

T.C. KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

GİNKGO BİLOBA (EGB 761)'NİN SIÇANLARDA
KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Nizamettin GÜZEL

Trabzon-2011

T.C. KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

GİNKGO BİLOBA (EGB 761)'NİN SIÇANLARDA
KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Nizamettin GÜZEL

Tez danışmanı: Prof. Dr. Osman AYNACI

Trabzon-2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. MATERYAL VE METOD	21
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇLAR	56
7. TÜRKÇE ÖZET	58
8. İNGİLİZCE ÖZET	59
9. KAYNAKLAR	60

1. GİRİŞ

Kırık; kemiğin anatomik bütünlüğünün tam ya da kısmen bozulması ve çevre dokulardaki sorunları da içeren patolojik bir durumdur. Artan teknolojiye paralel olarak insan ömrü uzamakta ancak kazaların şiddeti de artmaktadır. Yaşlı nüfusun çoğalması da eşlik eden osteoporoz gibi metabolik hastalıklar nedeniyle kırık görülme sıklığında artışa neden olmaktadır. Kırık iyileşmesindeki aksaklıklar, önemi gitgide artan bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu durum hastanın hem ruh halini olumsuz etkilemekte hem de iş gücü ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmalar daha çok kırık iyileşmesini hızlandırmak üzerine yoğunlaşmaktadır. Kırık tedavisinde ana hedef hastanın bir an önce iyileştirilmesi ve günlük yaşantısına geri dönebilmesidir.

Ginkgo biloba ekstresi (EGb 761); piyasada hali hazırda ilaç olarak bulunmakta olup PAF (platelet aktive edici faktör) inhibitörü olması, antioksidan özelliklerinin bulunması ve serbest oksijen radikallerini ortamdan uzaklaştırarak vasküler gevşeme (relaksasyon) sağlaması, kan dolaşımını arttırması nedeniyle özellikle iskemik hastalıklarda (demans, vertigo, tinnitus, klidikasyo intermitans v.s.) tedavi amacıyla kullanılmaktadır (1-3).

Kan dolaşımını artıran Ginkgo biloba'nın ek olarak dokuda oluşan iskemik ve reperfüzyon hasarının önlenmesinde de PAF antagonisti olması ve antioksidan özellikleri nedeniyle etkili olduğu bulunmuştur (4-6). Ayrıca periferik arter hastalığı olan hastalarda Ginkgo biloba'nın ağrısız yürüme mesafesini arttırdığı gösterilmiştir (7).

Kırık bölgesindeki kan dolaşımını kırık iyileşmesini doğrudan ve olumlu yönde etkilemektedir (8-10). Kırık iyileşmesi sürecinde damar yenilenmesi, mevcut kan damarlarının tomurcuklanmasıyla olur ve kanla beslenme yeterli olursa, osteoblastlar (kemik yapıcı hücreler) kallus içinde normal kemik gelişimine elverişli matriksi sağlamış

olur. Dolayısıyla sert kallus (kemik kallus) dokusu gelişimi için damarlanma ve oksijenizasyon şarttır (11,12). Kırık bölgenin oksijenizasyonu kırık iyileşmesinin en önemli etkenlerinden biridir. Örneğin günde 2 saat kadar 2-3 atmosfer basınçta oksijen uygulanmasının kırık iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür (13).

Bu çalışmada daha önce literatürde yer almayan Ginkgo biloba'nın kırık iyileşmesi üzerine etkisinin radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKUSU VE HİSTOLOJİSİ

Kemik doku; canlı, oldukça iyi kanlanan ve innervasyona sahip, yapım ve yıkımın aynı anda olduğu, mineralize bir bağ dokusudur. Sert, aynı zamanda esnek ve kendine özgü büyüme mekanizması olan, kendi kendini onarabilen ve yenileyebilen bir yapıdır (14).

Kemik ekstrasellüler matriksi kalsifiye olmuş özel bir bağ dokudur. Hayati organları dışarıdan sararak koruyup destek olur ve vücudun ana iskeletini oluşturur. Darbelere karşı kırıldak dokudan sonra en dayanıklı dokudur. Ayrıca kan hücrelerinin sentezlenmesi, kalsiyum (Ca^{+2}) ve fosfat (PO_4) gibi minerallerin depolanıp gerektiğinde salınması kemik doku sayesinde olur (14). Kemikler kalp kan çıkışının % 5-10'unu alır. Uzun kemikler başlıca 3 kaynaktan kanlanırlar ve beslenirler. Bunlar; besleyici (nutrisyonel) arterler, metafizyel arterler ve periostal arteriollerdir (15).

Kemik, hücreler arası kalsifiye matriks ve bu matriks içinde dizilim gösteren hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler; osteositler, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteoprogenitör hücrelerdir. Osteositler matriksin lakuna adı verilen boşluklarında yerleşmişlerdir. Kabaca kemik dokuyu idame ettirirler. Olgun kemikteki hücrelerin %90'ını osteositler oluşturur. Osteoblastlar, matriksin organik kısımlarının sentezini yaparlar. Osteoklastlar ise çok çekirdekli dev hücreler olup lizozomal enzimlerden zengindirler. Kemik dokusunun rezorpsiyonunu ve yeniden yapılanmasını sağlarlar (16).

Kemiğin dış yüzeyi; dışta sıkı bağ dokusu ve içte osteoprogenitör hücreleri içeren periosteum ile kaplıdır. Kemiğin iç boşluğu ise özel ince bir bağ dokusu olan,

osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlardan oluşan tek tabakalı endosteum ile örtülüdür (17).

2.1.1. Kemik Hücreleri

Kemiğin %2'sini oluşturur.

Osteoprogenitör hücreler:

Embriyonik mezankimal hücrelerden kaynaklanan ve kök hücrelerin özelliklerine (çoğalma ve farklılaşma) sahip olan hücrelerdir. Mitoza girme yeteneklerini devam ettirerek osteoblastlara farklılaşabilirler (17,18). Ayrıca düşük oksijen basıncı altındaki belli durumlarda bu hücreler kondrojenik hücrelere de farklılaşabilirler.

Osteoprogenitör hücre iğsi görünümlü olup, soluk boyanan oval çekirdeğe sahiptir. Soluk boyanan sitoplazması az sayıda granüllü endoplazmik retikulum (GER), az gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda serbest ribozom içerir. Osteoprogenitör hücreler, periosteumun iç tabakasında ve Havers kanallarını çevreleyen endosteumda bulunurlar (17). Bu hücreler, yaşam boyunca canlı kalarak; erişkinde kemik kırıklarının onarımı sırasında ve diğer hasarlarda yeniden aktive olurlar (18).

Osteoblastlar:

Osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerden köken alan; kemik matriksinin organik kısımlarının üretilmesinden sorumlu olan hücrelerdir (16,17). Yaklaşık 20 mikrometre çapındadırlar. Tip I kollajen ve kollajen olmayan proteinleri sentezlerler. Osteoblastlar tarafından salgılanan nonkollajen proteinler; osteoklastların farklılaşmasını düzenleyenler (nükleer faktör kappa B (RANK) aktivasyonu için reseptör ligandı (RANKL), makrofaj koloni stimule edici faktör (M-CSF), osteoprotegerin), kemik mineralizasyonu için gerekli olanlar (osteokalsin, osteonektin, osteopontin) ve osteoblastların ekstrasellüler matrikse integrinler aracılığıyla bağlanmasına aracılık eden kemik siyaloproteinleridir. Diğer yandan kemiğe inorganik kısımların çökebilmesi için de osteoblastların varlığı gereklidir (18).

Osteoblastlar, kemik yüzeylerinde tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar. Aktif olarak matriks sentezlerken, kübikden prizmatığe kadar değişen şekillerde olup, bazofilik

sitoplazmaya sahiptirler (16). Matriks sentezlemeye başladıklarında şekilleri kübikten prizmatığe kadar değişiklik gösterebilir. Alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi artar ve sitoplazmaları bazofilik hale gelir. Sentez işlemleri azaldıkça ALP aktivitesi azalır, sitoplazmalarının bazofilik özellikleri kaybolur ve yassılaşırlar.

Osteoblastların komşu osteoblastlarla temasını sağlayan sitoplazmik uzantıları vardır. Bu uzantılar, hücre kendi etrafını matriks ile sarmaya başladığı zaman daha belirgin hale gelir. Osteoblastlar matriks ile sarıldıklarında osteosit adını alırlar (17,18).

Hücre ve sitoplazmik uzantıların etrafında matriksin oluşması ile lakuna ve kanalcıklar daha da belirginleşir. Matriks sentezi sırasında osteoblastlar aktif olarak protein sentezi yaparlar ve salgırlar. Osteoblastlar kutuplaşmış hücrelerdir ve matriksin salgılanması, daha önce yapılmış kemik matriksi ile temas halinde olan osteoblast yüzeylerinden olur. Böylece yeni ancak henüz kalsifiye olmamış matriks, osteoblastlar ile daha önceden yapılmış olan kemik matriksi arasında yer alır. Bu olaya "kemik appozisyonu" denir ve zaman ilerledikçe Ca^{+2} tuzlarının çökmesi ile kalsifikasyon tamamlanır (17,18).

Osteositler:

Osteositler, osteoblastlardan farklılaşırlar ve matriks lamelleri arasında bulunan lakunalar içine yerleşmişlerdir. Yaklaşık 20-60 mikrometre boyutlarındadırlar. Her lakunada sadece bir osteosit yer alır. Komşu osteositler sitoplazmik uzantılarının birbirleri arasında yaptıkları oluklu bağlantılar (gap junction) ile iletişim kurup, besin maddelerinin hücreden hücreye geçişini sağlarlar. Osteositler ile kan damarları arasında yapılan moleküler alışveriş, osteositler ile kemik matriksi arasında bulunan çok az miktardaki ekstrasellüler madde vasıtasıyla da olur. Osteositler osteoblastlara göre yassı elips şeklindedir. Endoplazmik retikulumları ve Golgi kompleksleri küçülmüştür. Nükleer kromatinleri daha yoğundur. Bu hücreler kemik matriksinin devamlılığını sağlarlar. Osteositlerin ölümünden sonra matriks rezorpsiyonu izlenir (17,18).

Osteoklastlar:

Osteoklastlar; kemik iliğindeki monosit-makrofaj progenitör hücrelerden farklılaşan, çok çekirdekli, büyük ve hareket edebilen hücreler olup kemiğin rezorpsiyonundan

sorumludurlar (17,18). Yaklaşık 100 mikrometre çapındadırlar. Bu hücreler kemik rezorbsiyonun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış ve Howship lakunası adı verilen yuvalarda bulunurlar. Osteoklastlar kan kaynaklı monosit-makrofaj sisteminden meydana geldikleri için "mononükleer fagositer sistem"e dahil edilirler. Osteoklastlar ayrıca kalsitonin reseptörlerine de sahiptir. Bu reseptöre bağlanan kalsitonin, osteoklastı inaktifleştirir (19).

