osteoklastlar aracılığıyla kemiğin büyüme ve yeniden şekillenmesi olaylarını içerir. Yaşamın erken yaşlarında kemik yapımı yıkımdan fazla, ileri yaşlarda ise kemik yıkımı yapımından daha fazladır. Yaşlılıkta ve menopoza sonrasında osteoporoz şekillenir, kemik yoğunluğu azalır, kemikler kırılabilir. D3 vitamini yetersizliğinde ise kemik matriksinin mineralizasyonundaki yetersizlik raşitizm ve osteomalazi hastalıklarıyla sonuçlanır. Kemikleşme iki çeşittir ve her ikisinde de gelişen kemik primer kemiktir, daha sonra bunun yerini sekonder kemik alır.

A. İntramembranöz kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme kırıkta bir model olmadan mezenkimal dokunun direkt kemikleşmesidir. Canlıda kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın processus coronoideus ve simfisis dışındaki bölgelerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Önce mezenkim hücreleri hızla bölünerek osteoprogenitor hücrelere, bunlar da hızla bölünerek osteoblastlara dönüşürler. Bir kısım osteoblast, sentezlenip kalsiyum yoğunluğu artmış olan matriks içinde kalarak

osteosite dönüşür. Böylece mezenkim dokusu içinde kemiksi (osteoid) odaklar şekillenir. Bu odaklar arasındaki mezenkim dokusunda bulunan kan damarlarından çıkıp osteoid dokuya geçen Ca ve P iyonları, osteoblastların salgıladığı alkali fosfataz 'ın aracılığı ile $CaPO_4$ molekülleri oluştururlar. Böylece osteoid kireçleşerek primer kemik dokusunu oluşturur. Spikül (iğnecik) adı da verilen Mezenkim dokusu içinde oluşan bu primer kemik merkezleri birbirleriyle birleşerek süngerimsi kemiği meydana getirir. Daha sonra devreye giren osteoklastlar kemikleri iç yüzlerinden yerler, osteoblastlar ise dış yüze yeni kemik lamelleri eklerler. Şekillenen kemik böylece genişleyip-kalınlaşmaya başlar. Süngerimsi kemik son şeklini aldığı anda primer kemik dokusu içeren trabeküller ortadan kalkmış geriye sadece sekonder kemik yapısındaki trabekülleri kalmıştır. Bunun peşinden bu kemiklerin iç ve dış yüzlerine bir miktar kompakt kemik eklenir ve kemikleşme tamamlanmış olur. Kemik trabekülleri arasındaki mezenkim dokusu ise kemik iliğine dönüşür.

Bağ dokusunun kemikleşmeye katılmayan bölümleri periost ve endosteumu oluştururlar. Distraksiyon osteogenezisinde de kemikleşme aynı mekanizma ile herhangi bir kırıkta model olmaksızın kollajenin kalsifiye matrikse dönüşümü ile gerçekleşir.

B. Enkondral kemik oluşumu

Embriyolojik yaşamdan büyüme tamamlanıncaya kadar iskeletin kırıktaktan oluşmuş kısımlarının kemik yapıya dönüşmesi olayıdır. İntrakartilaginöz kemikleşme de denir. Ekstremiteler kemikleri ve vertebralar bu şekilde gelişir. Bu kemikler oluşmadan önce hyalin bir kırıkta model oluşur.(8) Doğum sonrası stabil olmayan kemik kaynaması da aynı yolla olur. Osteoprogenitör hücreler kırıkta matriks salgılar ve kondrositlere dönüşürler. Hyalin veya hyalin benzeri çoğunlukla tip II kırıkta oluşumu görülür. Bunu kırıktağın mineralizasyonu ve vaskülarizasyonu takip eder. Vaskülaritenin artışıyla hücreler kırıktağın rezorbsiyonuna başlar. Rezorbe olan kırıktağın ortasında medüller boşluk oluşur. Hematopoetik kemik iliği bu alanda gelişir. Osteoprogenitör hücreler kırıktağın septumun üstünü kemik matriksi ile kaplayacak olan osteoblastlara dönüşür. Sonraki aşamada ise immatür kemik ve kalsifiye kırıkta karışımı osteoklastlarca rezorbe edilerek yerine osteoblastlarca matür kemik dokusu oluşturulur. Enkondral kemik oluşum örnekleri; embriyonik uzun kemik oluşumu, uzun kemiklerin boyuna büyümesi, demineralize kemik kullanılarak oluşan kemik.

Kırıkta modelin diafiz bölgesinde perikondrium iç katında bulunan mezenkim hücreleri bölünerek osteoprogenitor hücrelere, onlarda osteoblastlara dönüşür. Osteoblastlar da

kemik lamelleri sentezlerler ve bunların üzerindeki kovuklara yerleşerek osteositlere dönüşürler.

Bundan sonra kemik manşeti saran bağ dokusu da artık perikondrium değil periosteum olarak adlanır. Kıkırdağın beslenmesi perikondriumdan difüzyon ile olduğundan, kıkırdak diafiz'inde kemik manşet şekillenince difüzyon engellenir, kıkırdak beslenemez. Bu durum, kondrositlerde önce hipertrofiye, ardından diyafizin orta kısmından başlayarak tahrip olup, ölmelerine neden olur. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur (kemik iliği) Bu deliklerden kıkırdak içine doğru damarlar gelişir, damarlardan çıkan Ca ve P iyonları kondrositlerden kıkırdak matriksine geçen alkali fosfatazın aracılığıyla birleşerek kıkırdak matriksine oturur ve onu kireçlendirir. Böylece kireçleşmiş kıkırdak merkezleri meydana gelir. (7)

Kan damarlarıyla birlikte yeni mezenkim hücreleri de ortama gelir, mezenkim hücrelerinden farklılaşan osteoblastlar kireçleşmiş kıkırdak dokusu üzerine dizilerek primer kemik dokusunu oluştururlar. Böylece ortaları kireçleşmiş kıkırdak, yüzeyleri kemikten oluşmuş primer kemikleşme merkezleri meydana gelir. Bu olaylardan sonra bu primer kemikleşme merkezleri sekonder kemik doku haline dönüşür. Kemiğin ortasında oluşan kovuktaki mezenkim dokusu ise hematopoetik dokuya dönüşür. Sonuçta hyalin kıkırdak model eklem kıkırdağı ve epifizyal plak hariç iki yer hariç tamamen kemiğe dönüşür.

Epifiz plağı kemiğin daha sonraki uzamasından sorumludur. Bu şekilde kıkırdağın uzaması yirmili yaşlara kadar devam eder, daha sonra epifiz diski de kemikleşir ve büyüme durur. Kemiklerin epifizlerdeki kemikleşme eklem yüzlerine kadar devam etmez, eklem kıkırdağı yaşam boyu kalır. Gelişme yıllarında bu kıkırdak epifizlerin büyümesini sağlar. Gelişmenin durmasından sonra ise eklem kıkırdağı olarak kalır. Kısa kemiklerde epifiz plağı bulunmaz, bunların boyuna büyümelerini eklem kıkırdakları sağlar.

2.1.7. Kemik yaralanması ve tamiri

Kemiğin anatomik bütünlüğünde bozulma olmasına kırık denir. Kırık oluşuktan sonra çeşitli fizyolojik olaylar ile kemik bütünlüğü yeniden sağlanmaya çalışılır. İstisnai olarak kemik dokusu skar bırakmadan iyileşen tek dokudur. Kırık iyileşmesi iki şekilde olur.

A. Primer kırık iyileşmesi

Kırık uçlarının tam fiksasyonu sonrası görülen iyileşme türüdür. Dış kallus oluşumu

görülmez. Bu nedenle direkt kemik oluşumu görülür. Kırık hattında canlı osteojenik hücrelerden osteoklast ve osteoblast farklılaşır. Osteoklastlar havers kanallarını genişletirler ve genişleyen bu kanallara osteoblastlar da yerleşir. Konsantrik lameller kemik oluşur. Periost reaksiyonu görülmez.

B. Sekonder kemik iyileşmesi

Kırık iyileşmesi kallus gelişimi ile olur. Embriyolojik kemik oluşumuna benzediği için encondral kemikleşme de denir. Bu iyileşme sürecindeki fazları birbirinden kesin sınırlarla ayırmak güçtür, bir önceki veya bir sonraki fazla iç içedir. Bu evreler şunlardır:

- İnflamatuar dönem
- Onarım dönemi
- Yeniden şekillenme (Remodeling) dönemi

İnflamatuar dönem

Akut inflamasyon hücrelerinin çokluğundan dolayı bu isim verilmiştir. Sırasıyla vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, pıhtı oluşumu, fagositoz, anjiogenez ve granülasyon dokusunun oluşumu görülür. Kırık oluştuktan sonra periost ve endost yırtılmış, bölgeyi çaprazlayan kan ve lenf damarları hasarlanmış, hematoma oluşmuştur. İçi hipoksik ve asidik olan bu hematoma çevre yumuşak dokularca sarılır. Trombositlerce kanama durdurulur ve nekrotik pıhtı oluşturmak üzere fibrin depo edilir. Nekroz oluşmaya başladıkça ortama kalsiyum salınır. Kırık uçları rezorbe olmaya başlar. İlk birkaç saat içinde oluşan fibrin ağı üzerinde osteojenik hücre proliferasyonu başlar.

Onarım dönemi

Onarım dönemi inflammatuar evrede oluşan hematoma organize olmasıyla başlar ve organize hematoma kallusa dönüşümü ile devam eder. Kırık hematoma içindeki öncü hücreler lokal uyarıların etkisiyle fibroblast ve diğer hücrelere farklılaşırlar. Farklılaşma sonrası oluşan osteoblast ve kondroblast gibi hücrelerin aktiviteleri lokal ve sistemik mediatörlerce kontrol edilir. Osteoprogenitör hücreler vasıtasıyla hematoma artık oluşmuş ve daha istikrarlı olan granülasyon dokusuna dönüşmüştür.

Periostun derin tabakalarında hızla gelişen osteoprogenitör hücreler büyüdükçe periostun kemikten ayrılmasına neden olur. Osteojenik hücreler hızla çoğalırken kapiller tomurcuklanma başlar. Kapiller tomurcuklanmaya öncülük eden periostal damarlardır. Osteojenik çoğalma kapasitesi damarlanma hızından daha fazla olduğu için periosta uzak

kısımlardaki hücreler iskemik kalır ve ölür. İskemik bölgede hücre farklılaşması kondrosit yönünde olduğu için kallusun çevresi kırıkta matriks ile sarılır. Periosta yakın kısımlarda ise osteoblastlar osteoid sentezlerler. Kallus oluştuktan sonra mineralize olmaya başlar. Osteoblastlarca içinde lipid, yoğunlaşmış kalsiyum fosfat ve enzimler bulunan matriks vezikülleri salınır.

Kalsifikasyonu inhibe eden profosfatlar, profosfataz ile parçalanır ve mineralizasyon başlamış olur. Kalsiyumun çökmesi için gerekli fosfat alkalenfosfataz aracılığıyla sağlanır.

Daha sonra bu veziküller parçalanır ve vezikül içindeki kalsiyum konsantrasyonunun artışıyla kristalizasyon oluşur.

Kallusun kalsifiye olması sonrası matriks içinde kalan osteoblastlar osteosite dönüşür trabeküler yapı oluşur. Bu dönüşüm arttıkça trabeküller genişler. Bu iyileşme şekli intramembranöz kemikleşme gibidir.

Kırıkta doku içinde alkalenfosfataz salgılanmasıyla matriks kalsifiye olur. Kondrositler diffüzyonla beslendikleri için bu kalsifiye ortamda ölürler ve kondroblastlarca sindirilerek lakünaları oluştururlar. Bu lakünelara kılcal damarlar ve kemik hücreleri girer. Kalsifikasyon olmadan yeni damar oluşumu olmaz. Osteoblastlar bu boşluklarda osteoid sentezlemeye başlarlar.

Yeniden Şekillenme

Kırık uçları kallus ile sıkıca sabit hale getirildikten sonra, bu tamir dokusunun fazlalık kısımları resorbe edilir. Bu iyileşmenin en uzun dönemidir. Kemik uçları arasındaki stres aktarım yolundaki trabeküler kemik yerini kompakt kemiğe bırakır. Bu değişim önce aktivasyon, sonra rezorbsiyon ve daha sonra formasyon şeklinde sıralanabilir.

Osteoblastlar parathormon tarafından uyarılınca kemiğin belirli bölgesinden çekilirler ve bu boşluklara osteoklastlar yapışırlar. Rezorbsiyon yaptıktan sonra yerlerini tekrar osteoblastlara bırakırlar. Kemiğin eski şeklini almasında Wolf kanunu olarak bilinen histolojik değişimlerin rolü vardır. Wolf kanuna göre kemiğin işlevsel durumundaki değişiklik, dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks tarafı pozitif, konkav tarafı ise negatif yüklenir. Bu olaya piezoelektriksel yüklenme denir. Pozitif yük osteoklastları uyarak kemik resorbsiyonunu, negatif yük osteoblastları uyarak kemik yapımını artırır.

2.1.8. Kırık Kaynamasına Etkili Faktörler

Kırık iyileşmesi fazları çeşitli mediatörler aracılığı ile kontrol edilir. Bu mediatörlerin miktarını ve aktivitesini değiştiren lokal ve genel faktörler vardır.

A. Lokal Faktörler

Travmanın şiddetine bağlı olarak kemik ve yumuşak doku hasarının derecesi değişir. Hasarın büyüklüğünden dolayı oluşan nekrotik doku iyileşme için gerekli mezenkimal hücre göçü ve vasküler invazyon için bir engel oluşturur. Açık kırıklarda hematoma dışarı boşalması sonucu kaynama olumsuz etkilenir

Kırık uçları birbirinden ne kadar uzaksa kaynama da o kadar geç olur. Çünkü kırık uçları arasındaki kallusun kanlanması periosttan kaynaklanan yeni damarların gelişmesiyle mümkündür. Kırık kemik uçları arasına yumuşak doku girmesi de kaynamayı geciktiren bir faktördür.

Aşırı cerrahi diseksiyon ile kanlanması bozulan ve kanlanması sınırlı olan kemiklerin (skafoïd, tibia distali gibi) kaynaması daha geç olur. Spongioz kemik yüzey alanı fazla, hücresel bakımdan zengin ve kanlanması iyi olduğu için daha kolay iyileşir. Segmenter kırıklarda intramedüller kanlanma da etkilendiği için kaynama daha geç olur. Eklem içi kırıklarda çoğunlukla açık redüksiyon gerektiği için lokal kanlanma bozulur. Eklem sıvısının enzimatik içeriği de bu tür kırıklarda kaynamayı olumsuz etkileyeceğinde eklemi içine alan kırık da geç iyileşir. Spiral ve oblik kırıklarda kaynama yüzey alanı geniş olduğundan kaynama daha hızlıdır. Kırık hattında enfeksiyon olması iyileşme hücrelerinin beslenmesini engeller. Ortamda oluşan nedbe ve fibröz doku iyileşmeyi geciktirir.

Yerel patolojik koşullar

Kemiğin zayıflamasına bağlı olarak küçük bir travma ile kemik kırılabilir. Bu tip patolojik kırıkların sebebi dejeneratif ve metabolik hastalıklar, enfeksiyon, radyoterapi veya tümörün kendisi olabilir. Bu gibi patolojik kırıkların tedavisinde öncelikle altta yatan nedeni ortadan kaldırmak gerekir. Osteoporozun kırık kaynamasına olumsuz etkisi yoktur. Fakat temas yüzeyi azlığı nedeniyle oluşan fiksasyon yetersizliğinden ötürü kaynama geç olur.

B. Genel Faktörler

Genel durum

Hormonal bozukluklar, raşitizm, anemi, diabetes mellitus, vitamin eksiklikleri, sigara kullanımı ve tüberküloz gibi enfeksiyonlar kırık iyileşmesini olumsuz etkiler. Yeni doku yapımı için protein ve enerji gerektiğinden beslenme de iyileşmede önemli bir etkidir.

Yaş

Kemik iyileşmesinde yaş önemlidir. İnfantil çağ, adölesan çağa, adölesan çağ erişkin çağa göre avanatlıdır. Bunun asıl sebebi yeni damar oluşum hızıdır.

Vitaminler

A vitamini, mezenkimal farklılaşmasını uyararak, C vitamini kollajen sentezine katkı yaparak, D vitamini ise Kalsiyum ve Fosfat miktarını artırarak kırık iyileşmesine yardım eder. Hipervitaminöz A ve hipervitaminöz D durumlarında ise kemik iyileşmesi olumsuz etkilenir.

İlaçlar

Antikoagülan ajanlar, Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ve kemoterapötikler kırık iyileşmesini geciktirirler.