Osteoklastlar kemik matriksini rezorbe eden, asid, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgırlarlar. Böylece kalsifiye olmuş temel maddeyi serbest hale getirirler ve kemik rezorbsiyonu sırasında meydana gelen artıkların da ortadan kaldırılmasını sağlarlar. (19).

2.1.2. Kemik Matriksi

Kemik matriksi organik ve inorganik bileşiklerden oluşur.

İnorganik madde

Kemik matriksinin kuru ağırlığının yaklaşık %60-70'ini oluşturur. Özellikle Ca^{+2} ve fosfat (PO_4) başta olmak üzere bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum inorganik maddeler arasında bulunur. Ca^{+2} ve fosfat başlıca hidroksiapatit kristalleri ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)^2$) şeklinde bulunur (16,17).

Kemiğin sertliği ve gücü kollajen ile hidroksiapatit kristallerinin birlikteliğine bağlıdır. Eğer kemik dekalsifiye edilirse normal şeklini korur, ancak çok esnek olur. Aksine organik bölüm kemikten uzaklaştırılırsa kemik yine şeklini korur ancak kırılma eğilimi artar (17).

Organik Madde

Organik maddeler kemiğin kuru ağırlığının % 30-40'ını oluşturur. Tip I kollajen lifleri (% 95), kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asitten zengin proteoglikanları ve kollajen olmayan proteinleri içerir (18). Bu nonkollajen proteinlerin başlıcaları arasında; proteoglikanlar, osteonektin, osteokalsin, kollajen dışı matriks proteinleri, kemik morfojenik proteini, sialoprotein, büyüme faktörleri ve sitokinler sayılabilir. Kollajen kısım esas olarak Tip 1 kollajenden oluşur ve bu molekülün sonlanma bölgelerinde bulunan

boşluklara mineral birikimiyle kalsifikasyon sağlanır. Osteokalsin, matriks dışı organik proteinler arasında sayılır ve düzeyi kemik yapım ile yıkım olaylarının bir göstergesidir. Osteokalsin, Paratiroid hormon (PTH) tarafından inhibe edilir ve 1-25 dihidroksivitamin D tarafından aktive edilir (15).

Osteoblastlar tarafından sentezlenen kemik glikoproteinleri (osteokalsin, osteopontin ve osteonektin) matriks kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumludurlar (18). Bu glikoproteinleri içermeyen ancak Tip I kollajen içeren diğer dokular normal olarak kalsifiye olmazlar (16).

2.1.3. Periosteum ve Endosteum

Kemiğin iç ve dış yüzeyleri; kemik yapan hücreler ve bağ dokusundan oluşan, endosteum ve periosteum olarak adlandırılan tabakalar ile örtülüdür :

Periosteum; dış ve iç olmak üzere iki tabakadan oluşur. Dış tabaka; kollajen liflerden, fibroblastlardan oluşur ve kan damarlarından zengin bir yapıya sahiptir. Dış tabakadaki kollajen lif demetlerinden oluşan Sharpey lifleri matriks içine girerek periosteumu kemiğe bağlar. Periosteumun içte bulunan ve hücreden zengin olan tabakası; fibroblastlara benzeyen, farklılaşarak osteoblastları meydana getirme potansiyeline sahip osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır (16,18).

Endosteum; kemiğin içindeki bütün boşlukları örter ve osteoprogenitör hücreler ile çok az miktarda bağ dokusundan oluşur. Endosteum periosteumdan daha incedir. Periosteum ve endosteumun temel görevleri; kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan osteoblastları kesintisiz olarak sağlamaktır. Bu nedenlerle kemik cerrahisinde periosteum ve endosteumun mümkün olduğunca korunmasına çok dikkat edilir (16,18).

2.2. KEMİĞİN OLUŞUMU

Kemik iki yolla şekillenir; osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan mineralizasyonu ile (intramembranöz) kemikleşme ya da daha önce var olan kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin çökmesi ile (Enkondral) kemikleşme (16-18).

Bu her iki çeşit kemikleşmede de, ilk oluşan kemik dokusu, primer veya olgunlaşmamış kemik dokusudur. Primer (olgunlaşmamış-örgülü) kemik dokusu geçicidir ve bir süre sonra sekonder (olgun-lamelli kemik) kemik dokusu ile yer değiştirir. Büyüme sürecinde, primer kemik bölgeleri, rezorbe olan bölgeler ve lamelli kemik yan yana bulunur. Kemik yapımı ve yıkımı (yeniden yapılanma) sadece büyüyen kemiklerde görülmez, yetişkinlerde de hızını azaltarak hayat boyu devam eder (16-18).

2.2.1. İntramembranöz Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşmede kıkırdak bir model yoktur. Bağ doku desteğiyle matriksin doğrudan doğruya kalsifikasyonu ile oluşur. Yassı kemiklerin embriyolojik gelişiminde rol alır. Yassı kemiklerin oluş mekanizması olan “intramembranöz kemikleşme”ye, mezankimal doku içinde olduğu için bu ad verilmiştir. İntramembranöz kemikleşme kısa kemiklerin büyümesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında rol oynar (20,21). Doğumdan sonra, kemik defektlerinin rejenerasyonu ve kırık onarımında yeniden aktive olur (20). Distraksiyon osteogenezisi sırasındaki kemik yapımı da kıkırdak model olmaksızın vaskülarize kollajen matriksten doğrudan doğruya gerçekleşir (21,22).

Membran halinde, farklılaşmamış mezankimal hücrelerin birikmesi ile süreç başlar. Bu mezankimal hücreler; kan damarları, fibroblastlar ve osteoprogenitör hücreleri içeren organik matriksi sentezlerler. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşür ve osteoblastlar da daha sonra mineralize olacak olan organik kemik matriksini biriktirir. Bu matriksin yüzeyini osteoblastlar kaplar ve hızla yeni kemik matriksi ilave ederler. Matriksle çevrelenen osteoblastlar, osteositlere dönüşür. Oluşan osteoid matriks mineralize olarak olgun kemik halini alır (21).

2.2.2. Enkondral Kemikleşme

Mineralize kıkırdağın, taslak olarak kullanılıp kemik dokuya çevrilmesiyle oluşur (20). Embriyolojik hayatta uzun kemiklerin yapımı bu şekilde gerçekleşir (20,21). Uzun kemik, kısa kemik ve epifiz kemikleşme merkezlerinin oluşumundan sonra enkondral kemikleşme iskelet olgunlaşana kadar fizis ve epifizde devam eder (21). Doğumdan sonra katı tespit yapılmayan koşullardaki kırık iyileşmesinde rol alır (20,21).

Enkondral kemikleşme, öncelikle farklılaşmamış hücrelerin bir araya gelerek kondrositlere farklılaşması ve kıkırdak matriksi sentezlemesiyle başlar. Bazı bölgelerde kıkırdak matriks mineralize olurken, kondrositler genişler, damarlardan kıkırdağa doğru invazyon olur ve kan yoluyla gelen hücreler kıkırdağın merkezini rezorbe ederek medüller boşluğu oluştururlar. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşür ve mineralize kıkırdakta osteoid matriksi oluştururlar. Daha sonra osteoklastlar bu kalsifiye kıkırdak ve olgunlaşmamış kemiği rezorbe eder. Osteoblastlar rezorbe olan kalsifiye kıkırdak ve olunlaşmamış kemik karışımının yerine olgun lameller kemiği oluşturur (21).

2.2.3. Kalsifikasyon Mekanizması

Henüz kalsiyum fosfatın kemik matriksi üzerine çökmesini tam olarak açıklayabilen, genel olarak kabul görmüş bir hipotez yoktur. Ancak kalsifikasyonun, Ca^{+2} tuzlarının kollajen fibriller üzerine çökmesi ile başladığı varsayılmaktadır. Bunu proteoglikanlar ve glikoproteinler (osteonektin) başlatır. İntrasitoplazmik veziküller içinde Ca^{+2} tuzlarının çökmesi osteoblastların yardımı ile hızlandırılıp yoğunlaştırılır ve gerektiğinde ekstraselüler aralığa salgılanması sağlanır. Ayrıca kemikleşme yüzeylerinde bulunan ve osteoblastlar tarafından üretilen alkalen fosfataz (ALP), henüz bilinmeyen bir yolla kalsifikasyona yardımcı olur(14).

2.3. KEMİĞİN BÜYÜMESİ VE YENİDEN ŞEKİLLENMESİ

Kemiğin büyümesi, daha önce oluşmuş dokunun bir bölümü yıkılırken (rezorpsiyon) aynı anda diğer bir bölümün yapımı (apozisyon) ile oluşur. Kemik yapım miktarı kemik kaybından daha fazladır. Böylece kemik büyürken aynı zamanda yapısı da korunmuş olur. Çocuklarda kemiğin yeniden yapılanması daha hızlıdır (21,22).

Uzun kemiklerin büyümesi oldukça karmaşık bir olaydır. Epifizler, kıkırdağın radial (ışınsal) büyümesini izleyip, enkondral kemikleşme yolunu takip ederek boyutlarını arttırmırlar. Bu yolla, epifizdeki spongioz kısımlar artar (21,22).

Diafiz silindirik şeklinde bir kemikten ibarettir. Epifizlerin hızlı büyümeleri nedeniyle, ekstremitelerin diafizleri çabucak büyür ve diafiz shaftı tarafından ayrılan iki diafiz hunisi oluşur (21,22).

Diafiz şaftının boyu, epifizyal plağın osteojenik aktivitesi ile, eni ise kemik kısmın dış yüzeyindeki periosteumun kemiği şekillendirmesi ile artar. Bu sırada kemik iliği kavitesinin çapındaki artma ile kemik iç yüzden uzaklaştırılır. Endosteumun osteojenik aktivitesi sebebiyle her iki diafiz hunisinin iç yüzeylerinde kemik depozisyonu oluşur. Aynı zamanda, kemik dış yüzeyi üzerindeki karşıt alanlardan rezorbe olur. Böylece diafiz hunilerinin dar kısımları zamanla silindirik hale gelir. Bu genelde epifiz plağının osteojenik aktivitesine bağlıdır. Bu işlem sonunda, silindirik diafizyal şaftın uzunluğu artar ve iki diafiz hunisi kemik büyüdükçe birbirinden uzaklaşır. Daha sonra diafiz hunilerinin silindirik kısımlarındaki endosteumun, osteojenik faaliyeti sona ererek kemik iliği boşluğunun çapı korunur veya çok az rezorbe olarak bir miktar daha genişler (21,22).

Sonuçta, uzun kemikler, epifizyal plaklardaki faaliyet sonucu uzarlar ve periosteal apozisyonla da genişlerler. Epifizyal kırıldak büyümesi sona erdiğinde, yerini kemiğe bırakır. Epifizlerin kapanmaları yaklaşık 20 yaş civarında olur. Bundan sonra artık kemik boyuna uzayamaz fakat enine büyüyebilir (21,22).

2.4. KIRIK TANIMI

Kırık; kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte çevre yumuşak dokuları da olumsuz yönde etkileyen patolojik bir olaydır. Kırıklar, bu duruma neden olan kuvvetlerin şiddetine ve kemiğin bu şoku absorbe edebilme yeteneğine göre küçük bir çatlaktan (fissür), bir veya birçok kemiğin kırılmasına ve hatta komşu eklemlerde çıkık oluşturabilmesine (kırıklı-çıkık) kadar değişiklik gösterebilirler. Kırığı oluşturan kuvvet sadece kemik dokuyu etkilemekle kalmaz, etrafındaki yumuşak dokuları (deri, kaslar, tendonlar, ligamentler, damarlar, sinirler) ve hatta komşuluğundaki organları da hasara uğratabilir (23).

Kırığı oluşturan nedenler ile kırık bölgesi yaşlara göre farklılık gösterir. Yeni doğan döneminde doğum travmaları, çocuklarda düşme, dayak ve trafik kazaları, gençlerde spor ve trafik kazaları, orta yaşlarda trafik ve iş kazaları ve ileri yaşlarda düşmeler ve tümöral olaylar kırık oluşturan başlıca nedenlerdir. Yeni doğanlarda doğum travmasına bağlı olarak en çok klavikula, femur cismi ve humerus kırılır. Çocuklarda humerus suprakondiler kırıkları başta olmak üzere dirsek çevresi ve önkol kemikleri ile femur cisim kırıkları sık görülür. Genç ve orta yaşlarda tibia, femur ve radius distali en çok kırılan kemiklerdendir.

İleri yaşlarda femur boynu, trokanterik bölge, humerus proksimali ve radius distali en çok kırık görülen bölgelerdendir (20,24).

2.4.1. Kırık Belirti ve Bulguları

Travmaya ait genel belirti ve bulgular; ağrı, duyarlılık, hematoma, ekimoz ve işlev bozukluğudur (25).

Kırığa özgü belirti ve bulgular ise; hastanın duruşunda bozukluk, deformite, krepitasyon ve anormal harekettir (25).

2.5. KIRIK İYİLEŞMESİ (KAYNAMASI)

Kırık iyileşmesi iç içe geçmiş üç evreden oluşur. Bu evreleri olumlu ya da olumsuz etkileyen ve kontrol eden bir çok etken vardır.

2.5.1. Kırık İyileşmesinin Evreleri

Kırık iyileşmesi; diğer dokuların iyileşmelerinden farklı olarak, kemiğin skar dokusu bırakmadan yapı ve işlev olarak ilk haline en yakın şekilde kendini onarmasıyla oluşur. Bu tamir süreci oldukça karmaşık ve aynı zamanda oldukça düzenli basamaklardan meydana gelmektedir. Bu süreçteki birçok biyokimyasal ve hücreyel olay, gelişim sırasında büyüme plaklarındaki olaylarla paralellik göstermekle beraber, kırık iyileşmesindeki bu süreç iyileşme ile sınırlıdır ve süreklilik göstermez (26).

Kırık iyileşmesinin temelde 2 tipi vardır (26-28):

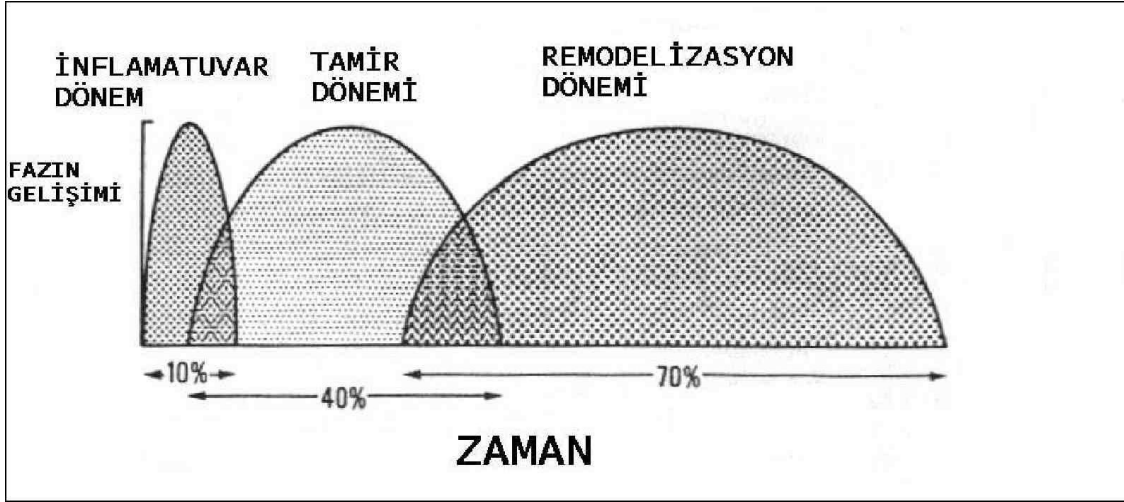
- I. Primer (direkt) kırık iyileşmesi
- II. Sekonder (indirekt) kırık iyileşmesi

Primer kırık iyileşmesi anatomik olarak redükte edilmiş ve katı tespit uygulanmış durumlarda gerçekleşmekle beraber sekonder tipe göre daha nadirdir.

Sekonder kırık iyileşmesi ise anatomik olmayan redüksiyonlar ve katı olmayan tespit sonrası kendiliğinden oluşmakta olup kırık iyileşmesinin çok büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Doğal seyir bu yolla olan iyileşmedir.

Kırık iyileşmesi klasik olarak 3 basamakta gerçekleşir (Şekil 1) (26,29):

- I. İnflamasyon (yangı) dönemi
- II. Reperasyon (onarım) dönemi
- III. Remodelasyon (yeniden yapılanma) dönemi



Şekil 1. Kırık iyileşmesi dönemleri

Bu dönemler kesin sınırlarla ayrılmayıp birbiri içine giren basamaklar şeklinde gerçekleşir. Kendi içlerinde gerçekleşen hücresel aşamalara göre; hematoma oluşumu-inflamasyon-anjiogenezis-yumuşak ve sert kallus gelişimi-remodelasyon (yeniden yapılanma) arkı olarak daha ayrıntılı basamaklarla da tanımlanabilir (27).

Kırık iyileşmesinde; medüller kanal ile kırık uçları arasındaki interkortikal alan, periost ve subperiosteal alan, çevre yumuşak dokular oldukça önemli dört bölgeyi oluşturur (26,27). Periost ve çevre yumuşak dokular intramembranöz kemikleşme ile kırığı çevreleyen sert kallusu oluştururken, eş zamanlı olarak medüller kanal ve interkortikal alan ise endokondral kemikleşme için öncü olan yumuşak kallusu oluştururlar (27).

1- Yangı (İnflamasyon) evresi (1-4 gün):

Kemiğin kırılmasıyla sadece kemik değil; kan damarları, kas ve periosteum gibi yumuşak dokular da zarar görür ve kırık bölgesinde bölgesel bir kanama olur. Kırık uçları arasında, periosteum altında ve eğer periosteum yırtılmışsa etrafında hematoma oluşturan kanama bir süre sonra durur. Oluşan hematoma basıncı kırık uçlarının bir arada tutulmasına kısmen yardımcı olur (9,30,31).

Kırık hematomu onarım hücrelerinin göçünü kolaylaştıracak fibrinden oluşan bir iskeleti oluşturur. Ayrıca hematom içindeki trombositlerden, ölmüş veya zarar görmüş hücrelerden büyüme faktörü ve diğer proteinler salınır. Bunlar da kırık onarımında etkin olan hücre göçü, periostal hücre çoğalması ve matriksin sentezinde aracılırlar (9).

Kırık olduktan sonra görülen geçici arteriyoller daralmayı; arteriyol ve venüllerin genişlemesi izler. Vazodilatasyon ve plazma eksudasyonuna bağlı olarak kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur (9). Kemiğin Havers sistemleri arasında fazla anastomoz olmadığından kırık hattının her iki tarafında belirli bir mesafede kan dolaşımı durur. Buradaki osteositler piknotik hale gelir, lizise uğrar ve geride boş lakunalar kalır (9,17). Kırık bölgesindeki hematom 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Trombositlerden, ölmüş ve zarar görmüş hücrelerden serbest bırakılan inflamatuvar mediatörler de kan damarlarının genişlemesine ve plazma sızdırıp taze kırık bölgesinde akut ödem oluşmasına katkıda bulunurlar. İnflamatuvar hücreler, polimorf çekirdekli lökositler ve ardından makrofajlar ile lenfositler kırık bölgesine göç ederler. Bu hücreler ayrıca sitokinleri serbest bırakarak anjiyogenezi uyarır (31). Kırık alanını dolduran hematom, küçük kapillerler ve çevre yumuşak dokudan gelen fibroblastlarca doldurularak bir granülasyon dokusu oluşturulur (17).

2- Onarım (Reperasyon) evresi (2-40 gün):

Onarım evresi kırık iyileşmesindeki en önemli evre olup, hematomun organize olması ile başlar. Kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7 ila 12 gün sürer (9).

Oluşan hematomun organizasyonu genellikle kırık onarımının ilk basamağı olarak tanımlanır. Kırık sonrası oluşan hematom kaybının kırık tamirini yavaşlattığı gösterilmiştir. Bunun sebebi yukarıda da bahsedildiği gibi hematomun; tamir hücrelerinin migrasyonu için fibrin bir taslak sağlamasıdır (30).

Bu evrede; mezankimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip (pluripotent) hücreler, periosteumun iç tabakasındaki osteoprogenitör hücreler ve endosteumdaki osteoblastlar önemli rol oynarlar. Mezankimal hücreler çoğalıp farklılaşarak fibröz doku, kırık ve birincil kemikten ibaret olan kırık kallusunu oluşturur ve bu da kırık uçlarını çevreleyip sabitler (9,17,30,31).

Oluşan kallus, kırık iyileşmesinin erken aşamalarında yumuşak (fibröz-kıkırdak) kallus ve sert (kemik) kallus olmak üzere iki tiptir. Başlangıçta, kırık periferinde intramembranöz olarak şekillenen kallus sert kallustur. Yumuşak kallus ise oksijen basıncının düşük olduğu santral bölgelerde fibröz ve kıkırdak dokudan meydana gelir. Yumuşak kallus içindeki kıkırdak dokular da zamanla endokondral ossifikasyon yoluyla kemikleşir ve kırık uçlarının stabilitesi artar (9,30,31).

Kırık iyileşmesinde en önemli faktör kanlanmadır. Kırık iyileşmesinde anjiogenezin en önemli mediatörü olarak Fibroblastik Growth Faktör (FGF) düşünülmüştür ancak vasküler invazyon ve endotel hücre proliferasyonundan asıl sorumlu uyarıcı henüz tanımlanamamıştır (31). Vasküler invazyon ve anjiogenez önemlidir çünkü; kapiller damar gelişiminin yeterli olması, hücrelerin osteoblastlara dönüşümünü ve osteoblastların uygun matriksi sağlamalarını arttırırken; yetersiz olması hücrelerin kondroblastlara dönüşümünü ve dolayısıyla kıkırdak doku oluşumunu arttırır (9,17,30,31).