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar ossifikasyonu; prostoglandin inhibisyonu sonucunda lokal kan akımını azaltarak veya primitif osteoblastların fonksiyonunu engelleyerek geciktirirler. Yüksek dozlarda indometazin kırık iyileşmesini durdurduğu bilinmektedir.

Hormonlar

PTH vücutta kalsiyum dengesini sağlayan ve kan kalsiyum değerlerini temel hormondur. Dönemsel salınımı kemik yapımını uyarırken devamlı salınımı kemik yıkımını başlatır.

Tiroid bezinde parafoliküler-C hücrelerinde sentez edilen Kalsitonin en önemli etkisi plazma Ca⁺ konsantrasyonunu düşürmektir. PTH'a zıt çalışarak kemik yapımını artırır.

Büyüme hormonu, büyüme ve gelişmeyi genel olarak uyaran hormondur ve kallusun hacimce artmasını sağlayarak kemik yapımına katkıda bulunur. Steroidler ise kallus

oluşumunu yavaşlatarak ve PTH'a verilen cevabın artmasına aracılık ederek kemik yıkımını artırır.

Tiroid hormonları kemik yapımını ve yıkımı artırır ancak tiroid hormon fazlalığı durumlarında kemik döngü artacağından kemik kaybı gelişir.

Büyüme Faktörleri

Kemik iyileşmesi sırasında trombosit, makrofaj ve fibroblastlardan salınan bazı proteinler ve büyüme faktörleri hücre göçü, çoğalması, farklılaşması ve emilim gibi olayları kontrol eder. Bunlardan bazıları TGF- β (transforming growth factor β), BMP-1(bone morphogenetic protein), BMP-2, FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF (insülin-like growth factor) PDGF (platelet derived growth factor)' dir.

Diğer etkenler

Fiksasyon sonrası kemiğin hareketi, bölgenin denervasyonu kemik iyileşmeyi olumsuz etkiler. Kırık bölgesindeki sinir harabiyetinin kaynamayı olumsuz etkilediği gösterilmiştir.

Bölgesel elektrik uygulaması, düşük doz lazer, şiddeti düşük ses dalgalarının uygulanmasının kemik iyileşmesini olumlu etkilediğine dair yayınlar vardır. Hiperbarik oksijen uygulaması ve kırığa hafif yük bindirilmesi de süreci hızlandırabilir.

Kemik iyileşmesi değerlendirmesinde kullanılan yöntemler

Runt transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan Runx2 (CBFA-1), ve kemik, kırıkta formasyonunda aktivatör olarak görev alır.(9) Embriyonal dönemde iskelet sisteminin gelişiminde olduğu kadar, osteoblast farklılaşmasının devamında da gerekli olduğu ortaya konulmuştur.(10) Runx2, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde osteoblast matürasyonunun erken evrelerinde osteoblast farklılaşmasını uyarırken geç evrelerde inhibe eder. Runx-2 ekspresyonu blastik aktivite hakkında bilgi vericidir ve bu Anti-runx-2 antikoru ile ölçülebilir.

Sp7 (Osterix) osteoblast farklılaşması için gerekli transkripsiyonel aktivatördür ve Sp1 transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir.(11, 12) Sp-7 ekspresyonu blastik aktivite hakkında bilgi vericidir ve bu Anti-Sp7 antikoru ile ölçülebilir.(13) Osteonektin kemik

matriksindeki non-kollojen yapılardan olup kollojen ve mineral komponentler arasında köprüler kurulmasına yardımcıdır.

2.1.9 Kemik Greft İyileşmesi

İnkorporasyon

Greftin alıcı dokuya tutunmasına inkorporsayon denir. İnkorporsayonun iyi olması için dokunun iyi beslenmesi ve greftin hareketsiz olması gereklidir.(14)

Osseokondüksiyon

Greft damar ve yapıcı hücrelerin ilerleyebildiği bir iskele görevi görür. Eski kemik bir yandan rezorbe olurken yeni kemik yapımı gerçekleşir.(15, 16)

Osteoindüksiyon

Lokal dokudaki mezenşimal hücrelerden osteosit oluşumudur. Bu işlemin kontrolünü kemik morfojenik proteinlerce kontrol edilir.(15, 16)

Osteogenesis

Kemik greft içinde canlılığını koruyan hücrelerin yeni kemik yapması olayıdır. Pediküllü kemik fleplerinde yeni kemik en çok bu yolla olur. Non-vaskülarize kemik greftlerinde de kemikleşmenin az bir kısmı bu yolla gerçekleşir.(15)

2.2 Trombositler Ve Büyüme Faktörlerince Zengin Plazma

2.2.1 Trombositlerin İçerikleri Ve Fonksiyonları

Trombositler boyut olarak küçük fakat yaşamsal öneme sahip hücrelerdir.(17) Çekirdek içermeyen bu hücreler megakaryositlerden köken alırlar ve dalakta depolanırlar. Aktif olmadıkları durumda tipik diskoid şekillerini korusalar da aktive olunca irregüler psödopodlar içeren daha büyük bir forma kavuşurlar. Trombositlerin içinde kenarlarda yerleşimli açık mavi boyanan “hyalomer” ve merkezde ve mor boyanan “granülomer” yapıları vardır. Hyalomerler hücre hareketinden ve hücre şeklinin korunmasında sorumlu iken granülomerler golgi cisimciği, mitokondri ve lizozom içerirler.

Trombosit içinde bulunan granüller içerik ve yoğunluklarına göre alfa, delta(dense, yoğun) ve lambda (lizozom) olarak 3 çeşittir.(18-20)

B) Alfa Granüller

Major grup olan Alfa granüllerde hemostaz, inflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein ve büyüme faktörünü içerir, depolar ve salar.(21) Çapı 200-400 nm'dir. Bu içerikler Tablo-1'de gösterilmiştir.

Alfa Granüller	Delta Granüller	Lambda Granüller
Thrombospondin	Ca	Karboksipeptidaz
P-selectin	Mg	Kollajenaz
Platelet faktör-4	P	Asit fosfataz
Beta tromboglobulinler	ATP	Arabinozidaz
Fibrinojen	GTP	Glukoz-6-fosfotaz
Protein S	ADP	N-Asetil galaktozominidaz
Plazminojen	GDP	Asit hidrolaz
Faktör V, VII, XI, XIII	Membran proteinleri	Heparinaz
VWF	CD 63	Katepsin
Fibronektin	LAMP-2	ATP
Vitronektin	Serotonin	TGF
Kemokinler	GPIb, GPIIb/IIIa	CD 63
PDGF	P-Selektin	LAMP-1
TGF-Beta	Histamin	LAMP-2
VEGF	Epinefrin	
FGF		
EGF		
BMP-2		
Kondroitin 4 sülfat		

Tablo 1: Trombosit granüllerinin içerikleri

A) Delta Granüller

Daha küçük (250–300 nm) yapıdaki yoğun granüllerde kalsiyum, pirofosfat, ADP, ATP gibi molekülleri içerir ve serotonin deposu olarak görev yapar granüllerdir. Delta granüllerde bulunanlar trombosit agregasyonu, hücre göçü ve proliferasyonu, vasküler tonus ile ilgilidir.(22)

C) Lizozomal Granüller

En küçük çapa (175–250 nm) sahip trombosit granülleridir. İçinde asit hidrolazlar gibi lizozomal enzimleri, bakterisidal etkili olan glikozidaz, proteaz gibi proteinleri

barındırırlar. Bu granülden ayrıca, asit hidrolazlar, Katepsin-D,E, elastaz ve diğer indirgeyici enzimleri salgılar.(23)

Trombositten Salınan Büyüme Faktörleri

Trombositlerden salınan büyüme faktörleri genelde iki aktif tarafı vardır ve bu yüzden “dimer” olarak adlandırılırlar. Sadece üzerinde reseptör olan hücelere eklenirler. Bu reseptörler hedef hücrenin membranındadırlar. Büyüme faktörlerinin yeni kan damarı yapımını artırdığı, yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir. Büyüme faktörleri mutajenik değildir.

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF):

PDGF_{aa}, PDGF_{bb} VE PDGF_{ab} olarak üzere üç izomeri vardır ve bunlar benzer etkilere sahiptir. PDGF yara iyileşmesinin evrensel faktörlerindendir. Asıl kaynağı trombosit olsa da makrofajlar, endotel hüceleri, fibroblastlar ve keratinositler tarafından da sentezlenirler. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü fibroblastlar, düz kas hüceleri ve endotel hüceleri üzerinde kemoatraktan ve mitojenik etki gösterir, fibronektin ve hiyalüronik asit sentezini artırır. (24)PDGF'nin bu hüceler üzerindeki β reseptör aktivasyonu fibroblast proliferasyonu, kollajen birikimi ve anjiogeneze aracılık eder. Yara iyileşmesinin erken döneminde IGF gibi diğer faktörlerin sentez ve salınımını da indükler. Rekombinan yolla elde edilen PDGF'nin, cerrahi yaralarda, bası yaralarında ve diabetik yaralarda kullanımı vardır.

Transforme Edici Büyüme Faktörleri (TGF- β 1, TGF- β 2)

TGF- β 1, TGF- β 2 47 bilinen üyesi olan bu süper ailenin sadece iki üyesidir. TGF- β 1 ve TGF- β 2 PDGF gibi hücre çoğalmasını ve matriks üretimini uyardığı gibi kıkırdak ve kemik farklılaşmayı da uyarır.(24-26) Yani grubun diğer üyesi olan Bone Morphogenic Protein (BMP) gibi morfojenlerdir.

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF):

Bilinen en kuvvetli anjiogenezis uyarıcısı olan VEGF doğrudan mitotik etkisinin yanında bir taraftan kısmen nitrik oksit sentezini uyararak vazodilatasyona neden olurken, diğer taraftan hücre göçünü ve apoptozu inhibe eder.(24, 27, 28) Yara iyileşmesinde görevli fibroblast, inflamasyon hüceleri ve endotelial hücelerin proliferasyon ve göçünün uyarır ve vasküler geçirgenliği artırır. VEGF'nin tendon iyileşmesini ve endotel

oluşumunu hızlandırdığını belirten çalışmalar vardır. VEGF kırık bölgesinde yeni damar oluşumu arttırarak kemik iyileşmesine yardımcı olur.

Epidermal büyüme faktörü (EGF):

Epidermal büyüme faktörü, yara iyileşmesinin başlangıcında fibronektin gibi proteinlerin üretimini ve epitel hücre göçünü uyarır.(24, 29) Etkisi müköz membranın ve derinin bazal hücreleri ile sınırlıdır. Hücre göçünü ve çoğalmayı uyarır.(29-31)

İnsülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I):

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I, fibroblast, keratinosit, osteoblast, kondrosit, mezangial eritroid progenitör hücreler gibi pek çok hücre tipinin çoğalmasını artırır.(32) Dolayısıyla bulunan IGF-I' in kaynağı büyük ölçüde karaciğer dokusudur. Dolaşımdaki IGF-1'in protein sentezini, periferik glukoz alımını, glikojen sentezini, miyelin sentezini, kemik oluşumunu arttıran anabolik etkileri arttırdığı, kaslardaki protein yıkımı gibi katabolik etkileri azalttığı bilinmektedir. Tendon ve kıkırdak iyileşmesini arttırdığına dair yapılmış birçok çalışma mevcuttur(32, 33).

2.2.2 Trombositten Zengin Plazma

Trombositlerin hemostaz sürecindeki etkin fonksiyonlarının anlaşılmasından çok sonra, yara iyileşmesi üzerindeki etkileri olduğu tespit edilmiştir.(34)Dolaşımdaki trombositler, aktive olmaları durumunda granülleri içinde bulunan çok sayıda büyüme faktörünü ortama salmaktadırlar.(35, 36) Yüksek yoğunlukta trombositin trombin ve kalsiyum ile aktive edilmesi, mitojenik faktörler yönünden zengin bir plazma elde edilebilmesini sağlar. İşte buna “trombositten zengin plazma” denir. Trombosit jel adı da verilen bu plazmanın hazırlanması için venöz kandan bir miktar kan alınır ve 2 kez santrifüj edilir. (35)Piyasada ticari olarak özel üretilmiş Smart PReP (Harvest Technologies, Norwell MA), Plasma Seal (Plasma Seal, San Francisco, CA), Platelet Concentrator (Implant Innovations, Inc. 3i, West Palm Beach, FL), CATS Continuous Autotransfusion System (Fresenius Homecare, Hamburg, Germany) ve Magellan Autologous Platelet Separator (Arteriocyte medical Systems, Hopkinton.MA) gibi santrifüj cihazları da bulunmaktadır.

Trombositten zengin plazma insanda otolog ve steril hazırlanması gereken bir üründür ancak rat gibi küçük canlılarda immünolojik potansiyeli ihmal edilebilen canlılarda allojenik olarak da hazırlanabilir.

Trombositleri korumak amacıyla kalın (19 gauge) bir iğneyle venöz olarak alınan 40–600 cc'lik kan antikoagülan solüsyon (ACD-A) içerisine alınır ve çift santrifüj işleminden sonra trombosit konsantrisi eldesi sağlanmış olur.(35, 36) Bu aşamada elde edilen trombosit konsantrisindeki trombosit sayısının, değişken olmakla birlikte eşzamanlı kan trombosit değerinden 4–7 kat fazla olduğu bildirilmiştir (35, 36). Elde edilen trombositten zengin plazmayı aktive etmek için ortama $CaCl_2$ ve trombin ilavesi yapmak gerekir. Bu aşamada sığır kaynaklı (bovine) trombin kullanılabilir.(35, 37) Trombositten zengin plazmanın aktifleştirilmesinden sonra bölgede pıhtı formasyonu ile başlayacak olan trombosit aktivasyonunu tetiklenir. Oluşan pıhtı içerisindeki aktive trombositler, alfa granülleri içerisinde bulunan büyüme faktörlerini ortama salgırlar, bu da uygulama sahası içerisinde büyüme faktörlerinden zengin bir mikro çevrenin oluşmasını sağlayarak iyileşmeyi hızlandırır.(36)

Klinik olarak ciddi birer problem olan kronik yaralarda, büyüme faktörlerin miktarlarının azaldığı gösterilmesi araştırmacıları bu faktörlerin ortama katıldığı çalışmalar yapmaya itmiştir. Basınç ülserleri, venöz ülserler, diyabetik yaralarda TZP'nin faydalı olduğu birçok kez bildirilmiştir.(36, 37)

Yara iyileşmesini arttıran proteinlerin yanında bakterisidal içeriklerinin bulunması, enfeksiyonların kontrol altına alınmasına yardımcı olması ve hastanede yatış sürelerinin kısalmasını sağlaması, semptomlarda azalmaya neden olması TZP'nin bulunan avantajlarından.(36, 38) Krupski ve arkadaşları yaptıkları kontrollü çalışmada yukarıdaki araştırmacıların tam tersi sonuçlar elde etmişlerdir.(39) Tek başına kemik grefti uygulaması ile kemik grefti + TZP uygulamasını karşılaştırdığında, kemik biçimlenmesinin hız ve derecesinde artış saptamış ve bunun PDGF ve TGF- β sayesinde olduğunu savunmuşlardır.(38) Anitua da diş çekimi sonrası oluşan boşluğa TZP uygulamış ve hem epitelizeasyonunda hem de kemik yoğunluğunda artış olduğunu göstermiştir.

TZP periodontal cerrahiden, plastik cerrahiye, beyin ve sinir cerrahisinden ortopediye kadar birçok branşta klinikte kullanılan ve üzerinde değişik sonuçlar bildirilen bir üründür.(34)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deneysel Etik Kurul Başkanlığı'nın 25.07.2011 tarih ve 2011-080 sayılı izni ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi (28.02.2012 tarihi itibarıyla Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Necmettin Erbakan Üniversitesi'ne bağlanmış ve adı değişmiştir.) Çalışmada, ağırlıkları 200–250 gram arasında değişen, 55 adet 4–5 aylık Wistar-Albino tipi dişi sıçan kullanıldı. On altı deneğe yapılan uygulamalara ait veriler kullanılmadı, 2 denek ise anestezi etkisiyle öldü. Hayvanlar çalışma sonrasında standart laboratuvar şartlarında, 5'erli gruplar halinde kafeslerde, 20–22 C sıcaklıkta, 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda ve uzman veteriner kontrolünde izlendi. Hayvanların yem ve su ihtiyaçları düzenli olarak karşılandı. Deneklerin kuyruklarına numaraları yazılarak ve bunlar haftada iki kez yenilenecek birbirine karışmaması sağlandı.