Damar endoteli sialik asitten dolayı, kıkırdak doku ise proteoglikanlardan zengin olduğu için negatif yüklüdür. Ca^{2+} burada pozitif yüklü ortam oluşturarak yeni damarların kıkırdak dokuya ilerlemesini sağlamaktadır. Dolayısıyla sert kallus dokusu gelişimi için damarlanma; bunun sağlanabilmesi için de osteoidin mineralizasyonuna gereksinim vardır. Kalsifikasyonun, proteoglikanlar ve Ca^{2+} bağlayan bir glikoprotein olan osteonektin ile uyarıldığı bilinmektedir. Kıkırdak dokudaki kondrositler hipertrofiye olduğunda alkalen fosfataz salgılar ve kondrositlerden kıkırdak matriks vezikülleri de atılmaya başlar. Böylelikle kıkırdak matriks kalsifiye olur. Difüzyonla beslenen kondrositler, bu kalsifiye doku içinde kaldıklarında ölür ve buldukları yerde boş lakunalar kalır. Buralara kılcal damarlar ulaşır, onlarla beraber gelen kemik hücreleri lakunalara yerleşir ve kallus zamanla kemikleşir (9). Kallusun mineralizasyonu ile kaynamanın oluştuğu söylenebilirse de kaynama henüz son noktasına ulaşmıştır. Onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz kısımlarının geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzanması ile yeniden yapılanma evresi (remodelizasyon) başlar (9,30).

3- Yeniden yapılanma (Remodelizasyon) evresi (25-100 gün):

En uzun evre olup, aylar hatta yıllar sürebilir. Onarım aşamasının ortasında başlar ve kırık klinik olarak iyileştikten uzun süre sonra bile devam eder.

Olgunlaşmamış kırık kallusu normal kemiğe göre daha zayıftır ve tam gücünü yeniden yapılanma sırasında kazanır. Bu dönem, mineralize kallusun normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümünü ve aşırı yapılmış olan kallusun rezorbsiyonunu içerir (9,30,31). Yeniden şekillenme, maruz kaldığı yüke ve kuvvete göre (Wolff kanunu) kemiğin normal yapı ve şeklini almasını sağlar. Bu süreç boyunca onarım evresinde oluşan birincil kemik lameller kemikle yer değiştirir (32). Lameller kemik kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur (9). Kemik iliği boşluğunun tekrar oluşması ile kırık iyileşmesi sona erer. Günümüzde kemiğin yeniden şekillenmesinde kabul gören üç temel teori vardır. Birincisi; kemiğin mekanik yüklenmeye göre yeniden şekillenmesi esasına dayanan Wolff Kanunu'dur. Buna göre mekanik yüklenmenin arttırılması belirgin kemik kazanımına neden olurken, ortadan kalkması belirgin kemik yıkımına neden olur. İkincisi; kemiğin elektrik yüklere göre yeniden şekillenmesi esasına dayanan Piezoelektrik Yükler Teorisi'dir. Bu teoriye göre, kemiğin kompresyon yüzü elektronegatif olup osteoblastları yani kemik yapımını uyarırken; gerilme yüzü elektropozitif olup osteoklastları yani kemik yıkımını uyarır. Üçüncü teori ise; yeniden şekillenmeyi sistemik hormonlar ve lokal sitokinler tarafından düzenlenen, temeli çok hücreli birimlere dayandıran Hueter-Volkmann Kanunu'dur (32).

2.5.2. Kırık İyileşmesinin Kontrolü

Kırık oluştuğu anda ortamdaki osteoblast ve osteoklast yoğunluğu iyileşme için yeterli miktarlarda değildir. İyileşmenin olması için gerekli olan kırık iyileşmesi öncü ve destek hücreleri, kılcak damar, lenf ve sinir sistemi ile yerel aracılı mekanizmalar tarafından sağlanır. Kırık sahasında bölgesel olarak üretilen ya da kan dolaşımıyla gelen, kemik dengesini koruyabilen kenetleyici faktörlere ihtiyaç vardır (5, 32-34). Bu faktörler arasında prostoglandinler ve kemik uyarıcı faktörler sayılabilir.

Prostoglandinler (PG): Hücre membranında bulunan araşidonik asitten meydana gelen yağ asitleridir. Araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi yardımıyla değişik PG'ler oluşur. Hücre duvarının ve kollajen dokunun yaralandığı durumlarda sentezlenir. İnflamatuar hücrelere kemotaktik etkiye sahiptirler ve akut inflamasyonun önemli araçlarındandırlar. Güçlü vazodilatatördürler ve hücre çoğalmasını uyarırlar. Lenfositlerin antikör yapımını düzenlerler (immün düzenleyici özellik). Hücre içine ve dışına Ca^{+2} hareketini kolaylaştırırlar. PGE_2 ve PGI_2 'nin kemik geri emilim gücü fazladır. PGE_1 ve

PGE₂ yeni kemik yapımını arttırır. PGF_{2α}, kondrogenezis ve kondroliziste etkilidir. Kemik geri emiliminde yer alan ajanlardan; EGF (epidermal büyüme faktör), transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü alfa (TGF_α), PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktör), bradikinin ve trombin etkilerini PGE₂ aracılığıyla göstermektedir. PGF'nin de kemik gelişimini hızlandırdığı hakkında görüşler vardır (5).

Kemik uyarıcı faktörler: Farklılaşmamış mezankimal hücrelerin mitozunu desteklerler ve yeni kemik hücrelerinin oluşumuna yol açarlar. Bu faktörlerin başlıcaları şunlardır (9,30) :

a. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF-β): İnflamasyon ve doku tamirinden sorumludur. En önemli kaynağı kemiğin hücre dışı matriksi ve trombositlerdir. TGF-β kondrosit ile osteoblastlarda sentezlenir ve encondral kemikleşme sırasında hücre dışı matrikste birikir. Onarım zincirinde rol almak üzere trombositlerden de salınır. Makrofajlardan salınan en güçlü kemotaktik ajandır.

Hücrenin integrin reseptörlerini uyarmak yoluyla hücre dışı matriks bileşenlerinden olan kollajen, fibronektin ve proteoglikanların oluşumunu arttırır. Bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılar. Sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna etki eder.

b. Kemik Morfojenik Proteini (BMP): Yaralanan kemik kaynaklı morfogenetik proteindir. Mitojenik ve dönüştürücü bir faktördür. Mezankimal hücrelerin kırıkta ve kemik hücrelerine farklılaşmasına, ektopik kemik uyarımının artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür. BMP'nin 1-10 arası on altı grubu vardır. BMP-7 osteojenik protein 1, BMP-8 ise osteojenik protein 2 olarak bilinir.

c. Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü (FGF): Kırıkta ve fibroblastlar için mitojeniktir. Kırıkta oluşumu aşamasında kallusu genişletir.

d. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF): Fibroblast ve kemik hücreleri için mitojeniktir. Kırık sahasında yerel olarak bulunabildiği gibi kan dolaşımında da bulunmaktadır. Bağ dokusunda kollajen sentezini arttırır. Fibroblast çoğalmasını, mezankimal hücre mitozunu, monosit ve makrofajların kırık bölgesine göçünü arttırır. PDGF uygulamasıyla kallus yoğunluğu ve hacmi artmıştır.

e. İnterlökinler (IL): Makrofaj ve monosit kökenlidir. IL-1 fibroblast çoğalması, kollajenaz ve PGE-2 üretimiyle ilgilidir. Ayrıca osteoklastlar üzerine etkiyle kemik geri emilimini de etkiler.

f. Plazma Fibronektini: Yeni damar oluşumu için mitojeniktir.

g. Somatomedin C: İskelet sistemi üzerinde büyüme hormonuna benzer etkisi vardır. Kondroblastların bölünme ve farklılaşmalarını, ayrıca kemik matriksi oluşumunu hızlandırır.

h. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF): Kemik geri emilimini hızlandırır.

i. Kondroblast Kökenli Büyüme Faktörü (CDGF): İki tipi vardır ve Tip II kollajen ve hiyaluronik asit için düzenleyicidir.

j. Makrofaj Kaynaklı Büyüme Faktörü (MDGF): Sıçanlarda osteoblast benzeri hücreler ve kondrositler için mitojeniktir.

k. Epidermal Hücre Kaynaklı Büyüme Faktörü (ECGF): Kıkırdak ve kemik için mitojeniktir.

l. Endotelial Hücre Kaynaklı Büyüme Faktörleri (ECDGF): Yeni damar oluşumu için mitojeniktir.

2.5.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yerel ve genel etkenler olarak yada kırık iyileşmesini olumlu veya olumsuz etkileyen etkenler olarak incelenebilirler.

Yerel faktörler:

1. Travmanın derece ve etkisi (15, 20)
2. Kırık uçlarının birbirine göre konumu (20)
3. Kırık yerinin dolaşımı (5,32,35)
4. Eklem içi kırıklar (9,15, 20, 25)
5. Kırılan kemiğin türü (9)
6. Kırık çizgisinin özelliği (20)
7. Cilt ve yumuşak doku yaralanması (15, 20)

8. Yerel bir enfeksiyon varlığı (15)
9. Yerel patolojik koşullar (9,14)
10. Açık kırık olup kırık hematomunun dışarı akması (14, 15, 20, 24, 25,33)
11. Elektrik akımı (26, 32)
12. Kırık bölgesinde denervasyon olması (9,20)
13. Yeterli tespit yapılmaması veya tespit süresinin kısa tutulması (15, 24, 20, 25)

Genel Faktörler:

1. Yaş: Azalan yaşla orantılı olarak mezankimal hücre farklılaşması, yeni kemik dokusu gelişmesi ve kırığın yeniden şekillenmesi hızlanır (15, 24, 20).

2. Genel durum: Diyabet, anemi, tüberküloz, raşitizm gibi kronik hastalıklar ve beslenme bozuklukları kırık iyileşmesini geciktirir. İltihabi olaylar, hiperemi nedeniyle Ca^{+2} tuzlarının çözünmesini etkiler. Artan lökositlerin proteolitik enzimleri, matriksin bozulmasına neden olur ve osteoid oluşumunu engeller (25).

3. Hormonlar: Parathormon (PTH), kalsiyum ve fosfat metabolizmasında önemli bir düzenleyicidir. Gastrointestinal sistemden Ca^{2+} emilimini, böbreklerden Ca^{2+} ve fosfat geri emilimini artırır. Genelde etkileri kemik rezorpsiyonu ile ilişkilidir. Araştırmacılar sürekli PTH'na maruz kalmanın osteoklast sayı ve etkinliğini arttırdığını, aralıklı maruz kalmanın ise osteoblastları uyararak kemik oluşumu ile sonuçlandığını göstermişlerdir. Sonuçta PTH, kemik mineral dansitesini artırır, kırık riskini azaltır ve kırık iyileşmesini artırır (30). Kalsitonin ve insülin de kırık iyileşmesini artırır (7,14,15,30,35). Kalsitonin, PTH'nun antagonistidir. Hem kompakt, hemde trabeküler kemik yapımını artırır. Kalsitonin dozu ve yeni kemik oluşumu arasında doğru orantı vardır, fakat iyileşmeyi olumlu yönde etkileme mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Büyüme hormonu gibi anabolizan hormonlar kırık iyileşmesini hızlandırmaktadır. Büyüme hormonu ve diğer anabolizan hormonlar, proteine bağlı Ca^{+2} artışını etkileyerek kırık iyileşmesine yardımcı olur. Büyüme hormonu, kallus hacminde artışa sebep olur. Tiroid hormonu da PTH gibi kemiğin yeniden şekillenmesine yardım eder. Kırık iyileşmesine de yardım ettiği ileri sürülmüştür (9,15). Kortizon kırık iyileşmesini yavaşlatır. Mezankimal hücrelerden osteoblast gelişimi ve matriks oluşumu için gerekli yapı taşlarının sentezini

yavaşlattığından, kırık iyileşmesini geciktirir. Kortizon, aynı zamanda kallus oluşumunu azaltır. FGF, EGF ve PDGF üzerine antagonist etki yaparak kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler (9).

4. Vitaminler: A vitamini normal dozda mezankimal hücre farklılaşmasını uyararak kırık iyileşmesine olumlu yönde etkiler. Eksikliğinde osteoblast ve osteoklast aktivitesinde bozulma olur ve kemik oluşumu engellenir (5,8,9). A vitamini fazlalığında ise hücre çoğalmasının olmamasıyla birlikte kırıkta aşınma meydana gelir. Osteoklastlara dönüşüm fazla uyarılır ve kırık iyileşmesi gecikir (9). C Vitamini, dolaylı yoldan kemik iyileşmesini olumlu etkiler (13). D Vitamini, normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırır. D Vitamini eksikliğinde Ca^{+2} düzeyi düşer ve kemik kalsifikasyonu azalır. Kalsiyumun kemikten kana geçişi yanında, kemik hücrelerinde sitrat üretimini artırır. Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme evresinde rol oynar. Sonuç olarak; D Vitamini normal dozda kırık iyileşmesini hızlandırırken, toksik dozda olumsuz etkiler (9). B6 Vitamini eksikliği ve K Vitamini antagonistleri (warfarin) kırık iyileşmesine olumsuz yönde etki ederler (7-9).

5. İlaçlar: Kondroitin sülfat, hiyalüronidaz ve dikumaral kırık iyileşmesine yardım eder. L-Dopa ve klonidinin büyüme hormonunu artırarak kırık iyileşmesini olumlu etkilediği gösterilmiştir (9,15). İndometazin yüksek dozlarda kırık iyileşmesini durdurduğu gösterilmiştir (9,25).

6. Hiperbarik oksijen: Günde iki saat kadar 2-3 atmosfer basıncında uygulanan oksijen uygulamasının kırık iyileşmesine yardım ettiği gözlenirken, 6 saat/gün dozda uygulamaların kırık iyileşmesini geciktirdiği izlenmiştir (9).

7. Kırık bölgesi egzersiz ve stresleri: İyi redüksiyon yapıldıktan sonra katı bir tespit uygulanan kırıklara erken hareket ve kontrollü yük verilirse kemik gelişimi uyarılarak iyi sonuç alınmaktadır (9,14,15,20,35). Bunun nedeni PGE-2 miktarının artması ve bu bölgenin dolaşımına olumlu bir etkisinin olmasıdır.

8. Elektriksel uyarı ve ultrason: Gecikmiş kaynama ve kaynamama tedavisinde elektromanyetik uyarı 1970'li yılların başından beri kullanılmakta ve %64 ile %85 arasında değişen başarı oranları bildirilmektedir, ancak hala taze kırıkların tedavisinde etkili olduğu ispatlanamamıştır (36).

2.6. GİNKGO BİLOBA

Ginkgoaceae ailesine ait olan Ginkgo biloba, Türkçe'de Mabet ağacı olarak adlandırılır. Ginkgo biloba adını ise yapraklarının iki loblu şeklinden almıştır (37). EGb 761, Ginkgo biloba ağacının yapraklarından elde edilen bir bitki ekstresidir. Diğer canlılarda rastlanmayan kimyasal maddeler içerir. Ana bileşenleri %22-27 oranında flavon glikozitleri (kersetin, izoramnetin; biflavonlar ve amentoflavon), %5-7 oranında terpenik laktonlar (ginkgolid A,B,C,M,J ve bilobalit) yanında diğer bileşenler olan proantosiyaniidler, organik asitler (hidroksikinurenik asit, kinurenik asit, protokateşik ve vanilik asit), ozlar, ginkgolik asit, D-glukarik asit bulunur (38). EGb 761, özellikle de ginkgolid B, Platelet aktive edici faktörü (PAF) antagonize eden, serbest radikal uzaklaştırıcı etki gösteren ve vasküler relaksasyon sağlayan bir moleküldür. PAF'e bağlı trombosit agregasyonunu önler ve lizozomal zarları stabilize eder. Bu ekstre serebrovasküler ve periferel vasküler yetmezlikleri de içeren pek çok iskemik olayda tedavi amaçlı kullanılmaktadır (39). Ekstre içindeki çeşitli terpen türevleri PAF'ün hedef hücrelerde kendine özgü reseptörlerini antagonize ederek etkinlik gösterir (40). PAF antagonistleri, mikrosirkülasyon düzeyinde vazodilatasyon oluşturarak kan akımını arttırıp vasküler konjesyonu önleyerek yeterli perfüzyonu sağlar ve hücre dejenerasyonunu azaltırlar (39).

Çok değişik organlarda değişik şekilde etki edebilir. Nörodejeneratif, duysal ve vasküler hastalıklarda koruyucu etkisi vardır. Moleküler, hücresel ve dokusal düzeyde veya tüm organizmada etki gösterebilir. Özellikle tek yönlü (aktivatör veya inhibitör) bir etkisi yoktur. Daha çok organizmanın içinde bulunduğu duruma göre adaptasyonuna yardımcı düzenleyici bir bileşiktir (1-3).

Bütün bu özellikleri dikkate alındığında daha önce deneysel çalışma olarak yapılmamış olması ve kırık iyileşmesi üzerine olumlu bir etkisinin olabileceği yönünde çıkarım ile bu çalışmayı planladık.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. ÇALIŞMA PLANI

Bu deneysel çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Ocak 2011 ve Mayıs 2011 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı.

Çalışmada, denek olarak 48 adet, ortalama ağırlıkları 224 gr (195-252 gr) olan, 20 haftalık Spraque Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık siklusu uygulanarak 20-24°C'de tek tek olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Sıçanlar, istedikleri kadar standart sıçan yemi ve su ile beslendi. Çalışma süresince sıçan kafesleri 3 günde bir düzenli olarak temizlendi. Sıçanlar, 1 haftalık uyum döneminden sonra rastgele seçilmiş 8'erli 6 gruba ayrıldı. Gb 1; 7 gün, Gb 2 ; 21 gün, Gb 3 ise 35 günlük deney grubu olarak belirlendi. Kontrol grubu olarakta K1; 7 gün, K2 ; 21 gün, K3 ise 35 günlük deney grubu olarak belirlendi. Gb grubuna Ginkgo biloba (EGb761) 60mg/kg (Tebokan®Forte, Abdiibrahim, İstanbul, Türkiye) orogastrik yolla günde 1 kez verildi ve diğer K grubuna ise verilmeyerek kontrol grubu oluşturuldu.

Tablo 1: Deney grupları ve sayıları

Deney ve kontrol bulgular	Grup başına hayvan adedi
Deney grubu	24
Gb 1	8
Gb 2	8
Gb 3	8
Kontrol grubu	24
K 1	8
K 2	8
K 3	8
Kullanılan toplam hayvan sayısı	48 rat

3.2. CERRAHİ TEKNİK

Cerrahi öncesinde sıçanlar 4 saat aç bırakıldı. Anestezi sağlamak amacıyla; intraperitoneal olarak 5 mg/kg xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Almanya) ve 50 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Gerekli durumlarda ameliyat esnasında ilave doz olarak 15 mg/kg ketamin hidroklorid yapıldı. Sıçanlar sol yan pozisyonunda yerleştirildi. Cerrahi alan traş edildi. Sağ uyluk cildi ameliyat öncesi %10'luk povidone iodine (Batticon; Adeka, Samsun, Türkiye) solüsyonu ile temizlendi ve uygun örtünme sağlanarak steril alan oluşturuldu (Şekil 2).



Şekil 2. Sıçanın uyluğunun ameliyat için hazırlanması.

Uygun saha temizliği ve örtünmenin ardından sağ uyluk cildi lateralden longitudinal insizyonla yaklaşık 2 cm. kadar açıldı. Fasia geçildi ve adeleye ulaşıldı. Adele femurun tam ortasına denk gelecek şekilde kemikten sıyrıldı (Şekil 3).



Şekil 3. Yumuşak dokuların ekartasyonu sonrasında femurun görüntüsü.

Femura ulaşıldı ve 0,8 mm'lik Kirschner teli (Hipokrat®, İzmir, Türkiye) ile pilli matkap kullanılarak farklı yönlerde transvers hol oluşturuldu ve kemik zayıflatıldı, sonra nazikçe manipülasyon yapılarak femur transvers olarak kırıldı (Şekil 4).



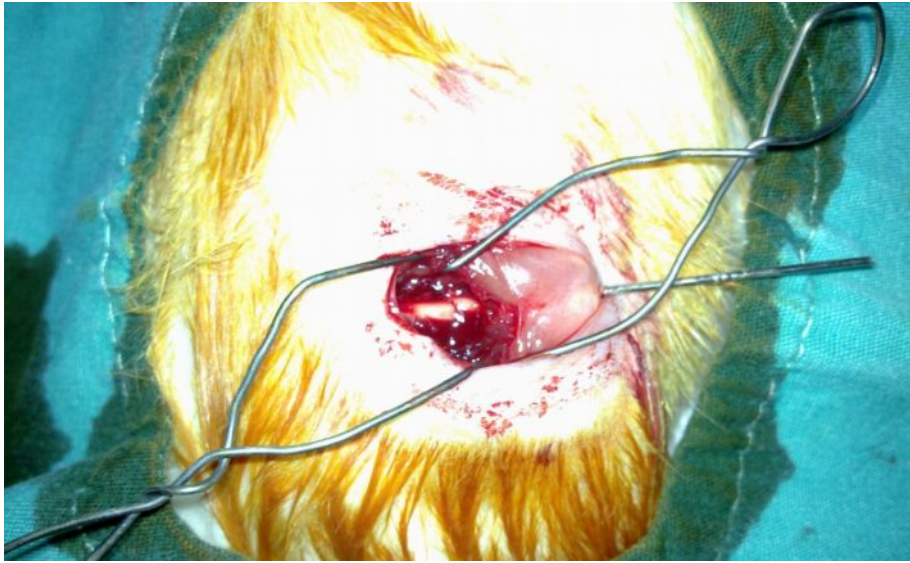
Şekil 4. Femur cisminde transvers kırık oluşturulması.