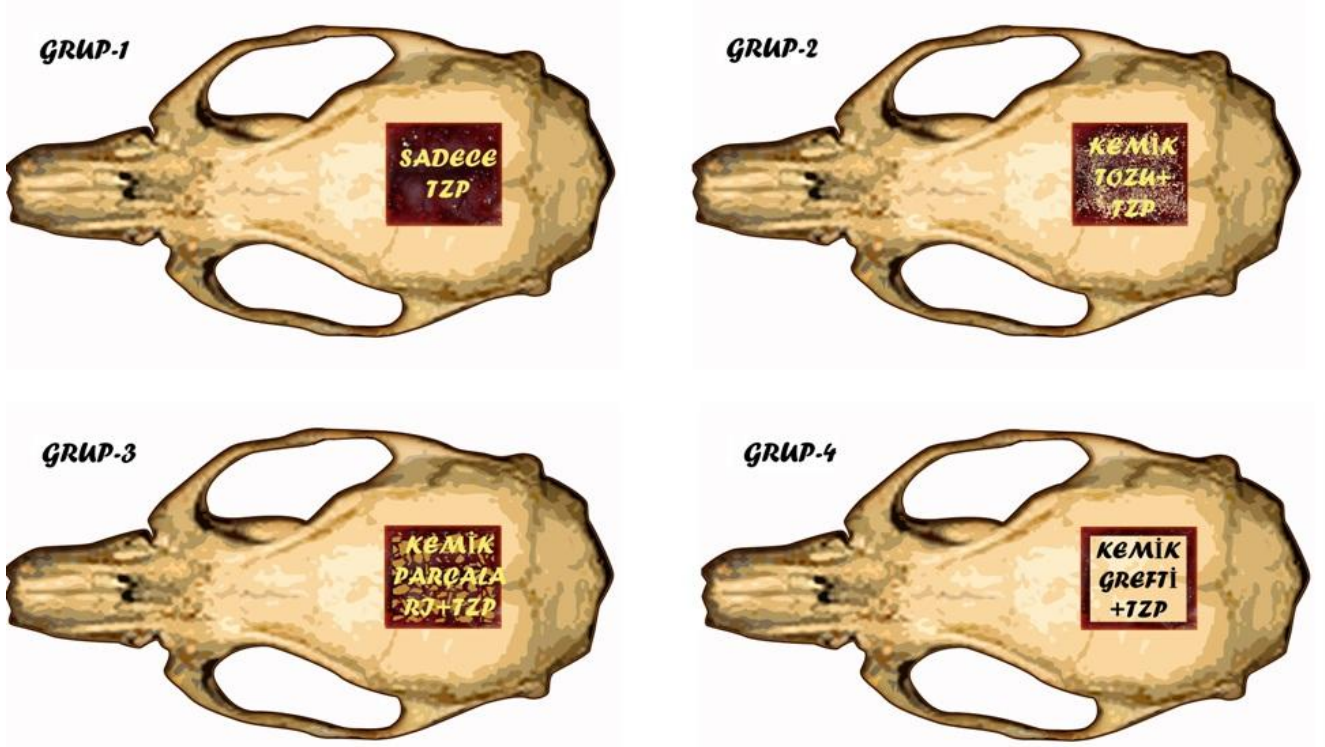
Deneysel hayvanlarından 5'i yalnızca trombosit zengin plazma hazırlanması aşamasında kan vericisi olarak kullanıldı ve cerrahi işlemler diğer 32 hayvan üzerinde gerçekleştirildi. Kan alınması sırasında ve cerrahi işlemler sırasında 80 mg/kg Ketamine-HCl (Ketalar®-im) ve 8 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile sağlanan anestezi altında gerçekleştirildi. Post-operatif dönemde deneklerin kesi yerlerine günlük olarak povidon iyot sürülüp pansuman yapıldı.

3.1 Çalışma Grupları

Toplam 32 adet rat 4 gruba ayrılarak çalışmaya başlandı. Otuz iki rat kafataslarında kritik boyutta (bir kenarı 8mm olan kare şekilli) 32 adet defekt oluşturuldu. Çıkan kemik greftleri grupların özelliklerine göre sonradan değerlendirildi. Çalışılan 4 grubun hepsi 8. Hafta sonunda sakrifiye edilerek histolojik değerlendirmeye alındı (Şekil-1)

Grup no	Sayı (n)	Özellik
Grup 1	8	Periost üzerine sadece TZP konulan grup
Grup 2	8	Periost üzerine kemik tozu + TZP konulan grup
Grup 3	8	Periost üzerine kemik parçaları + TZP konulan grup
Grup 4	8	Periost üzerine bütün kemik greft + TZP konulan grup

Tablo-2: Hayvan çalışmasını gruplarının gösterilmesi



Şekil-1: Çalışma gruplarının resimle gösterilmesi

Grup 1’de kemik greft alındıktan sonra oluşan defekte sadece yeni aktiveştirilmiş TZP uygulandı. Periost korunarak deri tek kat olarak 4/0 ipek ile devamlı suture edildi.

Grup 2’de kemik greft alındıktan sonra tur motoru ile toz haline getirildi. Bu kemik tozları yeni aktiveştirilmiş TZP ile karıştırıldıktan sonra bölgeye uygulandı. Cilt kapatıldı.

Grup 3’de kemik greft alındıktan sonra osteotom ve makasla ile parçalandı. Bu kemik parçaları yeni aktiveştirilmiş TZP ile karıştırıldıktan sonra bölgeye uygulandı. Cilt kapatıldı.

Grup 4’te kemik greft alındıktan sonra dışarıda serum fizyolojik ile yıkandı ve yeni aktiveştirilmiş TZP ile karıştırıldıktan sonra olduğu gibi bölgeye uygulandı. Cilt kapatıldı.

3.2 Trombositten Zengin Plazma (TZP, Platelet Rich Plasma) Hazırlanması

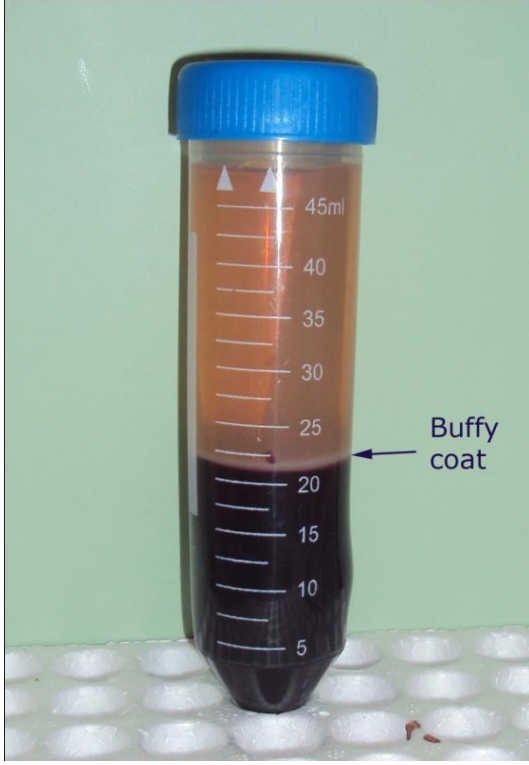
Trombositten zengin plazmanın hazırlanması için 5 hayvandan toplam 44 ml kan intrakardiyak yoldan kalın iğne ile alındı. İşlem sonrasında hayvanlara yüksek doz sodyum pentobarbital ile ötenazi uygulandı.

Elde edilen kan, pıhtılaşmasını engellemek için Antikoagülan Sitrat Dekstroz Çözeltisi Formül-A (ACD-A) ile karıştırıldı. Karışım 44 ml kan/4 ml ACD-A oranında yapıldı ve daha sonra santrifüj işlemi için uygun bir plastik tüp içerisinde toplandı. ACD-A solüsyonu kan merkezlerindeki bulunan hazır 500 ml'lik plastik torbalardan elde edildi (Şekil-2) (Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri Sanayi ve Ticaret A.Ş. Ayazağa-İSTANBUL)



Şekil-2: ACD-A solüsyonu ve bu solüsyon ile karışmış 44 cc rat kanı

Trombositten zengin plazma (TZP) elde edilmesi için çift santrifüj yöntemi kullanıldı. Her ikisinde de Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kan merkezi'nde bulunan kan santrifüj cihazı (Thermo Scientific RC12BP Low-Speed Centrifuge, Thermo Fisher Scientific MA, USA) kullanıldı. Birinci santrifüj 22⁰C sıcaklıkta, 1000 g (gravite) güçte ve 4 dakikada yapıldı (4000 g dakika). Santrifüj sonunda kırmızı kan hücrelerinin tüpün en alt kısmında toplandığı plazma ve trombosit gibi kan elemanlarından ayrıldığı görüldü (Şekil-3).



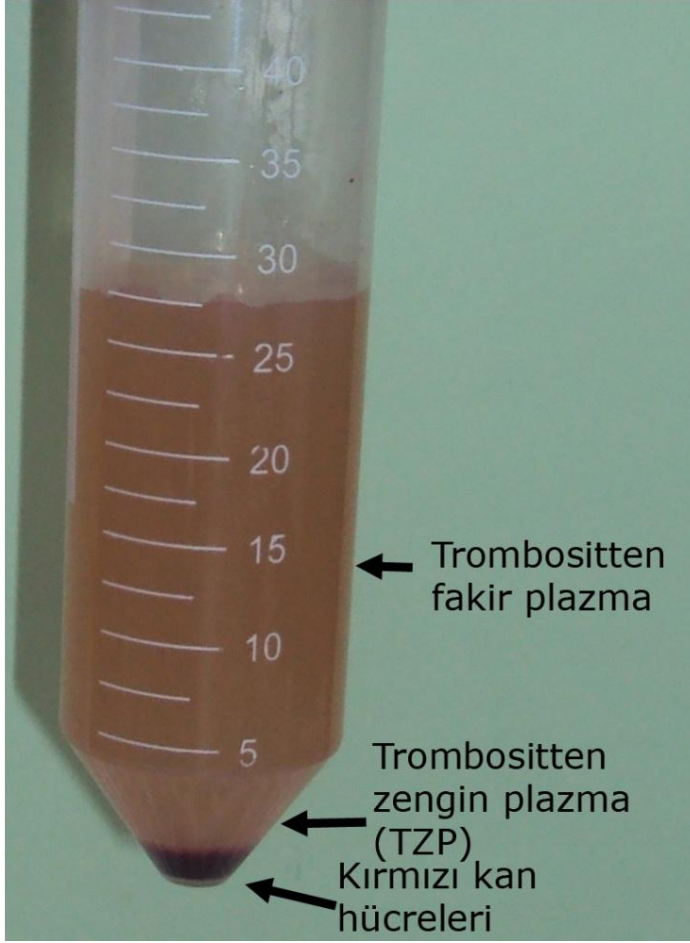
Şekil-3: 44 ml kan+4 ml ACD-A karışımının ilk santrifüjden sonraki hali

Üstte toplanan açık renkli plazma ile en alt tabakada olan eritrositlerin arasında trombosit ve beyaz küreler tarafından oluşturulan ince bir ara tabaka (buffy coat) izlendi. Üzerindeki plazmayla beraber bu ara tabaka ayrı bir tüpe alındı, dipte kalan kırmızı kan hücreleri atıldı.(Şekil-4)



Şekil-4: Kırmızı kan hücreleri atılmış ve ikinci santrifüje hazırlanmış olan Plazma ve Trombosit ve Lökosit karışımı

Plazma ve trombositleri içeren bu tüp ikinci kez 800g devirde 10 dakika boyunca aynı santrifüj cihazında çevrildi. Bu işlem sonunda az miktardaki kırmızı kan hücrelerinin dibeye çöktüğü, trombositlerin ortada yine beyaz ince bir tabaka oluşturduğu (PRP, TZP), trombositten fakir plazmanın (PPP) en üstte toplandığı görüldü (Şekil-5).

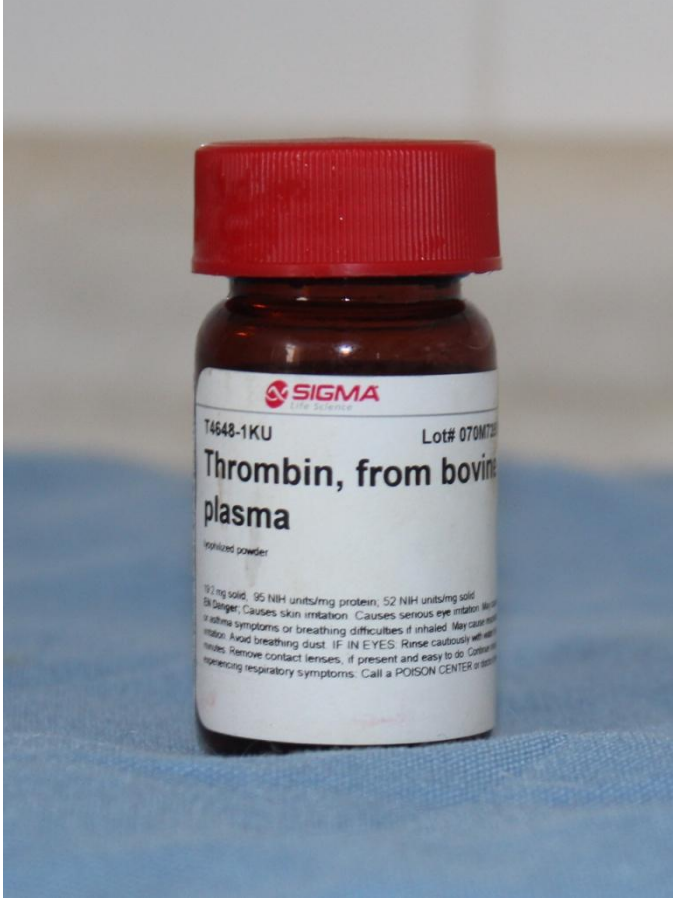


Şekil-5: İkinci santrifüj sonucu TZP'nin eldesi

Oluşan trombositten yoğun plazma alınarak farklı bir tüpe konuldu. Böylelikle hazırlanan TZP' de trombosit oranı normal kana göre 4-7 kat konsantre edilmiş oldu. Üstteki kısım birkaç kez alt tabakalara değmeden pipet ile alınır. Geriye kalan ve toplam kan+ACD-A karışımının %10'u olan kısım TZP'dir.

Elde edilen trombosit zengin plazma, beyaz kan hücreleri de barındırdığından her bir deneğe otolog ürün kullanılmadığından olası immün reaksiyonları azaltmak amacıyla 25 Gy dozunda ışınlama yapıldı, böylelikle lenfosit inaktivasyonu sağlandı.

Buradan elde edilen 4 ml'lik TZP her hayvana 0,1 ml olacak şekilde 32 hayvana kullanıldı. Trombositten zengin plazmanın kullanılmadan aktive edilmesi için %10'luk sıvı $CaCl_2$ çözeltisi ve sığır kaynaklı trombin preperatı (Thrombin from bovine plasma Sigma-Aldrich, MO, USA) kullanıldı (Şekil-6).



Şekil-5: İkinci santrifüj sonucu TZP'nin eldesi

3.3 Hayvan Modeli Ve Cerrahi İşlem

Cerrahi işlemler sırasında 80 mg/kg Ketamine-HCl (Ketalar®-im) ve 8 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile sağlanan anestezi altında gerçekleştirildi. Ratların kafatasındaki ameliyat sahası, her iki hemikraniyumu içine alacak şekilde kulaklara kadar traş edildi. Povidone iyodin (%10) ile bölge temizlendikten sonra alan steril olarak örtüldü. Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından ve standart teknikler uygulanarak gerçekleştirildi. Cerrahi girişim sağlamak amacı ile hayvanlara tespit tahtaları üzerinde pron pozisyonu verildi.

Cilt insizyonları ve dış periost sıyrılması 15 numara bistüri ile yapıldı ve yumuşak doku subperiostal plandan her iki yana sıyrıldı. İki adet tekli kanca ile ekartasyon yapıldıktan sonra ameliyat sahası tamamen hazır hale getirildi. Her iki paryetal kemikte kenarları 8 mm olan kare şekli çizildi. Böylelikle literatür ile uyumlu kritik boyutta kemik defekti oluşturulmuş oldu. Çizime uygun olarak 16 numaralı karpit frez uçları (Ela Hartmetall-Bohrer, Engelskirschen, Germany) ve küçük periost elevatörü kullanılarak, kraniyumda tam kat kritik büyüklükte kemik defektleri oluşturuldu. İşlem sırasında duramater ve damarsal yapıların korunmasına özen gösterildi. Çıkarılan kemik greft ve cerrahi alanı kemik toz ve artıklarından temizlemek amacıyla serum fizyolojik ile irriga edilerek temizlendi.

Daha sonra oluşturulan defektlere aşağıda anlatıldığı gibi konu (Şekil-7-12).

Grup 1 (n=8): Kontrol grubu → Periost üzerine sadece 0,1 ml TZP +0,01 ml Trombin-CaCl₂ karışımı konulan grup

Grup 2 (n=8): Kemik tozu grubu → Periost üzerine kemik tozu + 0,1 ml TZP +0,01 ml Trombin-CaCl₂ karışımı konulan grup

Grup 3 (n=8): Kemik parçaları grubu → Periost üzerine kemik parçaları+ 0,1 ml TZP +0,01 ml Trombin-CaCl₂ karışımı konulan grup

Grup 4 (n=8): Bütün kemik grefti grubu→ Periost üzerine bütün kemik grefti+ 0,1 ml TZP +0,01 ml Trombin-CaCl₂ karışımı konulan grup



Şekil-7: Ratta kritik boyutta kemik defektinin oluşturulması (ölçekleme çubuğu: 10mm)



Şekil-8: Ratta kritik boyutta kemik defektinin kemik tozları ile doldurulması (Ölçekleme çubuğu:10mm, Grup-1)



Şekil-9: Ratta kritik boyutta kemik defektinin kemik tozları + TZP ile doldurulması (Grup-2)



Şekil-10: Ratta kritik boyutta kemik defektinin kemik parçaları ile doldurulması TZP konmadan hemen önceki görüntüsü (Ölçekleme çubuğu:10mm, Grup-3)



Şekil-11: Ratta kritik boyutta kemik defektinin kemik parçaları + TZP ile doldurulması (Ölçekleme çubuğu:10mm, Grup-3)



Şekil 12: Ratta kritik boyutta kemik defektinin bütün kemik grefti+ TZP ile doldurulması (Ölçekleme çubuğu:10mm Grup-4)

Deneye başlamadan kemik toz ve parçalara ait 10'ar ölçüm yapıldı. Kemik tozu ve kemik parçaları dijital ışık mikroskobu kullanılarak (Olympus BX-51, Olympus Corporation, Japan) bilgisayar ölçüm programı (BS 200 ProP, BAB Görüntüleme Sistemleri, Ankara, Türkiye) kullanılarak mikron cinsinden ölçüldü. Alan ölçümleri ortalaması Grup-1 için $75,1 \pm 64,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ iken Grup-2 için $3132,6 \pm 2004,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ idi. Buradaki alan ölçümleri birbiriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. ($p < 0,05$, Bağımsız t testi) Kemik parçaları kemik tozlarının alan olarak 40-45 kat hacim olarak 200-250 katı idi.

Trombositten zengin plazma ile karıştırılan maddeler taşmayacak şekilde eklendi bir müddet beklendi. Eklenecek madde pıhtılaştıktan sonra yara yerleri 4/0 keskin ipek (İpek-Doğsan, Trabzon) ile devamlı suture edilerek kapatıldı. Hayvanların cerrahi sonrası bakımı

standart laboratuvar şartlarında, 5'erli gruplar halinde kafeslerde, 20–22 °C sıcaklıkta sağlandı.

Çalışmanın ilk haftasında kontrol grubundan (Grup–1)1 hayvan anestezi etkisiyle öldü. Bu deneğin yerine yeni bir denek opere edilerek idamesi sağlandı.

Tüm gruplardaki denekler 8. haftanın sonunda sakrifiye edildi. Daha sonra orta hat insizyonundan girilip kemik yapı etraf sağlam dokuyla beraber genişçe çıkarıldı.

Sakrifiye edilen her denekten çevre yumuşak dokular temizlendikten sonra alınan rat kafatasları Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda %10'luk nötral formolin solüsyonu içinde saklandı.

3.4 Değerlendirme Yöntemleri

3.4.1 Genel Değerlendirme

Çalışmaya dahil edilen hayvanların, çalışma süresince genel sağlık durumları, operasyona bağlı nörolojik sekelleri ve yara bölgesinde izlenen değişiklikler kaydedildi. Hayvanlarda nörolojik araz görülmezken 1. gruptan 1, 3. gruptan 2 hayvanda görmede azlama-kısmi körlük gelişti. Bu komplikasyonların operasyon sırasındaki travmaya bağlı olduğu düşünüldü.

3.4.2 Histolojik Değerlendirme

Sekizinci haftada deneklerin sakrifiye edilmesinden sonra alınan tek parça kemik örnekleri tespit amacıyla, %10'luk formaldehit solusyonunda, oda sıcaklığında bekletildi. Tespit sonrasında, demineralizasyon amacıyla %15'luk formik asite kondu. Dokular her gün kontrol edilerek 96 saat sonunda yumuşadığı gözlemlendi. Böylece dekalsifikasyon sağlanmış oldu. Her bir defekt çevre sağlam doku ile birlikte 3–4 mm'lik kesilerek tek bir parafin bloğa sığacak şekilde ayarlandı, doku takip cihazına konmak üzere kasetlere yerleştirildi. Kasetler % 10'luk formaldehit solüsyonu içinde doku takip cihazına (Leica ASP 300, Germany) kondu. Alkol ve ksilen solüsyonlarından geçirilen dokular daha sonra parafinde bekletildi (Dehidratasyon-Şeffaflaştırma-Parafinizasyon). Daha sonra bu dokular alınarak parafin blok makinesinde (Leica EG 1140 C, Germany) bloklandı. Her bir bloktan 4–5 mikrometre kalınlığında parafin kesitler 2 normal ve 3 lizinli lama

(immünohistokimya için) alındı. Normal lamdaki kesitler Hematoksilen Eozin ve Masson-Trikrom ile boyandı. Örnekler bilgisayar ortamına veri aktarımını sağlayan dijital ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Olympus Corporation, Japan) ile görüntülendi.

İyileşme bölgesi histolojik olarak incelendikten sonra, iyileşme durumu tecrübeli bir patolog tarafından değerlendirildi ve ölçümler yapıldı. Hematoksilen Eozin ile boyanan her preparatta iyileşme hattında kemiğin en kalın olduğu alan tespit edildi. Bu kemik parçası ya da kemik bilgisayar ölçüm programı (BS 200 ProP, BAB Görüntüleme Sistemleri, Ankara, Türkiye) kullanılarak mikron cinsinden ölçüldü. Her alandan yapılan 5 ölçümün aritmetik ortalaması alındı ve tablodaki yerine yazıldı. Her grup için elde edilen 8. hafta değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Beş alanda gerçekleştirilen histolojik değerlendirmelerden 1.si rezorbsiyon ve yabancı cisim reaksiyonunu değerlendirmektir. Bu değerlendirme Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlarda yapıldı. Grup-1’de kemik doku olmadığından kıyaslanmadı. Diğer gruplarda ise rezorbsiyon ve yabancı cisim reaksiyonu derecelendirilerek kıyaslandı. Değerlendirme tecrübeli bir patolog tarafından yapıldı ve rezorbsiyonun ve yabancı cisim reaksiyonunun şiddetine göre 4 grup oluşturuldu.

Negatif: Hiç rezorbsiyon (ya da yabancı cisim reaksiyonu) yok

+: Zayıf rezorbsiyon (ya da yabancı cisim reaksiyonu) var

++:Orta derecede rezorbsiyon (ya da yabancı cisim reaksiyonu) var

+++:Kuvvetli derecede rezorbsiyon (ya da yabancı cisim reaksiyonu) var

Masson Trikróm boyası ile boyanmış preparatlarda bağ dokusu alanları tespit edildi.

İmmünohistokimyasal Boyalar ve Kullanımı

İmmünohistokimya için Anti-Runx-2 antikorunu(runt-related transcription factor 2) (Abcam plc, Cambridge, UK), Anti-SPARC Antikoru(1B2) (Abcam plc, Cambridge, UK), Anti-Sp7(Osterix) antikorunu(Abcam plc, Cambridge, UK) 1/100 oranında antikor diluenti ile sulandırılarak kullanıldı.

1. Kemik kesitleri immünohistokimyasal boyama için 1 gece (16 saat) 60 C°’lik etüvde tutuldu.
2. 30 dakika ksilen uygulanarak şeffaflaştırma gerçekleştirildi.

3. 15 dakika absolü alkol (%99),15 dakika etil alkol (96%) olmak üzere azalan alkol serilerinden geçirildi.
4. 15 dakika distile suda ve ardından bir başka distile suda 15 dakika bekletildi.
5. ph=6 olan sitrat içinde basınç altında (basınçlı tencere) 20 dakika kaynatıldı.
6. 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
7. Tekrar distile suya alınarak 5 dakika bekletildi.
8. Dokuların etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
9. 5 dakika PBS (Phosphat Buffered Solution)'de bekletildi.
10. %3 'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılarak 20 dakika bekletildi.
11. 5 dakika PBS (Phosphat Buffered Solution)'de bekletildi.
12. Thermo Scientific marka Large volume Ultra V Block damlatılarak 7 dakika bekletildi.
13. Hızlı bir şekilde iki ayrı PBS şalesine batırılıp çıkarıldı. Antikor aşamasına geçildi.
14. 1 saat primer antikorlar (Anti-Runx-2, Anti-Sparc, Anti-Sp7) damlatılarak nemli ortamda bekletildi.
15. Distile su ile yıkandı ve 5 dakika PBS'de bekletildi.
16. Sekonder antikorlardan Thermo Scientific marka Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (sarı link) damlatılarak nemli ortamda 20 dakika bekletildi.
17. Distile su ile yıkandı ve 5 dakika PBS'de bekletildi.
18. Sekonder antikorlardan Thermo Scientific marka Streptavidin Peroxidase (kırmızı link) damlatılarak 20 dakika nemli ortamda bekletildi.
19. Distile su ile yıkandı ve 5 dakika PBS'de bekletildi.
20. Daha sonra Thermo Scientific marka DAB (Diaminobenzidine) kromojen [DAB substrate system (RTU)] damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.
21. 2 ayrı distile su şalesinde yıkandı ve Harris Hematoksilen boyası damlatıldı. 2 dakika bekletildi.
22. 5 dakika çeşme suyunda yıkandı.
23. %1'lik Amonyaklı sudan geçirilerek boyanın parlaklığı sağlandı.
24. Distile suyla yıkandı ve Thermo Scientific marka su bazlı kapama malzemesi (Vision Mount) ile kapatılarak boyama işleri sonlandırıldı.

Değerlendirme kriterlerinde boyanmanın yaygınlığına göre 4 grup oluşturuldu.

Negatif: Hiç boyanma yok

+1: Zayıf boyanma var

+2:Orta derecede boyanma var

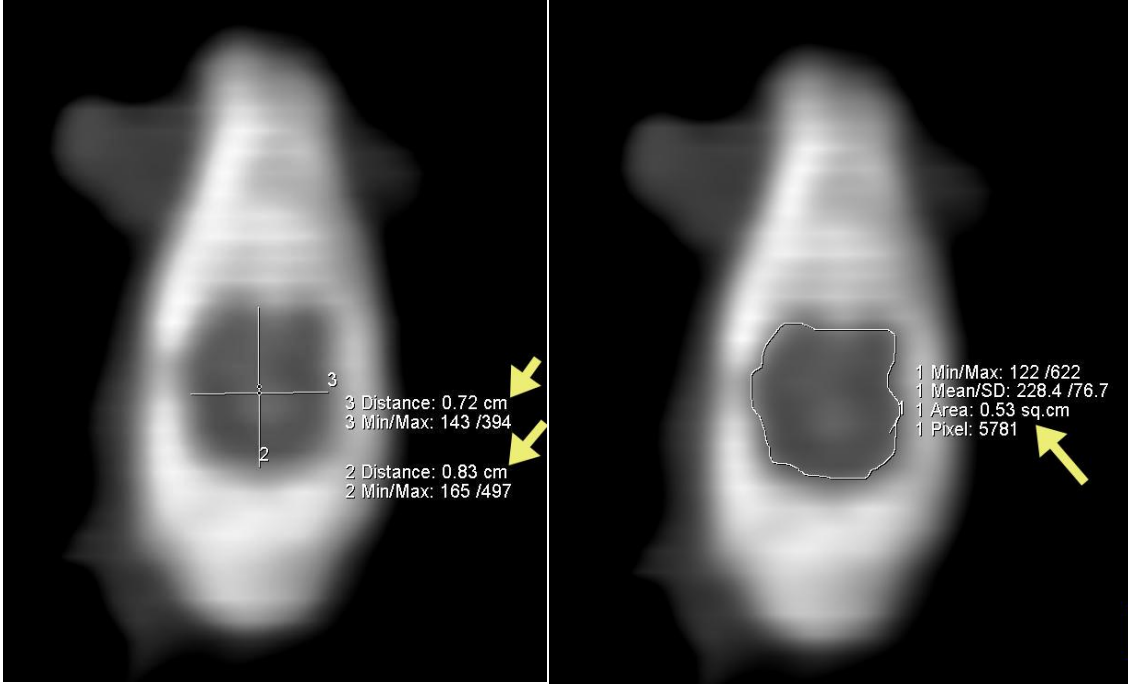
+3:Kuvvetli derecede boyanma var

Anti-RUNX2 ve Anti-Sp7 antikorunda boyanma hücre çekirdeklerinden değerlendirildi. Normal kemik dokudaki boyanma +++ pozitif kabul edildi. İyileşme hattındaki boyanmalar buna göre değerlendirildi. Anti-SPARC Antikoru ise kemik matriks boyasıdır. Ancak normal kemik de dahil olmak üzere tüm kemik dokularında boyanma tespit edilmedi. Bunun yanında iyileşme hattındaki bağ dokusu alanlarda zemin boyanması izlendi ve bu boyanma derecelendirildi. Her grup için elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.4.3 Radyolojik Değerlendirme

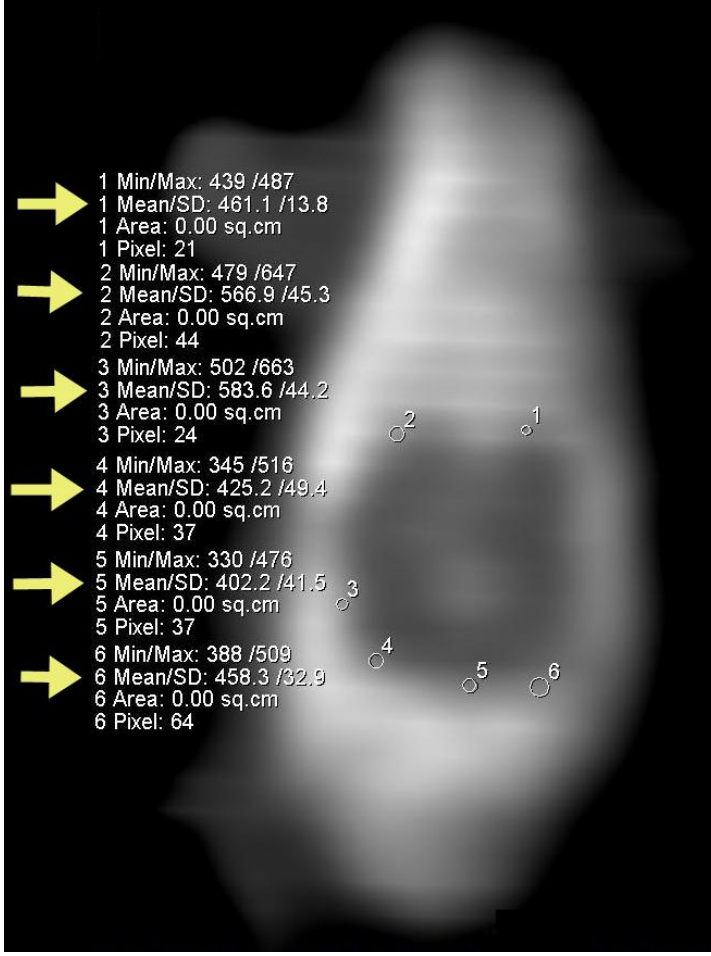
Radyolojik değerlendirme amacıyla deneklere sedasyon verildikten çekimler yapıldı. Bilgisayarlı Tomografi (BT) incelemesi için 64 kesitli BT cihazı (SOMATOM Sensation 64, Siemens, Erlangen, Germany) kullanıldı. İnceleme sonrası verilerin değerlendirilmesi için ise Siemens Leonardo iş istasyonu kullanıldı. İncelemelerde; kolimasyon 0,6 mm, masa hızı 0.9, rotasyon zamanı 1 sn olarak ayarlandı. İncelemeler için 80 Kv ve 250 mAs değerleri kullanıldı. Kesit kalınlığı 1 mm idi. İncelemede öncelikle topogram görüntüsü alındı, sonra koronal planda görüntüler elde edildi. İnceleme sonrası koronal görüntülerden iş istasyonu kullanılarak aksiyel ve sagittal planda görüntüler oluşturuldu. Bu görüntülerden uygun açılar kullanılarak aksiyel planda verteks seviyesinde oluşturulan defektin en geniş olduğu alan tespit edildi. Ölçümler bu alan üzerinden yapıldı. Deney hayvanlarının birbirine karışmaması için kuruklarına numara verildi. Daha sonra bu numaralar haftada 2 kez cilt kalemi ile yenilendi.