Kırık hattından distale doğru anterograd olarak 1 mm'lik Kirschner teli (Hipokrat®, İzmir, Türkiye) yine pilli matkap kullanılarak diz hiperfleksiyundayken ilerletildi ve patellar ligamentin medialinden çıkması sağlandı (Cilt esnek olduğu için dizin görülmesinde sorun yaşanmadı) (Şekil 5).



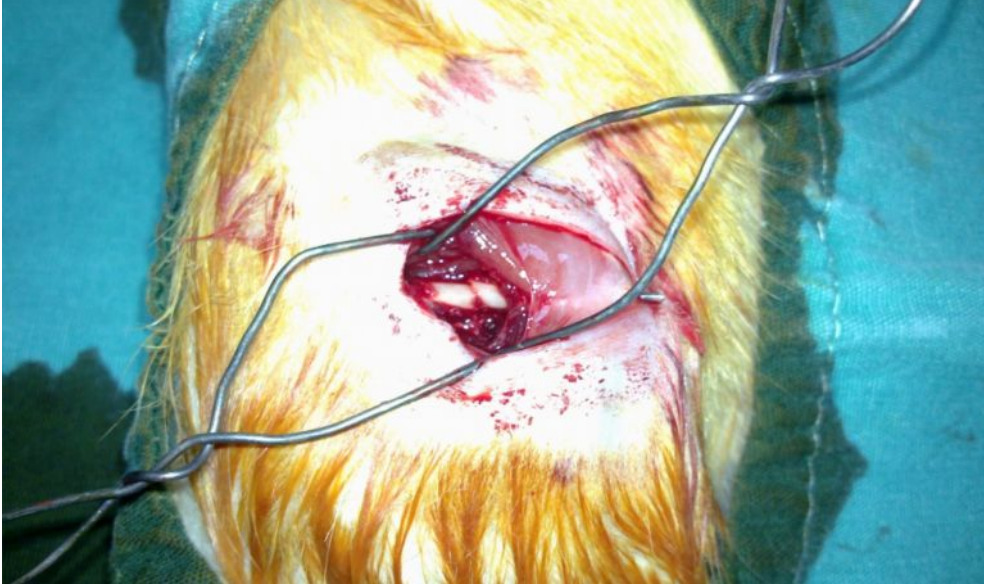
Şekil 5. Kirschner telinin intramedüller olarak anterograd yerleştirilerek diz bölgesinden dışarı çıkarılması.

Tel distale doğru çekildi ve kırık hattı redükte edildikten sonra retrograd olarak proksimale doğru ilerletildi (Şekil 6).



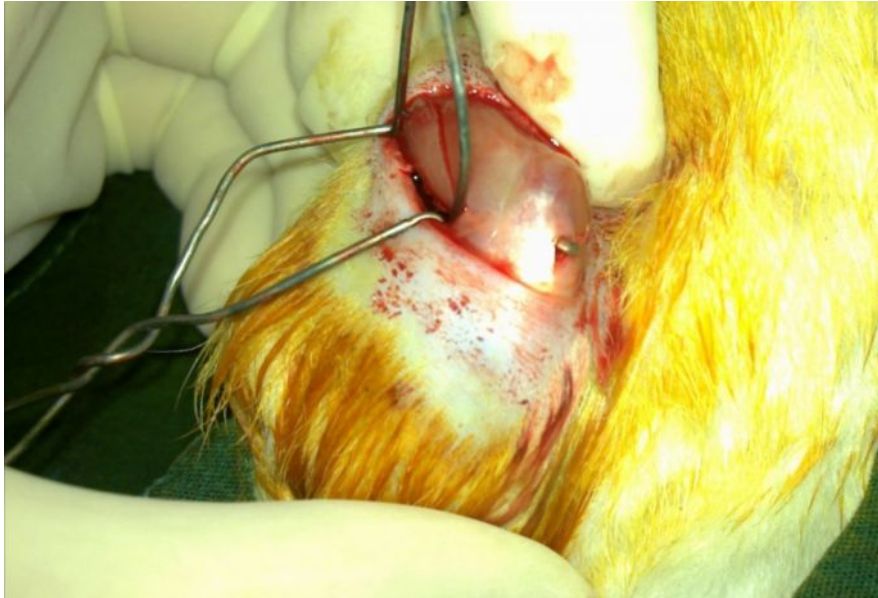
Şekil 6. Kırık hattının redükte edilerek telin retrograd olarak ilerletilmesi.

Sertleştığı yerde yaklaşık 2-3 mm ilerletilip tekrar 2-3 mm geri çekildi ve tel makasıyla diz bölgesinden kesildi (Şekil 7, 8).



Şekil 7. Telin kesilmesi.

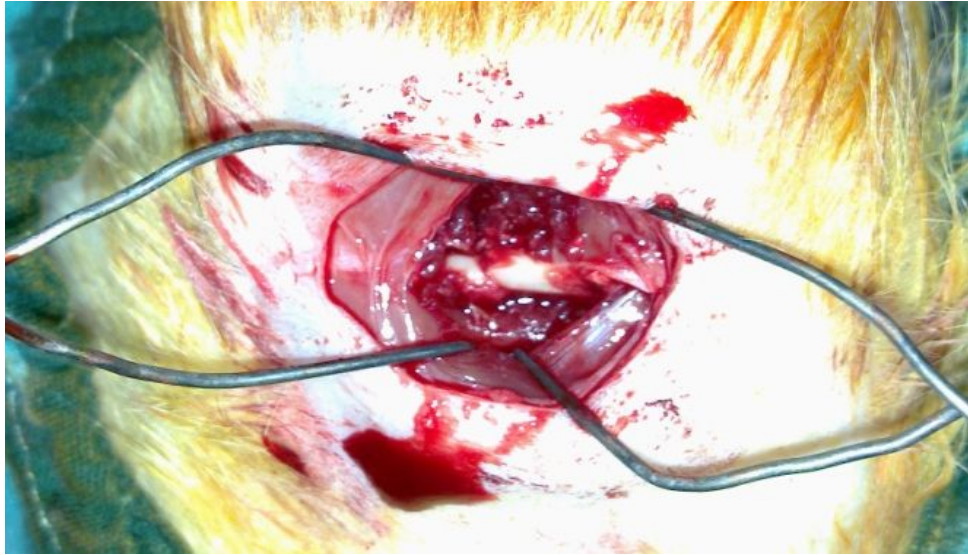
Ardından telin tamamının gömülmesi için başka bir telin ucuyla tekrar ilerletildi (Şekil 8, 9). Fiksasyon sağlandıktan sonra kırık hattının redüksiyonu tamamlandı (Şekil 10).



Şekil 8. Kesilmiş olan telin diz bölgesinden görüntüsü.



Şekil 9. Telin kanal içine ilerletildikten sonraki görüntüsü, telin tamamı kanal içinde.



Şekil 10. Kırık hattının son görüntüsü.

Cilt 3/0 ipek (Sterisilk[®], Türkiye) ile kapatıldı. Takiben yara yeri povidon iyodür ile silinerek sıçan ameliyat masasından alındı (Şekil 11).



Şekil 11. Uyluğun cilt kapatıldıktan sonraki görüntüsü.



Şekil 12. Ameliyat sonrası radyografi.

Cerrahi işlemten sonra sıçanlar normal beslenme ve yaşam koşullarına bırakıldı. Anestezinin etkisi geçtikten sonra; sıçanların kırık ayağına yük vermesinde herhangi bir kısıtlamaya gidilmedi. Sıçanlara, cerrahi işlemten önce veya sonra herhangi bir antibiyotik tedavisi uygulanmadı. Her iki gruba postoperatif analjezik olarak; içme sularına 4,5 mg/ml olacak şekilde (150-250 mg/kg gün) katılan parasetamol 3 gün süreyle verildi. Gb gruplarına çalışma süresi kadar Ginkgo biloba 60 mg/kg olacak dozda orogastrik yolla günde 1 kez aynı saatte verildi.

Daha sonra 7. günde Gb 1 ve K 1 grubundaki, 21. günde Gb 2 ve K 2 grubundaki, 35.günde ise Gb 3 ve K 3 grubundaki sıçanlar anestezi uygulandıktan sonra servikal dislokasyon ile öldürüldü. Sıçanların sağ femurlarına kalçadan ve dizden dezartikülasyon uygulandı. Röntgen grafileri çekildikten sonra yumuşak dokuları diseke edilen örnekler histolojik değerlendirme için hazırlanmak üzere % 10'luk formaldehitin içine koyuldu.

3.3. RADYOLOJİK İNCELEME

Sıçanlar öldürüldükten sonra kalça ve diz eklemlerinden dezartiküle edilen sağ femurlar yumuşak dokularından kabaca sıyrıldıktan sonra röntgen kasetlerine yerleştirilerek direkt radyografileri görüntülendi. Radyografler Lane–Sandhu radyolojik puanlama sistemine göre skorlandı (Tablo 2) (41). Skorlama, çalışmadan bağımsız ve gruplardan habersiz iki ayrı ortopedist tarafından yapıldı.

Tablo 2: Lane-Sandhu puanlama sistemi (41)

	Puan
Kemik oluşumu	
Kemik oluşumunun olmaması	0
Kemik oluşumunun defektin %25'ni doldurması	1
Kemik oluşumunun defektin % 50'ni doldurması	2
Kemik oluşumunun defektin % 75'ni doldurması	3
Kemik oluşumunun defektin tamamını doldurması	4
Kaynama	
Bariz kırık görülmesi	0
Kısmi kırık görülmesi	2
Kırık hattının görülmemesi	4
Yeniden yapılanma	
Yeniden yapılanmanın görülmemesi	0
Medüller kanalın yeniden yapılanması	2
Korteksin tamamen yeniden yapılanması	4

3.4. HİSTOLOJİK İNCELEME

Alınan örnekler kırık hattına zarar verilmeyecek şekilde diseke edilerek, yumuşak dokular uzaklaştırıldı. Kalan kemik kısımları ayrı ayrı %10'luk nötral formaldehid solüsyonu içeren numaralandırılmış kaplara konuldu. Kanlanan solüsyon tekrar %10'luk nötral formaldehid solüsyonu ile değiştirildi. Dokular 48 saat süreyle bu solüsyon içinde fikse (tespit) edildi.