Her bir deney hayvanından 0. hafta ve sonrasında 2, 5 ve 8. haftalarda BT incelemesi yapıldı. Elde edilen görüntülerden; defektin en geniş olduğu alandan anteroposterior ve transvers uzunluk ölçümleri, iş istasyonu üzerinden defektin alan ölçümleri yapıldı (Şekil-13).



Şekil-13: Tomografik görüntülerden defektin ebatlarının ve hacminin ölçülmesi

Ayrıca 8. hafta görüntülerinden kemikleşme olan alanlarda farklı düzeylerden 6 ölçüm yapılarak ortalama yeni kemik dansite değerleri Hounsfield Unit (HU) olarak tespit edildi. Sonra bu 6 değerın ortalaması alınarak ortalama yeni kemik dansite değeri belirlendi(Şekil-14)



Şekil-14: 8.hafta görüntülerden kemikleşmenin olduğu alanlardan her hayvanda 6 ayrı ölçüm yapılarak ortalama yeni kemik dansite değeri Hounsfield Unit (HU) olarak hesaplandı

3.5 İstatiksel Analiz

Değerlendirilen tüm parametrelerden elde edilen veriler, istatistiksel değerlendirme için SPSS for Windows v.16,0 programına (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) aktarıldı. Araştırmanın parametrik değerleri ortalama ve standart hataları (SE) hesaplandı. Nonparametrik ölçümlerde MannWhitney-U kullanılırken parametrik ölçümlerde ANOVA ve Tukey testi kullanıldı. Kemik toz ve parçalarının alan kıyasında bağımsız t testi kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

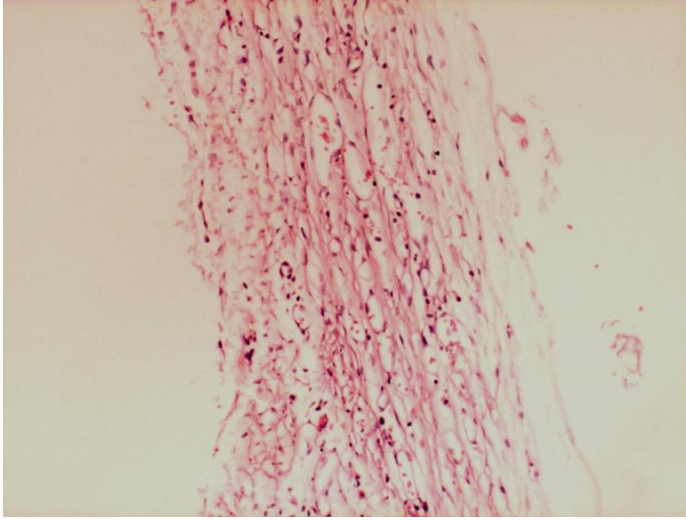
4. BULGULAR

4.1 Genel Bulgular

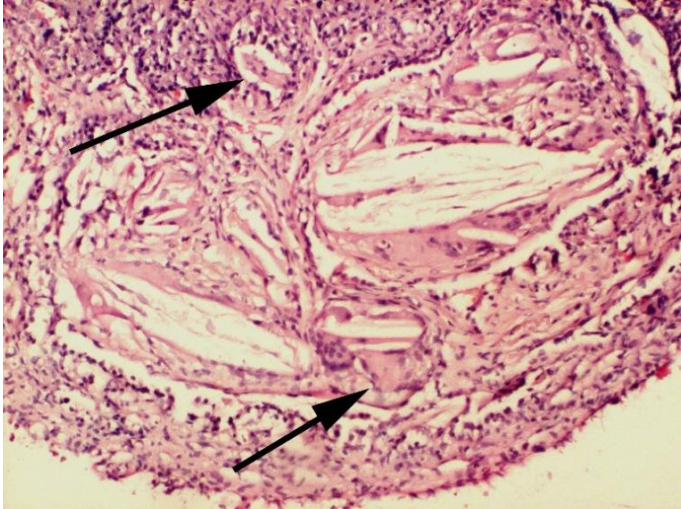
Çalışmanın ilk haftasında kontrol grubundan (Grup-1) 1, kemik parça grubundan (Grup-3) 1 hayvan anestezi etkisiyle öldü. Bu deneğin yerine yeni bir denek opere edilerek idamesi sağlandı. Diğer hayvanlarda ameliyata bağlı ikincil enfeksiyon nörolojik araz ya da başka herhangi bir komplikasyon görülmedi.

4.2 Histopatolojik Bulgular

Çalışmaya katılan 32 deneğin hepsinde histopatolojik değerlendirme yapıldı. Grup-1'de ölçüm yapılmaya uygun canlı kemik tozu içeren kesite rastlanmadı. Grup-1'den iki ratta kemik spikülleri görülse de bunlar cansız, rezorbe olmuş dokular idi. Bu kemik parçalar etrafında yoğun yabancı cisim reaksiyonu mevcut idi (Şekil-15,16).

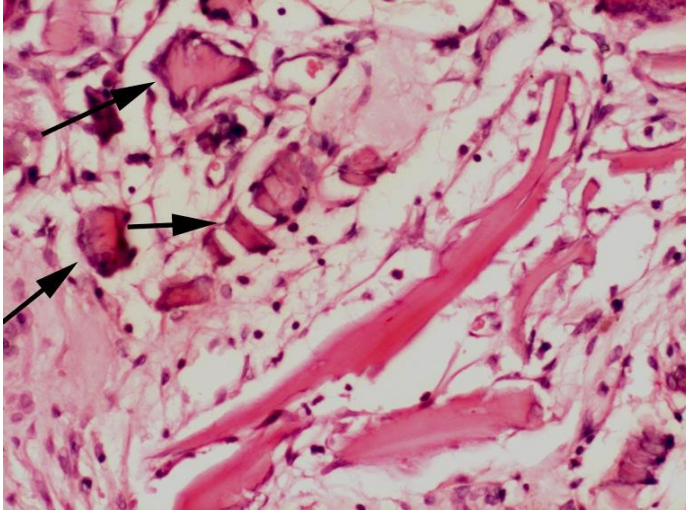


Şekil-15: Kemik tozu ve kemik spikülü içermeyen yalnızca inflamatuvar hücreler içeren görünüm izlenmektedir. (Grup-1,Hematoksilen-Eozin x10)



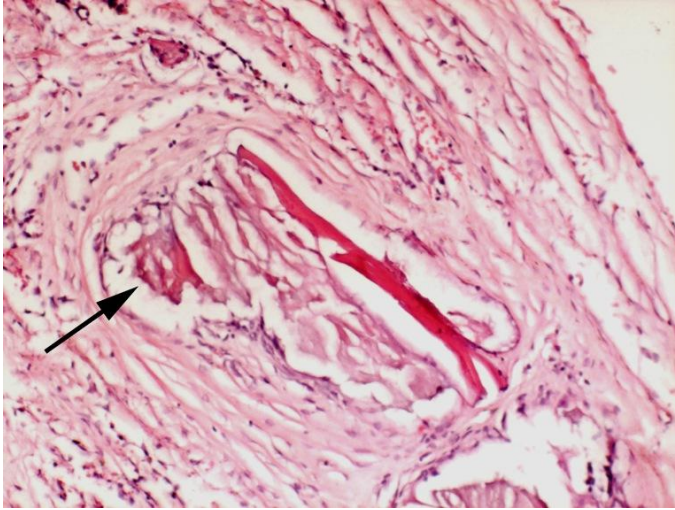
Şekil-16: Cansız kemik spikülleri (ok) ve etrafında yoğun yabancı cisim reaksiyonu görülmektedir

Grup-2’de yer yer kemik spikül ve tozlarının beraber olduğu alanlar gözlemlendi. Bağ doku içinde yer alan vasküler yapılar ve iltihabi hücreler dikkat çekmekte idi (Şekil-17).

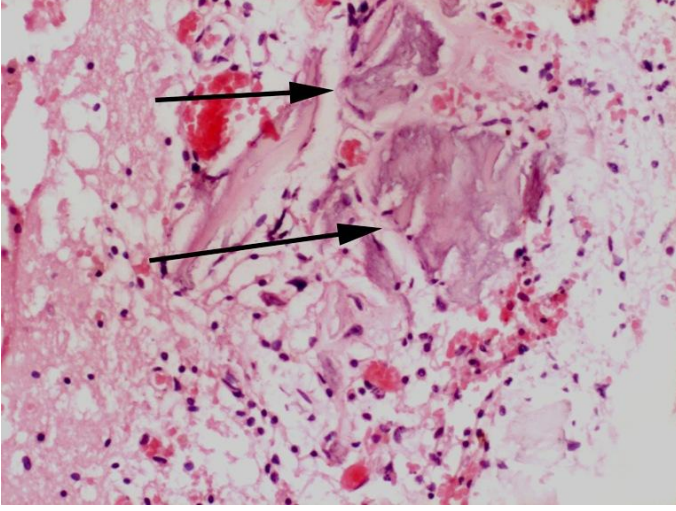


Şekil-17: Kemik tozları (ok) ve hemen bunların sağında uzanan kemik spikülü gözlenmektedir. (Grup-2,Hematoksilen-Eozin x20)

Grup-2’de görülen bu kemik tozlarının etrafında bir miktar kemikleşme olsa da genelde canlılığını yitirdiği gözlemlendi (Şekil-18).

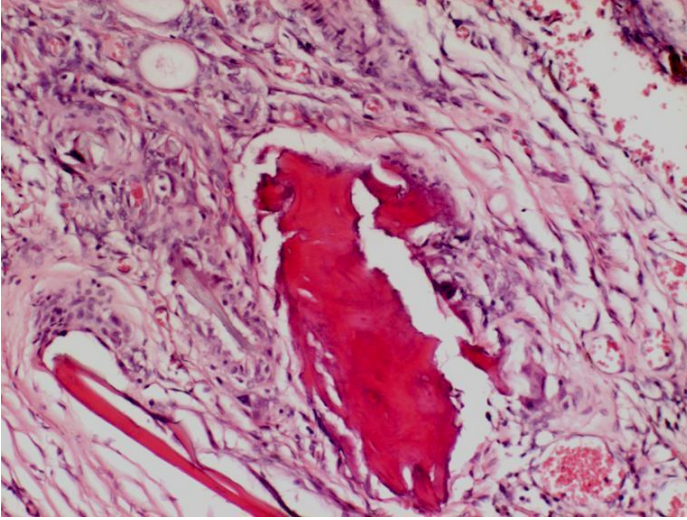


Şekil-18: Canlılığını kaybetmiş kemik tozları (ok) ve hemen yanında canlı kemik spikülü görülmektedir. (Grup-2,Hematoksilen-Eozin x10)



Şekil-19: Canlılığını kaybetmiş kemik tozları görülmektedir(oklar) (Grup-2,Hematoksilen-Eozin x20)

Grup-3'te ise görülen kemik spikülleri ise daha büyük idi. Bağ doku içinde vasküler yapılar ve etrafta yabancı cisim reaksiyonu dikkat çekmektedir (Şekil-20).



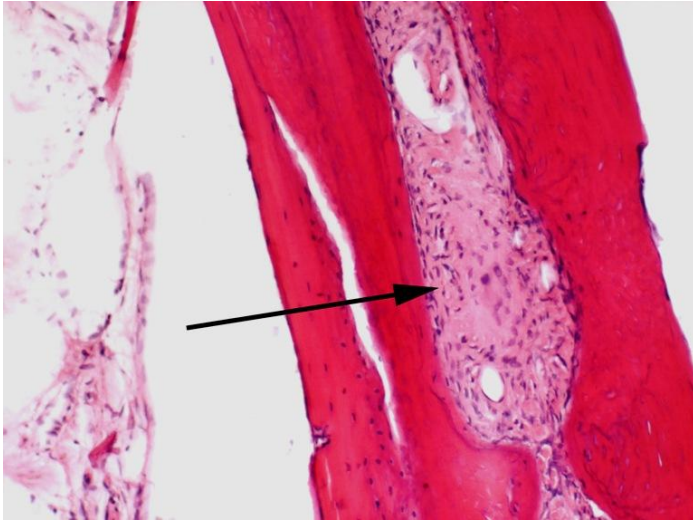
Şekil-20: Kemik spikülleri ve etrafta yoğun inflamatuvar hücreler görülmektedir. (Grup-3,Hematoksilen-Eozin x10)

Grup-4'te ise bağ doku içinde vasküler yapılar, daha da büyük kemik spikülleri ve bunların etrafında yabancı cisim reaksiyonu görüldü. Ayrıca bu kemik dokunun içinde canlı kemik iliği mevcuttu (Şekil-21).



Şekil-21: kalın kemik parçaları ve canlı kemik iliği (kalın ok), kemiğin arasına giren bağ doku mevcuttu (ince ok) (Grup-4,Hematoksilen-Eozin x4)

Ayrıca Grup-4'te canlı kemiğin arasına yer yer bağ dokusunun da girdiği gözlemlendi (Şekil-22)

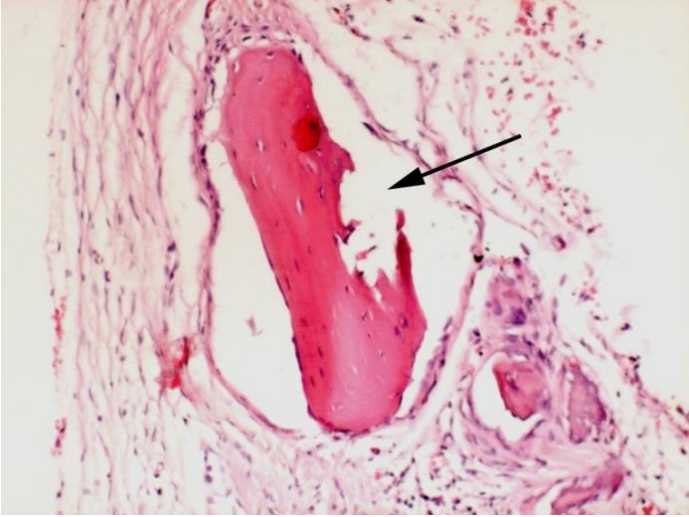


Şekil-22: Canlı kemik doku arasına girmiş canlı bağ dokusu hücreleri (Grup-4,Hematoksilen-Eozin x10)

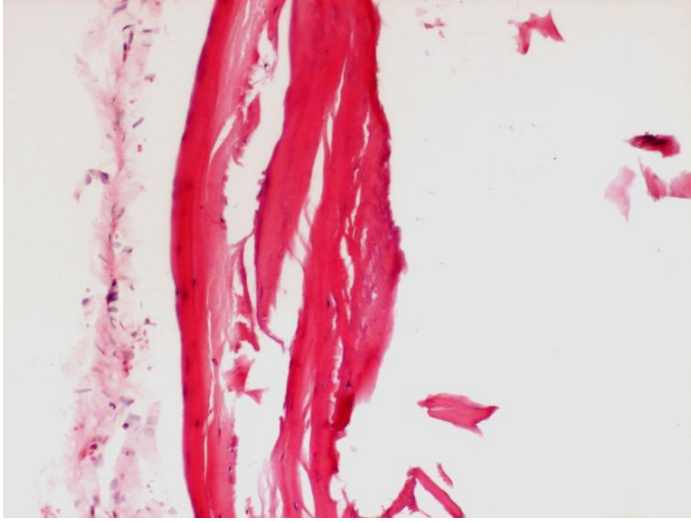
Grup-4'e ait preparatlarda normal yapının bozulduğu fragmente olduğu dejenerasyon sahaları ve yabancı cisim reaksiyonu olan alanlar bulundu (Şekil-23).



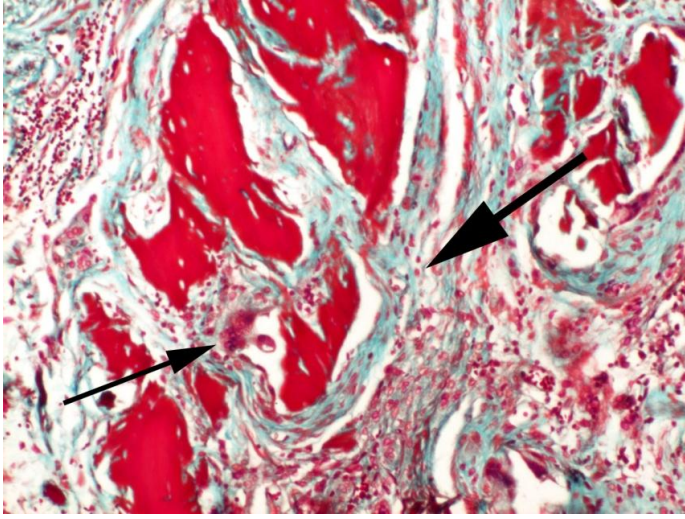
Şekil-23: Normal kemik yapısının korunamadığı ve dejenere olduğu, birbirinden ayrılan kemik dokularının arasına bağ dokunun girdiği kesit görülmektedir. (Grup-4,Hematoksilen-Eozin x4)



Şekil-24: Rezorbsiyonun çok belirgin olduğu Grup-4'e ait bir preparat görülmektedir



Şekil-25: Parçalanmış ve etrafa dağılmış kemik dokular izlenmektedir. Ayrıca kemik yoğunluğunun azlığı dikkat çekmektedir. (Grup-4,Hematoksilen-Eozin x10)



Şekil-26:Dev hücre ve etrafında kemik rezorpsiyonu (ince ok) ve etrafında gelişen bağ dokudan zengin yabancı cisim reaksiyonu izlenmektedir.(Grup-3,Masson-Trikrom,x10)

Beş alanda gerçekleştirilen histolojik değerlendirmelerden ilki rezorpsiyon ve yabancı cisim reaksiyonunu değerlendirmektir. Bu değerlendirme Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlarda yapıldı. İlk önce rezorpsiyon bulguları kıyaslandı:

Grup-1’de kemik olmadığından rezorpsiyon da görülmedi, diğer tüm gruplarda rezorpsiyon vardı ve rezorpsiyon olan grupların kendi aralarında anlam yoktu($p>0,05$). +++ rezorpsiyon olan preparata rastlanmadı.

Daha sonra yabancı cisim reaksiyonu bulguları kıyaslandı:

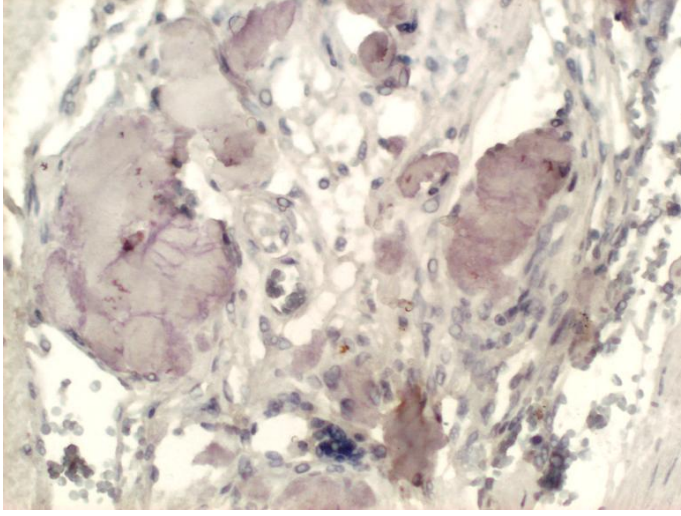
En çok yabancı cisim reaksiyonunu Grup-2’de yani kemik tozu grubunda ve daha sonra da Grup-3’te yani kemik parça grubunda görüldüğü (fark var, $p<0,05$) anlaşıldı. Grup-1 ve

Grup-4'ün ise aynı oranda yabancı cisim reaksiyonuna sebep olduğu anlaşıldı. (fark yok, $p>0,05$). +++ yabancı cisim reaksiyonu olan preparata rastlanmadı.

İmmünohistokimyasal bulgular:

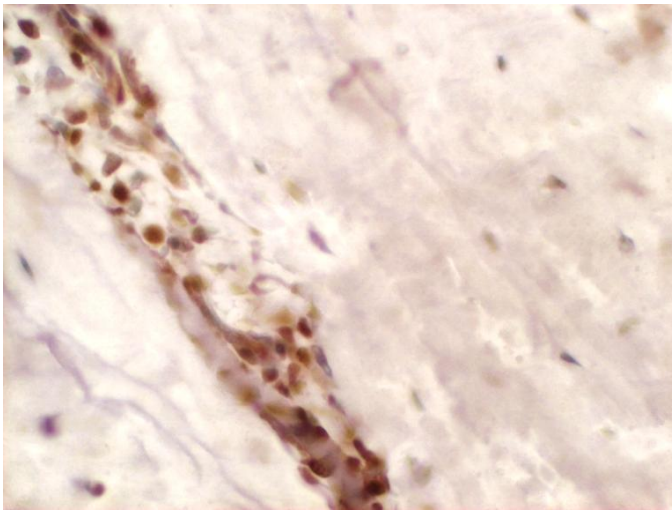
Runx-2:

Kemik ve kırıldak formasyonunda aktivatör olarak görev alan Runx2, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde osteoblast matürasyonunun erken evrelerinde osteoblast farklılaşmasını da uyarır. Grup-1 ve Grup-2 de Anti-Runx-2 boyanması diğer gruplara göre azdır (Şekil-27).

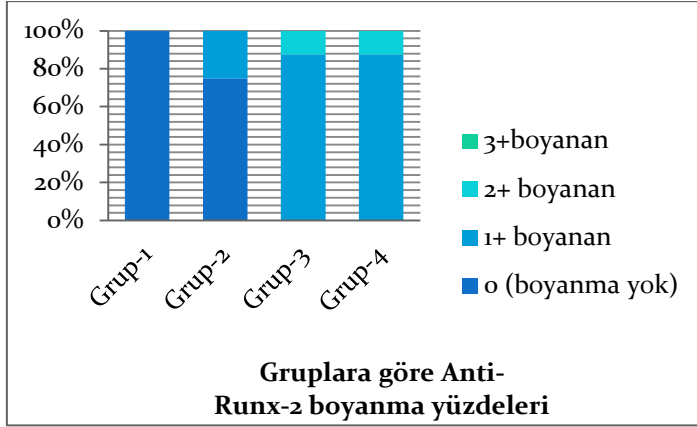


Şekil-27: Hiç boyanmanın olmadığı, yani osteoblastik aktivitenin olmadığı Grup-2 ye ait bir görüntü izlenmekte (Anti-Runx-2, x20)

Grup-3 ve Grup-4'te ise Anti-Runx-2 boyanması artmıştır. Bu gruplarda tam ya da tama yakın osteoblastik aktivite artışı izlenmiştir (Şekil-28).



Şekil-28: Şekilde kemik etrafında Anti-Runx-2 ile +++ boyanan Grup-4'e ait bir görüntü izlenmektedir. (Anti-Runx-2, x20)



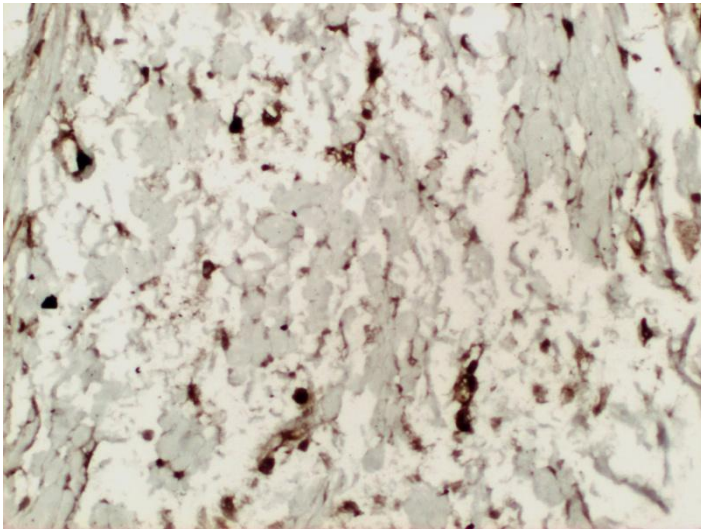
Şekil-29: Gruplara göre Runx ekspresyon yüzdeleri

Hiç kemik dokunun olmadığı Grup-1 ile Kemik tozları bulunan Grup-2 arasında istatistiksel açıdan fark bulunamadı ($p>0,05$). Grup-1’de Runx-2 ekspresyonu hiç yokken Grup-2’de sadece 2 denekte + şeklinde mevcut idi Grup-2’nin diğer 6 deneğinde Runx-2 ekspresyonu hiç yoktu.

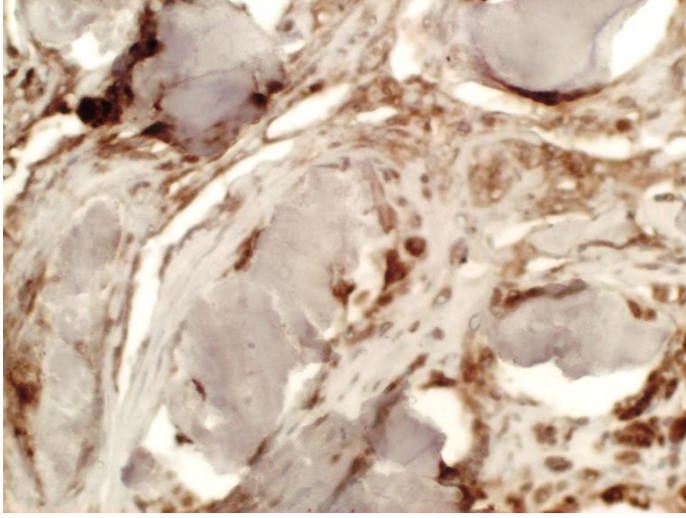
Runx-2 ekspresyonunu belirgin olduğu Grup-3 ve Grup-4 ise birbiriyle kıyasında fark yokken ($p>0,05$) bu gruplar ile Grup-1 ve Grup-2 arasında fark vardı ($p<0,05$).

Sp7 (Osterix)

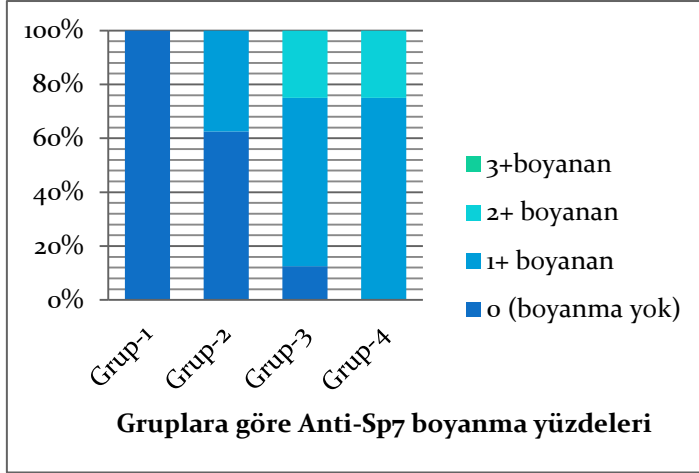
Sp7 (Osterix) osteoblast farklılaşması için gerekli transkripsiyonel aktivatördür ve Sp1 transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. (40)Mezenkimal hücrelerin osteoblasta farklılaşmasında görev alır. Osterix ekspresyonu kemik formasyonu için elzemdir (Şekil-29).(41)



Şekil-30: Hiç boyanmanın olmadığı Grup-1'e ait bir kesit izlenmektedir. (Anti-Sp7, x10)



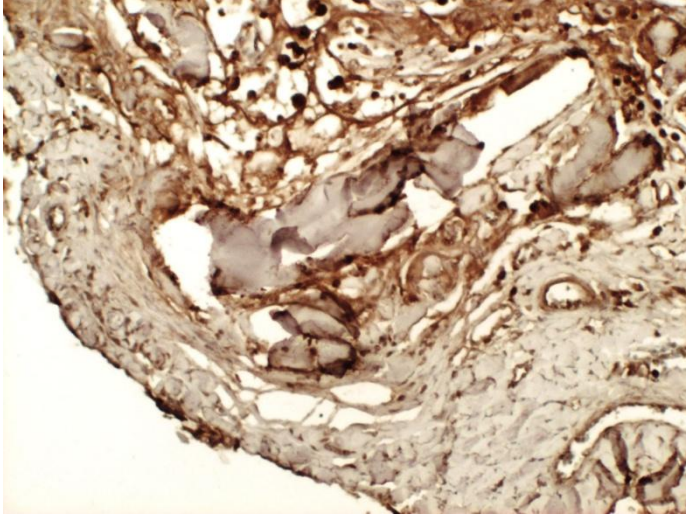
Şekil-31: Osteoblastik farklılaşmanın olduğu ve ++ boyanan Grup-3'e ait bir kesit görülmektedir. (Anti-Sp7, x20).



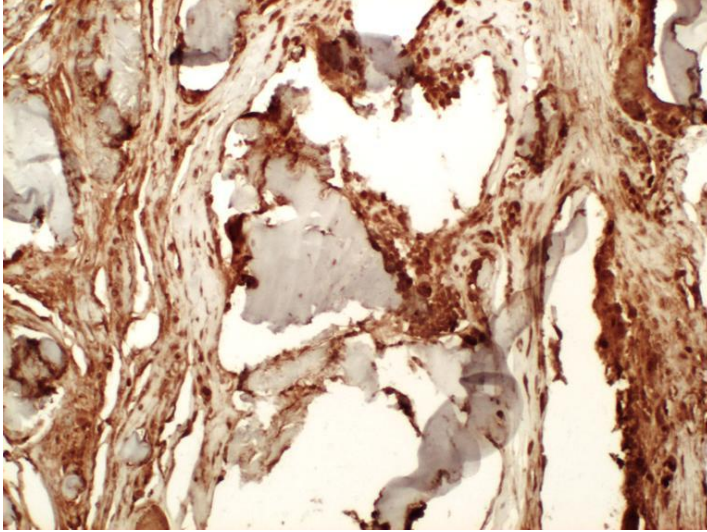
Şekil-32: Gruplara göre Sp7 ekspresyon yüzdeleri

Hiç kemik dokunun olmadığı Grup-1 ve Grup-2 ile Grup-3 ve Grup-4 arasında istatistiksel açıdan fark bulundu ($p < 0,05$). Grup-1'de sp7 ekspresyonu yoktu.

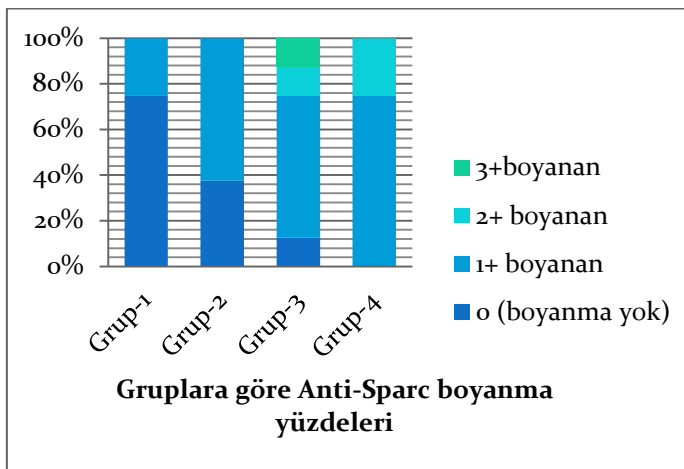
Diğer adı Osteonektin olan Sparc non-kollojen bir proteindir ve fibriller kollojeni ve bazal lamina kollojeni olan kollojen-4'ü bağlar. (42) Dolayısıyla Sparc antikoru kemik matriks boyanması yapar.



Şekil-33: Grup-2'ye ait örnekte ++ boyanma gözlenmektedir. (Anti-Sparc, x10)



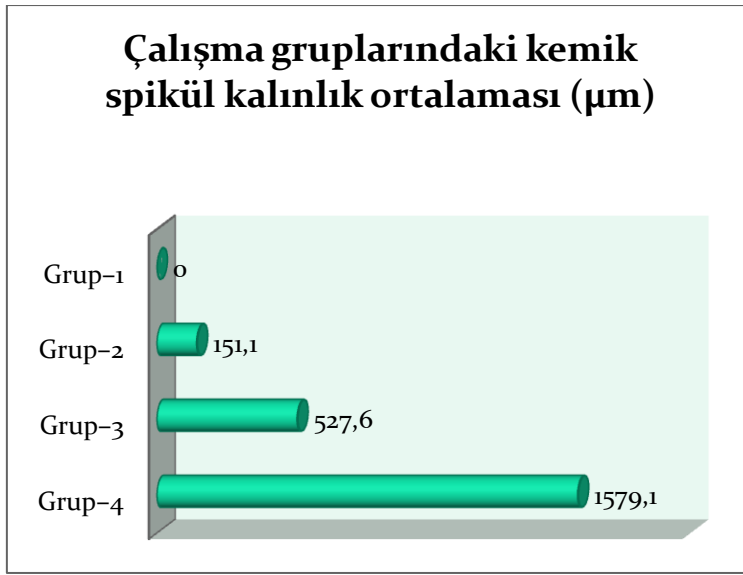
Şekil-34: Grup-2'ye ait örnekte ++ boyanma gözlenmektedir. (Anti-Sparc, x20)



Şekil-35: Gruplara göre Anti-Osteonektin boyanma yüzdeleri

Hiç kemik dokunun olmadığı Grup-1 ile Grup-3 ve Grup-4 arasında istatistiksel açıdan fark bulundu ($p < 0,05$). Grup-3 ve 4 SPARC ekspresyonu en çok olan gruplardı. Grup-1 en az olan gruptu. Grup-2 ile Grup-3 ve Grup-3 ile Grup-4'ün birbiriyle ile kıyasında fark yoktu ($p > 0,05$).