Fiksasyonu tamamlanan dokuların dekalsifikasyonu (kalsiyum tuzlarının dokudan uzaklaştırılması) için %10'luk formik asitli formaldehit solüsyonu kullanıldı. Dekalsifikasyon işlemi süresince solüsyon beş günde bir değiştirildi. Kesilebilecek duruma gelen kemikler kırık hattı görünecek şekilde her iki uçtan kısaltıldı. Yirmi gün oda sıcaklığında bu şekilde dekalsifiye edilen dokular akarsuda yıkandıktan sonra, dehidratasyon için dereceli alkol serilerinden geçirildi ve ksilen ile şeffaflaştırılmanın ardından parafine gömüldü.

Hazırlanan parafin bloklar tam otomatik mikrotom (Leica RM2255, Japan) ile 5 µm (mikrometre) kalınlığında kesildi. Numaralandırılmış lamalar üzerine alındı. Etüvde 50°C'de 30 dakika bekletilip parafini eritildikten sonra ksilen ve alkol serilerinden geçirildi ve genel yapıyı gösterebilmek için Hematoksilen-Eozin (H&E), bağ dokusunu ayırt edebilmek için Trichrome Masson ile boyandı.

Preparatlar ışık mikroskop (Olympus BX51-Japan) altında grupları bilmeyen bu konuda deneyimli bir histolog tarafından değerlendirildi. Gruplara ait preparatlar ışık mikroskopu altında dijital kamera (Olympus DP71-Japan) ile fotoğraflandı. Preparatların histolojik değerlendirilmesinde Huo ve arkadaşlarının histolojik puanlama sistemi kullanıldı (Tablo 3) (42).

Tablo 3: Huo histolojik puanlama sistemi (42)

Kırık bölgesi bulguları	Puan
Fibröz doku	1
Ağırlıklı fibröz doku ve az miktarda kırık doku	2
Eşit miktarda fibröz doku ve kırık doku	3
Ağırlıklı kırık doku ve az miktarda fibröz doku	4
Kırık doku	5
Ağırlıklı kırık doku ve az miktarda olgunlaşmamış kemik doku	6
Eşit miktarda kırık doku ve olgunlaşmamış kemik doku	7
Ağırlıklı olgunlaşmamış kemik ve az miktarda kırık doku	8
Kırıgın olgunlaşmamış kemikle kaynaması	9
Kırık uçlarının olgun kemikle kaynaması	10

3.5. İSTATİSTİKSEL İNCELEME

Radyolojik olarak elde edilen tüm değerlerin (kemik oluşumu, kaynama, yeniden yapılanma ve toplam değerler) ve histolojik değerlendirme sonuçlarının, yedinci, yirmibirinci ve otuzbeşinci günlerdeki Gb grubu ile K grubunun karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı.

Gb grupları ve K grupları ayrı ayrı olacak şekilde herbir parametrelerinin zamansal değişimi ise Friedman varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon testi) ile yapıldı. Veriler ortanca (min.-maks.) olarak sunuldu. Sonuçlarda anlamlılık, $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. KLİNİK BULGULAR

Anestezi ve orogastrik yolla ilaç verilmesine ait herhangi bir komplikasyon gözlenmedi. Ameliyat sonrasında 5-6 gün süre ile sıçanlarda topallama gözlemlendi. Bu süreden sonra sıçanlar sağ alt ekstremitelerini normale yakın bir şekilde kullanmaya başladılar. Cerrahi bölgesinde herhangi bir enfeksiyon bulgusu veya yarada açılma gözlenmedi. Çalışma süresince hiçbir sıçan ölmedi.

4.2. RADYOLOJİK BULGULAR

Gruplardan habersiz iki ayrı ortopedist tarafından, radyografiler Lane-Sandhu puanlama sistemine (41) göre aşağıdaki çizelgelerde belirtildiği gibi puanlandı.

Tablo 4: Gb 1 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 1. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (7. Gün deney grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	1	0	0	1
2	1	2	0	3
3	2	4	2	8
4	2	2	2	6
5	2	2	2	6
6	1	0	0	1
7	1	2	0	3
8	1	0	0	1
Toplam/ortalama				29/3,625

Tablo 5: Gb 2 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 1. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (21. Gün deney grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	1	2	2	5
2	3	4	4	11
3	3	4	2	9
4	2	2	2	6
5	1	2	2	5
6	2	2	2	6
7	1	2	2	5
8	3	2	4	9
Toplam/ortalama				56/7

Tablo 6: Gb 3 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 1. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (35. Gün deney grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	2	2	2	6
2	3	4	2	9
3	3	2	4	9
4	2	2	2	6
5	3	2	4	9
6	2	2	2	6
7	3	2	2	7
8	2	2	2	6
Toplam/ortalama				58/7,25

Tablo 7: K 1 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 1. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (7. Gün kontrol grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	0	2	0	2
2	1	2	2	5
3	1	0	0	1
4	1	2	0	3
5	2	2	2	6
6	1	0	0	1
7	1	2	0	3
8	2	4	2	8
Toplam/ortalama				29/3,625

Tablo 8: K 2 grubundaki sıçanlara ait femur radyograflerinin 1. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (21. Gün kontrol grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	2	2	2	6
2	2	2	2	6
3	3	2	4	9
4	2	2	2	6
5	2	2	2	6
6	2	2	2	6
7	3	2	4	9
8	2	2	2	6
Toplam/ortalama				54/6,75

Tablo 9: K 3 grubundaki sıçanlara ait femur radyograflerinin 1. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (35. Gün kontrol grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	3	2	2	7
2	3	2	2	7
3	3	4	4	11
4	4	4	4	12
5	2	0	2	4
6	2	4	4	10
7	2	0	2	4
8	3	2	2	7
Toplam/ortalama				62/7,75

Tablo 10: Gb 1 grubundaki sıçanlara ait femur radyograflerinin 2. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (7. Gün deney grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	2	2	0	4
2	3	2	2	7
3	4	4	4	12
4	4	4	4	12
5	3	2	2	7
6	4	2	2	8
7	3	2	2	7
8	2	0	0	2
Toplam/ortalama				59/7,375

Tablo 11: Gb 2 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 2. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (21. Gün deney grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	3	2	2	7
2	4	4	4	12
3	4	4	4	12
4	3	2	2	7
5	3	2	2	7
6	3	2	2	7
7	3	2	2	7
8	4	2	2	8
Toplam/ortalama				67/8,375

Tablo 12: Gb 3 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 2. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (35. Gün deney grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	1	0	0	1
2	4	4	4	12
3	4	4	4	12
4	2	2	2	6
5	4	4	4	12
6	4	4	4	12
7	4	4	4	12
8	2	2	2	6
Toplam/ortalama				73/9,125

Tablo 13: K 1 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 2. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (7. Gün kontrol grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	3	2	2	7
2	2	2	2	6
3	1	0	0	1
4	3	2	2	7
5	3	2	2	7
6	1	0	0	1
7	2	2	2	6
8	3	2	2	7
Toplam/ortalama				42/5,25

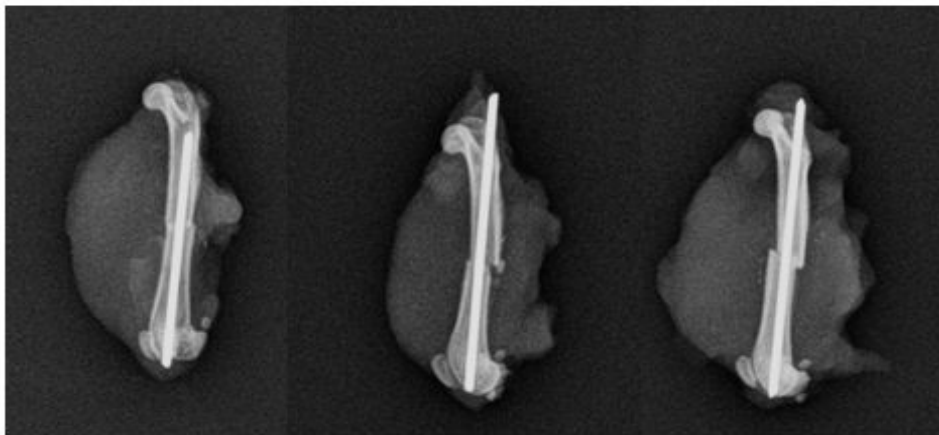
Tablo 14: K 2 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 2. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (21. Gün kontrol grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	3	2	2	7
2	3	2	2	7
3	3	2	4	9
4	3	2	2	7
5	2	2	2	6
6	2	2	2	6
7	2	2	2	6
8	3	2	2	7
Toplam/ortalama				55/6,875

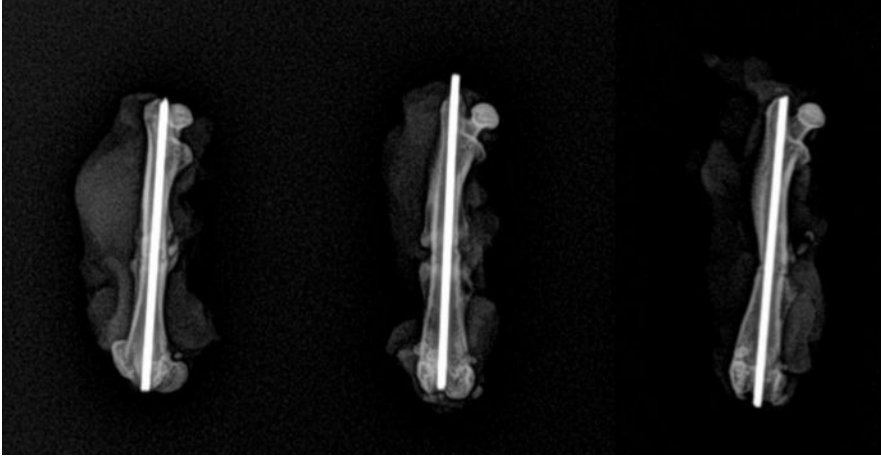
Tablo 15: K 3 grubundaki sıçanlara ait femur radyografilerinin 2. ortopediste ait değerlendirme sonuçları (35. Gün kontrol grubu)

Hayvan	kemik oluşumu	kaynama	yeniden yapılanma	toplam
1	3	2	2	7
2	3	2	2	7
3	3	2	2	7
4	4	4	4	12
5	1	0	0	1
6	4	4	4	12
7	1	0	0	1
8	4	2	2	8
Toplam/ortalama				55/6,875

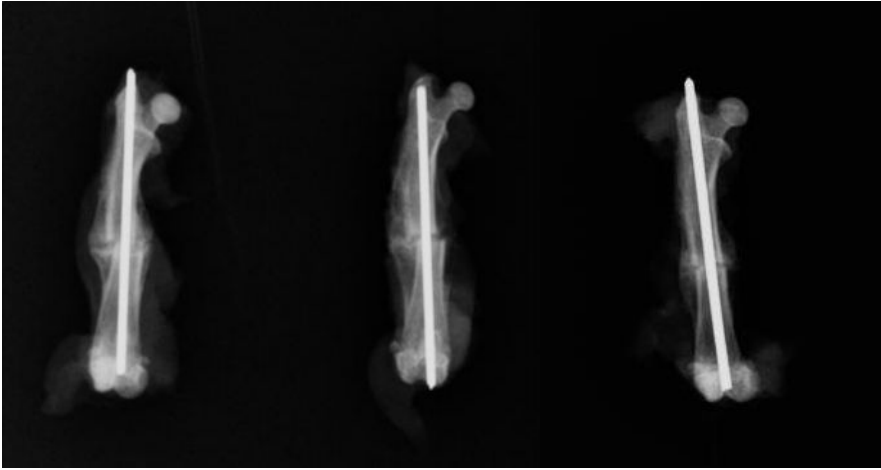
Deney ve kontrol grubunun 7, 21 ve 35. günlere ait radyografileri aşağıda gösterilmiştir (şekil 13, 14, 15, 16, 17, 18) :