Histolojik olarak bakılan bir diğer parametre de kemik spikül kalınlığı idi. Bu ölçümler 10'luk büyütmede ve kalibre edilerek yapıldı. Gruplara göre kemik spikül kalınlıkları için Grup-1'de ortalama değer 0,0 idi çünkü ölçüm yapılabilecek kemik bulunamadı. Grup-2'de ölçülen kemik spiküllerinin ortalaması $151,1 \pm 54,4 \mu\text{m}$, Grup-3'te $527,6 \pm 225,7 \mu\text{m}$ ve Grup-4'te $1579,1 \pm 374,1 \mu\text{m}$ olarak tespit edildi.



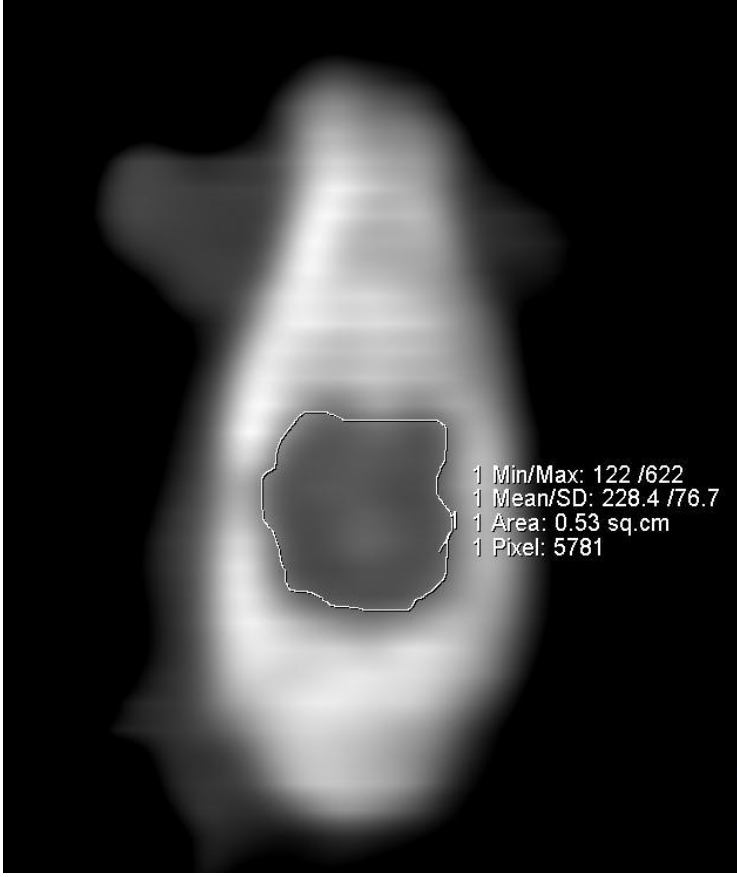
Şekil-36: Gruplardaki kemik spikül kalınlık ortalamaları

Grup-1'de ölçüm yapılabilecek canlı kemik dokuya rastlanmadı. Kemik tozunun olduğu grup (Grup-2) hiç kemik tozunun olmadığı Grup-1'e benzerdi ($p > 0,05$). Spikül ölçümlerinin en yüksek yapıldığı grup Grup-3 iken bunu Grup-4 izledi ama bu fark anlamsızdı ($p > 0,05$).

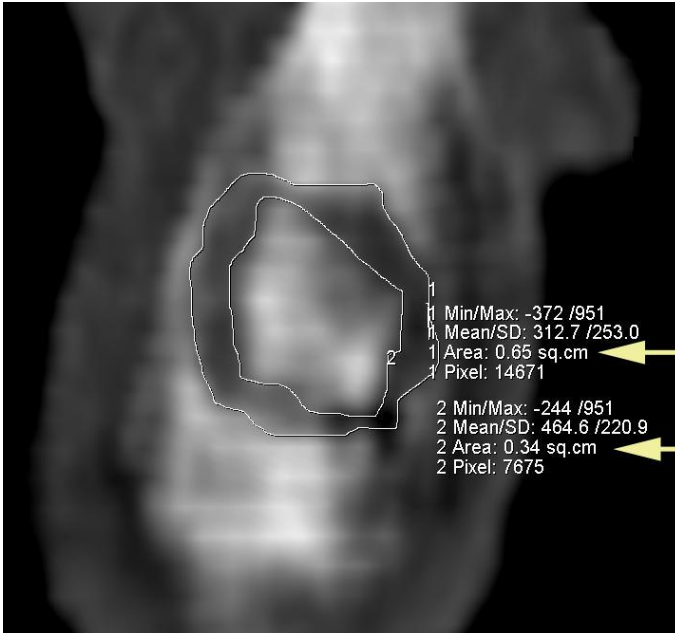
4. 3 Radyolojik Bulgular

Defekt alan Değerlendirmesi

Operasyonlarda oluşturulan defektlerin alanı radyolojik olarak 0.haftada ve takip süresince 2.5.8.haftalarda ölçüldü. Her grupta bulunan 8 hayvan için 0.hafta defekt ortalaması Grup-1'de $59,25 \pm 4,32 \text{mm}^2$, Grup-2'de $62,0 \pm 4,20 \text{mm}^2$, Grup-3'te $81,25 \pm 3,16 \text{mm}^2$ ve Grup-4'te $30,13 \pm 1,80 \text{mm}^2$ olarak belirlendi. Gruplara arasındaki bu eşitsizliğin sebebi Grup-4'te bütün kemik greft alanın hesaplanarak oluşturulan defekt alandan çıkarılması ve gerçek defekt alanının bulunmasıdır (Şekil-37,38)



Şekil-37: İnce kesit tomografiden defekt alının hesaplanması

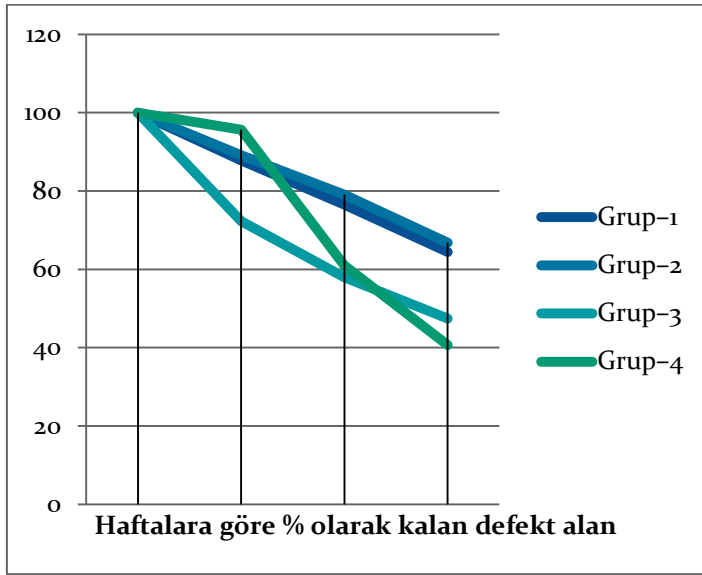


Şekil-38: Bütün kemik greftinin olduğu grupta gerçek defekt alının hesaplanması

Bu eşitsizliğin ortadan kaldırılması için yüzde iyileşme göz önüne alınmış ve 2.hafta grafik yüzde alan olarak verilmiştir.(0. Hafta alanları %100 kabul edilmiştir.)

	0.hafta defekt Ortalama(%)	2.hafta defekt Ortalaması (%)	5.hafta defekt Ortalaması (%)	8.hafta defekt Ortalaması (%)
Grup-1	100	87,78	76,50	64,40
Grup-2	100	89,11	79,06	66,81
Grup-3	100	72,28	57,94	47,41
Grup-4	100	95,68	61,02	40,67

Tablo-3:Grupların haftalara göre defekt alan ortalamalarının % cinsinden ifadesi



Şekil-39: Sıfırncı, ikinci, beşinci ve sekizinci haftalarda grupların kalan defekt alan ortalamaları

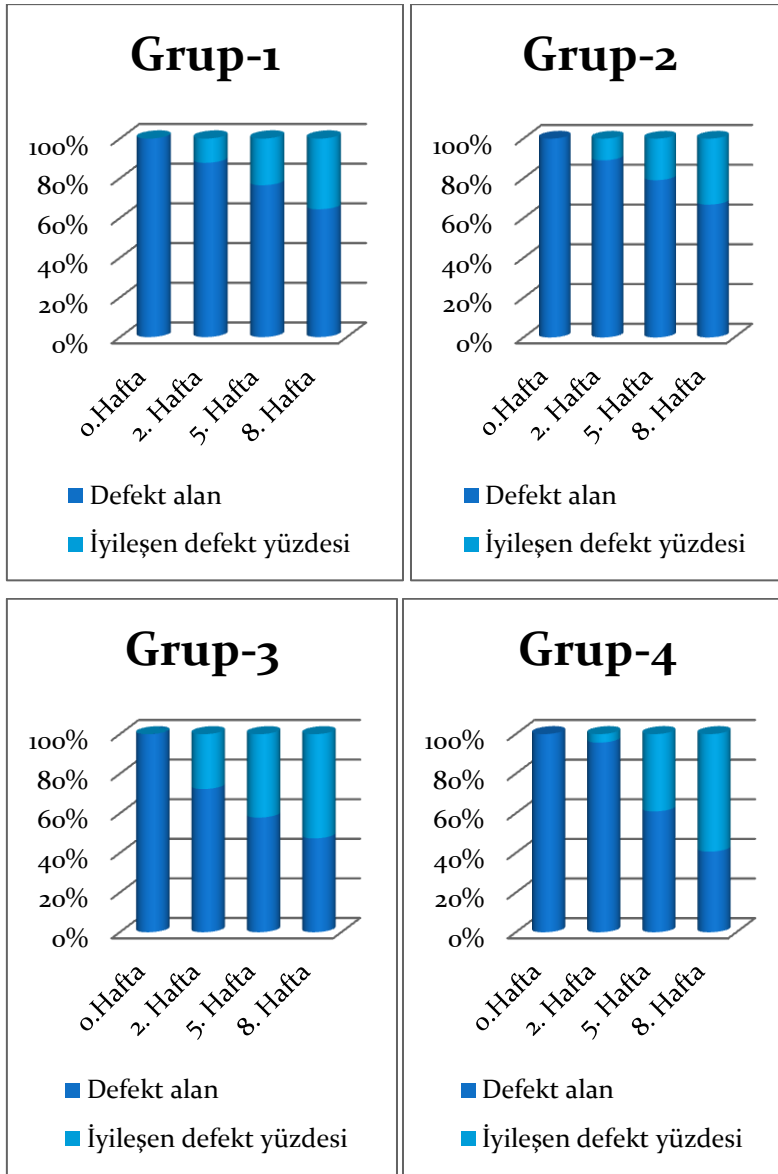
2.haftada Grup-3'ün diğer gruplara göre daha iyi iyileştiği görülmüştür ($p<0,05$). Grup-4'te defekt büyümüş gibi görünse de istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

8. haftada ise Grup-3 ve Grup-4'ün Grup-1 ve Grup-2'den daha iyi iyileştiği gözlenmiştir($p<0,05$).

Buna göre Grup-1 ve Grup-2'de her çekilen tomografi zamanında anlamlı iyileşme olmuştur ($p<0,05$).

Grup-3'te 5. hafta ile 8. hafta iyileşmesi arasında ve Grup-4'te ise 0. hafta ile 2. hafta iyileşmesi arasında fark yoktur.

İyileşmeyi gösteren grafikler:



Şekil-40: Grupların haftalar içindeki iyileşmeleri

Kemik yoğunluk değerlendirme bulguları

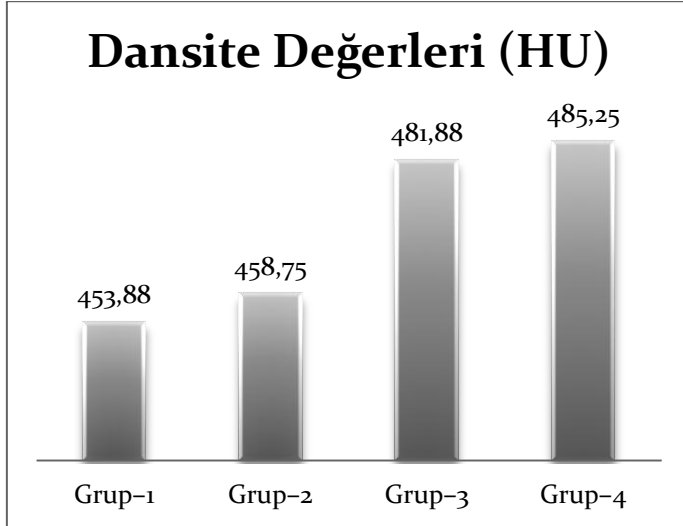
	Dansite Ortalama	Std. Hata
Grup-1	453,88	31,93
Grup-2	458,75	16,20
Grup-3	481,88	20,88
Grup-4	485,25	16,41

Tablo-4: Gruplara göre dansite ortalamaları

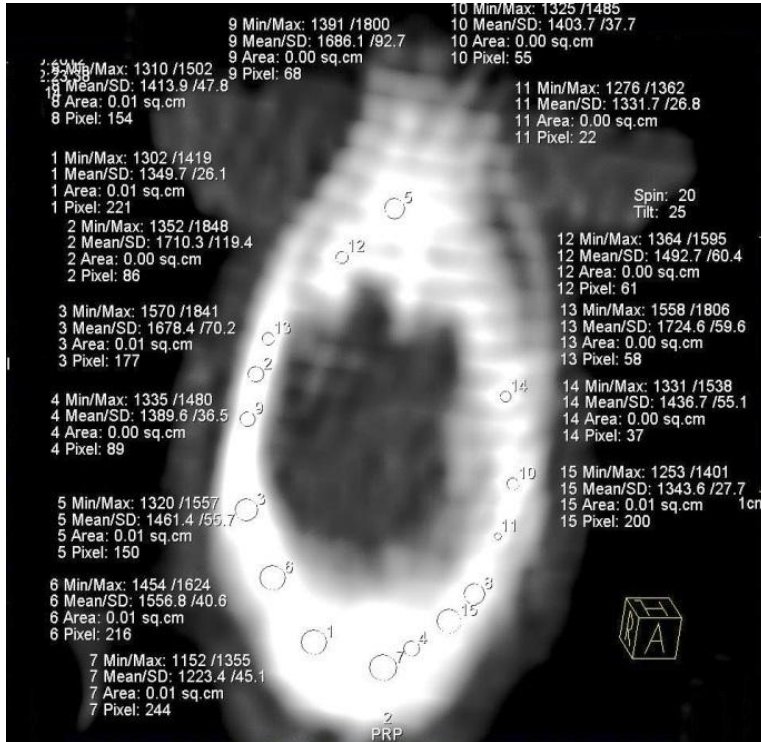
Yeni oluşan kemiğin yoğunluğunu, 8. hafta sonunda tüm grupların deneklerinin defektleri için tek tek belirlendi. Grup-1’de ortalama değer $453,88 \pm 31,93$ HU, Grup -2’de

458,75±16,20HU, Grup-3'te 481,88±20,88 HU ve Grup-4'te 485,25±16 olarak tespit edildi.

Ancak yapılan karşılaştırmada gruplar arasında Hounsfield Unit olarak ölçülen dansite değerlerinde anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil-41: Grupların dansite ortalamaları



Şekil-42: Normal kemik dansitesinin ölçümü

Ratlara ait normal kemikten rastgele yapılan ölçümlerde normal kemik dansitesi 1480,18 HU olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik greftleri kemik defektlerin onarımında kullanılan vazgeçilmez yapılardır. Ancak her zaman tam istenilen boyutta elde edilmesi mümkün olmayabilir. Biz bu çalışma ile TZP eklenmiş kemik toz ve parçalarının TZP eklenmiş bütün kemik greftine ne kadar benzediğini ve TZP eklenmiş periosttan ne kadar farklı olduğu araştırmak istedik.

Kemik iyileşmeye olumlu katkısı olduğu bilinen TZP tüm gruplara aynı miktarda uygulanmış olması sebebiyle TZP hakkında bu çalışmada yorum yapılamaz.

Yapılan histolojik değerlendirmede sonucu hiç bir grupta yeni kemik oluşumu görülmediği gibi aksine mevcut kemik tozlarının dejenerasyonu ve kemik parçalarında rezorbsiyon görüldü. Kemik doku stabil yapıda ve zor çoğalan bir dokudur. Sakrifikasyon süresi olan 8 hafta az gibi görünse de ratların hızlı yapım-yıkım döngüsü göz önüne alındığında bu greft tutmasını değerlendirme için yeterli bir süredir.

Deneklere ait kemik doku spiküllerinin tek tek ölçülmesi ile konulan bu otolog greftlerin canlı kalabilme kapasitesi kıyaslanabilir. Buna göre kemik tozlarının olduğu grupta ölçülebilecek canlı kemik dokular bulunsa da bunlar konulduğu boyuta göre küçülmüştü ve bu grup hiç kemikleşmenin olmadığı gruba benzerdi ($p>0,05$). Kemik parçalar ise tüm kemik grefti kadar iyi bir iyileşmeyi gerçekleştirdi ($p>0,05$). Kemik parçalarda da küçülmeler gözlemlendi ve tüm bu küçülmeler rezorbsiyonun bir göstergesi olarak yorumlandı.

Dikkat edilmesi gereken bir husus da yine kemiğin tamamen toz haline getirilmeden konduğu gruplarda (Grup-3,4'te) kemiğin canlılığını koruması ve sert biyolojik kalkan olarak görev yapabilmiş olmasıdır.

Runx-2 özellikle endokondral kemikleşme sırasındaki kemik formasyonunda etkili olan, fosfolipid bağımlı serin ve treonine a spesifik bir enzimdir ve mutasyonunda çocuklarda Kledikranial Displazi görülür.(43) Runx-2 esas olarak osteoblastik farklılaşma belirteçidir ve erken osteojenik farklılaşma için kritiktir. (44) Sp7 (Osterix) ise osteoblast farklılaşması için gerekli transkripsiyonel aktivatördür ve Sp1 transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. (40)Mezenkimal hücrelerin osteoblasta farklılaşmasında görev alır. Osterix ekspresyonu kemik formasyonu için elzemdir.(41). Grup-1 ile Grup-2 arasında Runx-2 ve Sp7 ekspresyonu açısından fark olmaması osteoblastik farklılaşma açısından benzer olduklarını gösterir.

Grup-1 ve Grup-2 ile Grup-3 ve Grup-4 ile arasında fark olması, fakat Grup-3 ile Grup-4 arasında fark olmaması, sadece TZP olan gruptaki (Grup-1) ve TZP+kemik tozlarının olduğu gruptaki (Grup-2) iyileşmenin Grup-3 ve 4'ten geride olduğunu gösterir. Grup-3 ile Grup-4'in ikili karşılaştırılması sonucu arasında fark bulunamaması kemik parçalarının da bütün kemik grefti kadar yaşayabilir olduğunu göstermektedir. Anti-Sparc boyanma sonucu Hiç kemik dokunun olmadığı Grup-1 ile Grup-3 ve Grup-4 arasında istatistiksel açıdan fark bulundu ($p<0,05$), ancak Grup-2 ile Grup-3 ve Grup-3 ile Grup-4'ün birbiriyle kıyasında fark yoktu ($p>0,05$). Kemik matriks yapımının canlı kemik dokusu ile direkt orantılı olmadığını ancak canlı kemik doku büyüdükçe artması ise matriks yapımının büyük kemiklerde daha çok olduğunu gösterir.

Radyolojik alan ölçümlerinde ise 8. haftada ise Grup-3 ve Grup-4'ün Grup-1 ve Grup-2'den daha iyi iyileştiği gözlenmiştir ($p<0,05$). Yapılan karşılaştırmada gruplar arasında Hansfield Unit olarak ölçülen dansite değerlerinde anlamlı fark bulunmamıştır.

Tam kalınlıktaki defekte yerleştirilen kemik parçasının kemik iyileşmesindeki yeri tam anlayamamıştır. Gruplar arası farklılık en çok Grup-2'den Grup-3'e geçerken yaşanmıştır. Bunun sebeplerinden biri kemik tozu elde edilmesi sırasında termal hasar meydana gelmesi olabilir. Bir diğer neden ise kemik tozunun daha çok makrofaj rezorpsiyonuna ve yabancı cisim reaksiyonuna maruz kalması olabilir. Clune ve arkadaşları kemik parçalarının makrofajlar ile rezorbe edilemeyecek kadar büyük olduğunu ve osteoindüksiyon için bir iskele görevi görebileceğini iddia etmişlerdir.(45) Aynı zamanda bu kemik parçalarındaki osteoblastlar daha az ısıya maruz kaldıklarından daha çok oranda canlı kalmış ve etkili olmuş olabilirler.(45) Ayrıca daha çok kansellöz kemik içermesi angiogeneze izin verdiğinden de olabilir.(46) Yine Hassanein ve arkadaşları kemik parçalarının osteoblast dahil yaşayan canlı hücreler içerdiğini ve böylelikle osteogenezisi sağladıklarını iddia etmişlerdir.(47)

Grup-1 ve Grup-2 'de diğer gruplar kadar iyi sonuç elde edilememiş olması, sadece TZP ve kemik tozu +TZP'nin yeterli olmadığını en azından kemik parçasının iyileşme için gerektiğini göstermektedir. Kemik parça ve bütün kemik greft arasında fark olmaması ise iyileşme için küçük kemik parçalarında yeterli olduğunu göstermiştir.

Kök hücre çalışmaları ve doku mühendisliği ilerlemesine rağmen kemik doku için kemik parçalar kullanılabildiği durumlarda başka yollara başvurmak hem pahalıya mal olacak hem de fizyolojik olmayacaktır.

6. ÖZET

Kranial kemik rekonstrüksiyonu özellikle çocuklarda zor bir işlemdir. Alloplastik materyaller bunun için kullanılıyor olsa da otolog kemik greftleri halen en iyi seçenektir. Trombosizitten zengin plazma (TZP) kemik kırığı iyileşmesinde, kemik yapımında ve yara iyileşmesinde etkisi olduğu bilinen bir üründür. Bu çalışmanın amacı kemik formasyonu ve kemik greft yaşayabilirliği açısından TZP eklenmiş periost, kemik tozları kemik parçaları ve bütün kemik greftini birbiri ile kıyaslamaktır.

Kritik boyutta kemik defekti açılan 32 adet rat 4 gruba ayrıldı. Gruplara sırasıyla TZP, TZP+kemik tozları, TZP+kemik parçaları, TZP+ bütün kemik grefti uygulandı. Tüm gruplar 8. Haftada sakrifiye edildi. Histolojik(rezorbsiyon, yabancı cisim reaksiyonu, osteoblastik farklılaşma için immünohistokimya) ve radyolojik (2-5 ve 8. haftalarda çekilen ince kesit tomografi ile defekt alan ölçümü ve kemikleşen alanların dansite ölçümü) parametrelerle kıyaslamalar yapıldı. Yapılan değerlendirmeler sonucu Grup-1 ve Grup-2'nin benzer ve Grup-3 ile Grup-4'ün benzer olduğu anlaşıldı. TZP eklenmiş kemik tozlarının olduğu grup olan Grup-2, hiç kemik dokunun olmadığı sadece TZP'nin olduğu Grup-1'e benziyordu. TZP eklenmiş kemik parçaları (Grup-3) ise TZP eklenmiş bütün kemik grefti grubuna (Grup-4) benziyordu. Sonuç olarak TZP eklenmiş kemik parçalarının TZP eklenmiş bütün kemik grefti kadar iyi canlılığını koruduğu ve TZP eklenmiş kemik tozlarının ise rezorbe olup kemik olarak görev yapmadığı anlaşıldı.

7.ABSTRACT

Cranial bone reconstruction is a challenging surgery especially in children. Also alloplastic materials can be used; autogenously bones are the best option. Platelet rich plasma is a well known agent for bone fracture healing, bone formation and also wound healing. The aim of this study was to compare the bone formation and bone viability between PRP added periost, bone dust, bone fragments and whole bone graft.

Critical-size cranial bone defects were created in the parietal bones of 32 rats, which had been studied in 4 groups: Only PRP (Group-1), bone dust+PRP(Group-2), bone fragment+PRP (Group-3), and whole bone+PRP(Group-4). All groups were sacrificed during the 8th week. Histological parameters (resorbtion, foreign body reaction, length of live bone, immunohistochemistry for osteoblastic differentiation) and radiologic parameters (defect areas of cranium measured by thin-section CT at 0th, 2nd, 5th and 8th week and density of bone) were compared.

Considering bone spicule length and immunohistochemical study Group-3 and Group-4 were the best groups in terms of graft viability ($p < 0, 05$). Group-1 and Group-2 was statistically same. According to the 8th week tomography recovery of cranial defects in Group-3 and Group-4 were faster than Group-1 and Group-2 ($p < 0, 05$).

Critical-size defects treated with PRP added bone fragment and PRP added whole bone graft had more ossification compared PRP added bone dust and PRP added periosteum ($p < 0, 05$). There were no difference between PRP added bone dust and PRP added periosteum ($p > 0, 05$). These findings support that PRP added whole bone and PRP added bone fragments can be used to obtain new bone but neither the PRP added bone dust nor the PRP itself can create new bone.

KAYNAKLAR

1. H. D. Kritik Boyutlu Ve Kritik Boyutlu Olmayan Defektler. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi. 2003;6(1):60-3.
2. Keskin M, Kelly CP, Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Yarim M, Kaplan S, et al. Repairing critical-sized rat calvarial defects with a periosteal cell-seeded small intestinal submucosal layer. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;122(2):400-9. Epub 2008/07/16.
3. Greene AK, Mulliken JB, Proctor MR, Rogers GF. Pediatric cranioplasty using particulate calvarial bone graft. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;122(2):563-71. Epub 2008/07/16.
4. Marx RE GA. *Dental and Craniofacial Applications of Platelet-Rich-Plasma*. 1 ed. Carol Stream, Illinois: Quintessence Publishing Co.; 2005.
5. Sanchez M, Anitua E, Cugat R, Azofra J, Guadilla J, Seijas R, et al. Nonunions treated with autologous preparation rich in growth factors. *Journal of orthopaedic trauma*. 2009;23(1):52-9. Epub 2008/12/24.
6. Atik OŞ. Trombositten zengin plazma tedavileri arkasındaki kanıtlar güçlü müdür? *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi*. 2012;23(1):1.
7. Junqueira LC CJ. *Basic Histology Text&Atlas*. 11 ed. New York: McGraw-Hill; 2005.
8. Young B HJ. *Wheater's Functional Histology* 4ed. London: Churchill Livingstone; 2000.
9. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. *Cell*. 1997;89(5):747-54. Epub 1997/05/30.
10. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & development*. 1999;13(8):1025-36. Epub 1999/04/24.
11. Tu Q, Valverde P, Li S, Zhang J, Yang P, Chen J. *Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone*. *Tissue engineering*. 2007;13(10):2431-40. Epub 2007/07/17.
12. Komori T, Nomura J, Inoue K, Kitayama I. *Tyrosine hydroxylase activity in discrete brain regions of depression model rats*. *The Japanese journal of psychiatry and neurology*. 1990;44(4):747-54. Epub 1990/12/01.
13. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, et al. *NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation*. *Nature medicine*. 2005;11(8):880-5. Epub 2005/07/26.
14. Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM. *A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing*. *Clinical orthopaedics and related research*. 2008;466(8):1777-87. Epub 2008/05/30.
15. Glowacki J, Mulliken JB. *Demineralized bone implants*. *Clinics in plastic surgery*. 1985;12(2):233-41. Epub 1985/04/01.
16. Costantino PD, Hiltzik D, Govindaraj S, Moche J. *Bone healing and bone substitutes*. *Facial plastic surgery : FPS*. 2002;18(1):13-26. Epub 2002/02/02.
17. Nurden AT. *Platelets, inflammation and tissue regeneration*. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105 Suppl 1:S13-33. Epub 2011/04/12.

18. Hamad OA, Back J, Nilsson PH, Nilsson B, Ekdahl KN. Platelets, complement, and contact activation: partners in inflammation and thrombosis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;946:185-205. Epub 2011/09/29.
19. Italiano JE, Jr., Battinelli EM. Selective sorting of alpha-granule proteins. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7 Suppl 1:173-6. Epub 2009/07/28.
20. Jedlitschky G, Greinacher A, Kroemer HK. Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy. *Blood*. 2012;119(15):3394-402. Epub 2012/02/18.
21. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews*. 2009;23(4):177-89. Epub 2009/05/20.
22. Gunay-Aygun M, Huizing M, Gahl WA. Molecular defects that affect platelet dense granules. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2004;30(5):537-47. Epub 2004/10/22.
23. Polasek J. Lysosomal concept of platelet secretion--revisited. *European journal of haematology Supplementum*. 1989;50:3-24. Epub 1989/01/01.
24. Kiwanuka E, Junker J, Eriksson E. Harnessing growth factors to influence wound healing. *Clinics in plastic surgery*. 2012;39(3):239-48. Epub 2012/06/27.
25. Roth DA, Gold LI, Han VK, McCarthy JG, Sung JJ, Wisoff JH, et al. Immunolocalization of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 and insulin-like growth factor I in premature cranial suture fusion. *Plastic and reconstructive surgery*. 1997;99(2):300-9; discussion 10-6. Epub 1997/02/01.
26. Cuce G, Kalkan SS, Esen HH. Evaluation of TGF beta1 expression and comparison the thickness of different aorta layers in experimental diabetes. *Bratislavske lekarske listy*. 2011;112(6):318-22. Epub 2011/06/23.
27. Zhang F, Liu H, Stile F, Lei MP, Pang Y, Oswald TM, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. *Plastic and reconstructive surgery*. 2003;112(6):1613-9. Epub 2003/10/28.
28. Taub PJ, Silver L, Weinberg H. Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factor as gene therapy for angiogenesis. *Plastic and reconstructive surgery*. 2000;105(3):1034-42. Epub 2000/03/21.
29. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewicz MJ, Nahai F, Schultz G. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plastic and reconstructive surgery*. 1991;88(2):189-94; discussion 95-6. Epub 1991/08/01.
30. Balakrishnan C. Topical application of epidermal growth factor. *Plastic and reconstructive surgery*. 1996;98(1):185. Epub 1996/07/01.
31. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Woodward SC. Epidermal growth factor increases granulation tissue formation dose dependently. *The Journal of surgical research*. 1987;43(4):322-8. Epub 1987/10/01.
32. Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R, Jensen J, Wamsley S, Waugh JM, et al. Augmentation of adipofascial flaps using the long-term local delivery of insulin and insulin-like growth factor-1. *Plastic and reconstructive surgery*. 2000;106(2):373-82. Epub 2000/08/18.
33. Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R, Wamsley S, Jensen J, Boutros S, et al. Increased free fat-graft survival with the long-term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-I, and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres. *Plastic and reconstructive surgery*. 2000;105(5):1712-20. Epub 2000/05/16.
34. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;118(6):147e-59e. Epub 2006/10/20.

35. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2004;62(4):489-96. Epub 2004/04/16.
36. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry*. 2001;10(4):225-8. Epub 2002/01/30.
37. Garg A. The platelet: uses in dentistry. *Dental implantology update*. 2011;22(8):57-62. Epub 2011/09/08.
38. Valbonesi M, Giannini G, Migliori F, Dalla Costa R, Galli A. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. *The International journal of artificial organs*. 2002;25(4):334-8. Epub 2002/05/25.
39. 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. *Journal of vascular surgery*. 1991;14(4):526-32; discussion 32-6. Epub 1991/10/01.
40. Baumhoer D, Smida J, Nathrath M, Jundt G. The nature of the characteristic cementum-like matrix deposits in the walls of simple bone cysts. *Histopathology*. 2011;59(3):390-6. Epub 2011/11/01.
41. Song HM, Sahar DE, Fong KD, Nacamuli RP, Fang TD, Mathy JA, et al. In vitro murine posterior frontal suture fate is age-dependent: implications for cranial suture biology. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004;113(4):1192-204. Epub 2004/04/15.
42. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(3):480-8. Epub 2012/01/18.
43. Mundlos S. Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *Journal of medical genetics*. 1999;36(3):177-82. Epub 1999/04/16.
44. Heller JB, Gabbay JS, Wasson K, Mitchell S, Heller MM, Zuk P, et al. Cranial suture response to stress: expression patterns of Noggin and Runx2. *Plastic and reconstructive surgery*. 2007;119(7):2037-45. Epub 2007/05/24.
45. Clune JE, Mulliken JB, Glowacki J, Rogers GF, Arany PR, Kulungowski AM, et al. Inlay cranioplasty: an experimental comparison of particulate graft versus bone dust. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010;126(4):1311-9. Epub 2010/10/05.
46. Chen NT, Glowacki J, Bucky LP, Hong HZ, Kim WK, Yaremchuk MJ. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. *Plastic and reconstructive surgery*. 1994;93(4):714-22; discussion 23-4. Epub 1994/04/01.
47. Hassanein AH, Arany PR, Couto RA, Clune JE, Glowacki J, Rogers GF, et al. Cranial particulate bone graft ossifies calvarial defects by osteogenesis. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;129(5):796e-802e. Epub 2012/05/01.