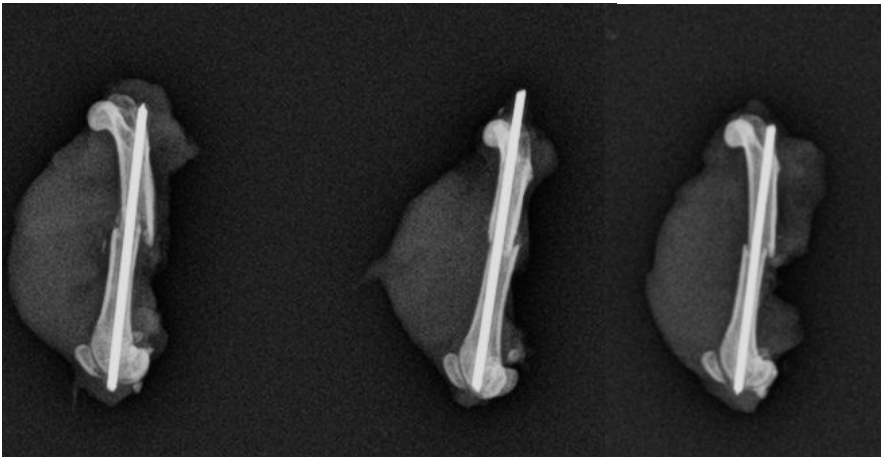
Şekil 13. Yedinci gün Gb 1 grubuna ait radyografilerden örnekler.



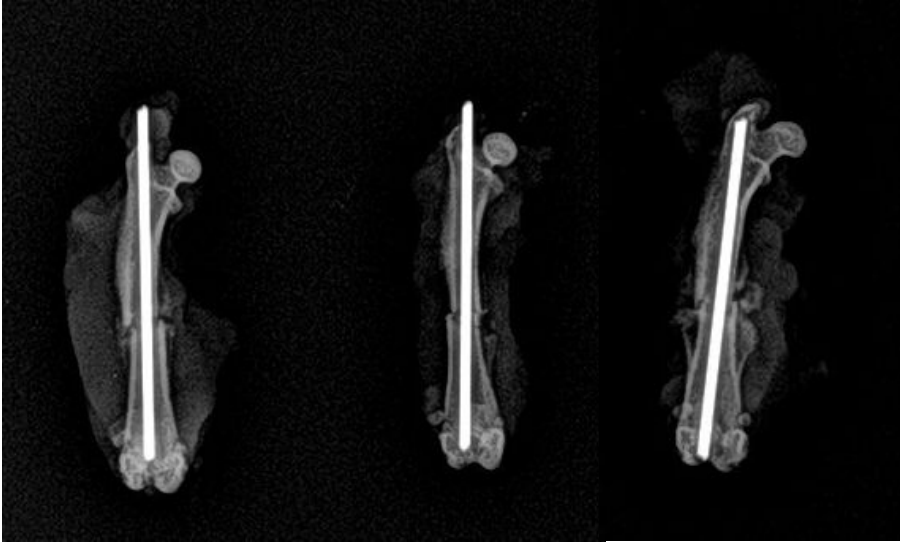
Şekil 14. Yirmibirinci gün Gb 2 grubuna ait radyograflardan örnekler.



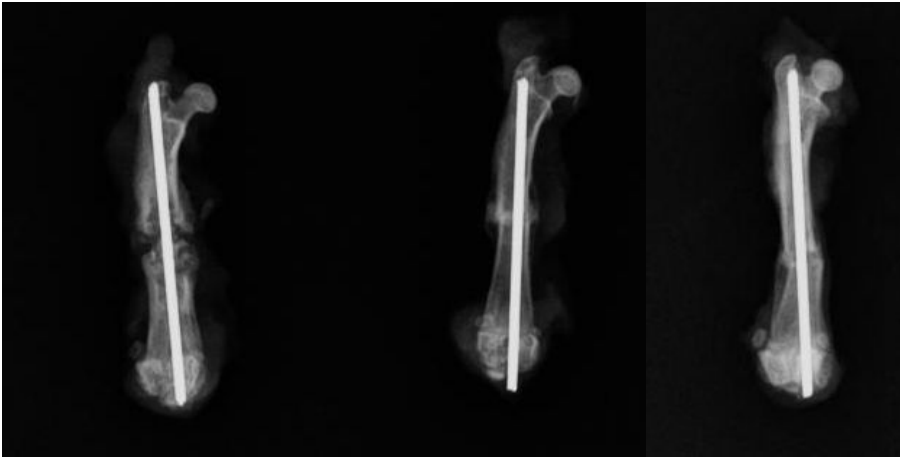
Şekil 15. Otuzbeşinci gün Gb 3 grubuna ait radyograflardan örnekler.



Şekil 16. Yedinci gün K 1 grubuna ait radyograflardan örnekler.



Şekil 17. Yirmibirinci gün K 2 grubuna ait radyografilere örnekler.



Şekil 18. Otuzbeşinci gün K3 grubuna ait radyografilere örnekler.

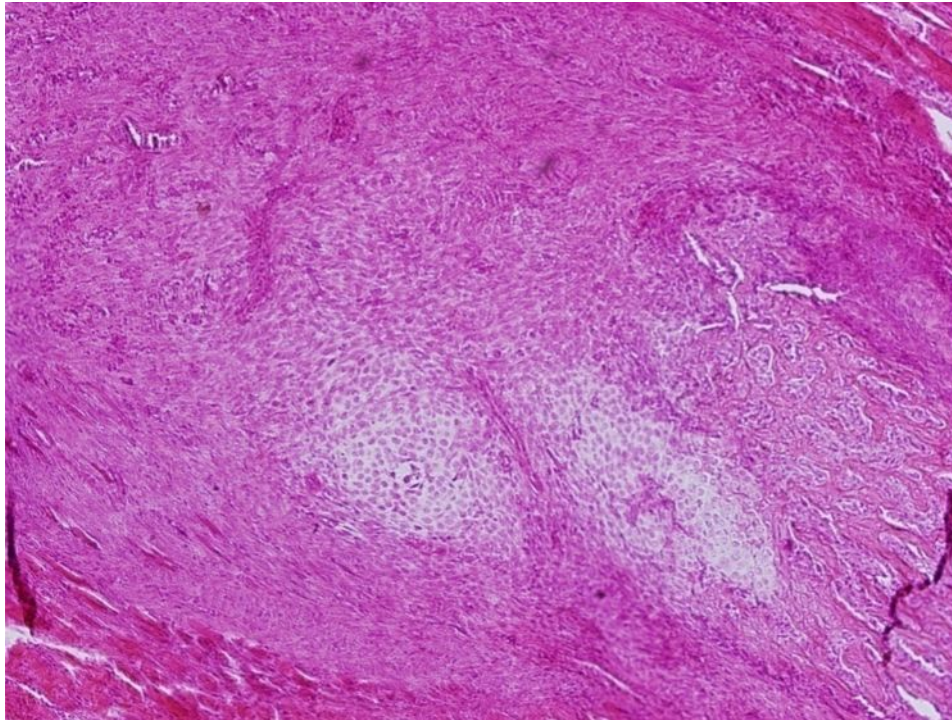
4.3. HİSTOLOJİK BULGULAR

Preparatlar gruplardan habersiz ve bu konuda deneyimli bir histolog tarafından değerlendirildi. Preparatların histolojik değerlendirilmesinde Huo ve arkadaşlarının histolojik puanlama sistemi kullanıldı (42) (Tablo 16).

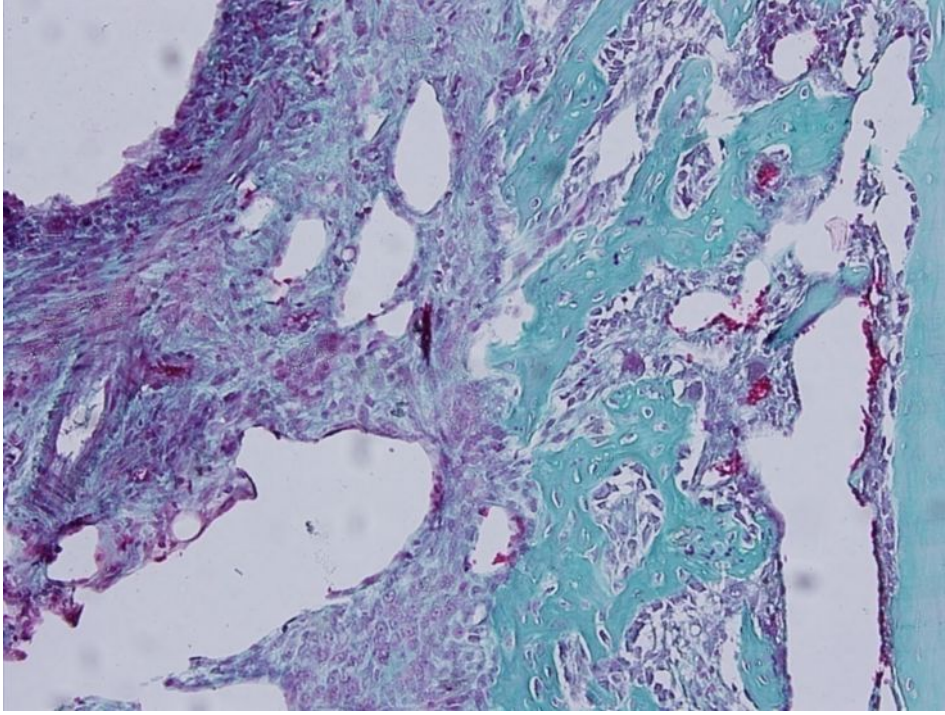
Tablo 16: Sıçanların sağ femurlarının histolojik olarak puanlama sonuçları

Hayvan	Gb 1	Gb 2	Gb 3	K 1	K 2	K 3
1	2	5	7	1	6	6
2	2	6	9	2	4	6
3	2	5	8	2	4	7
4	1	6	8	2	4	6
5	2	7	10	1	5	6
6	2	6	9	2	5	6
7	2	6	9	2	5	6
8	2	6	8	2	5	6
Toplam/ ortalama	15/1,875	47/5,875	68/8,5	14/1,75	38/4,75	49/6,125

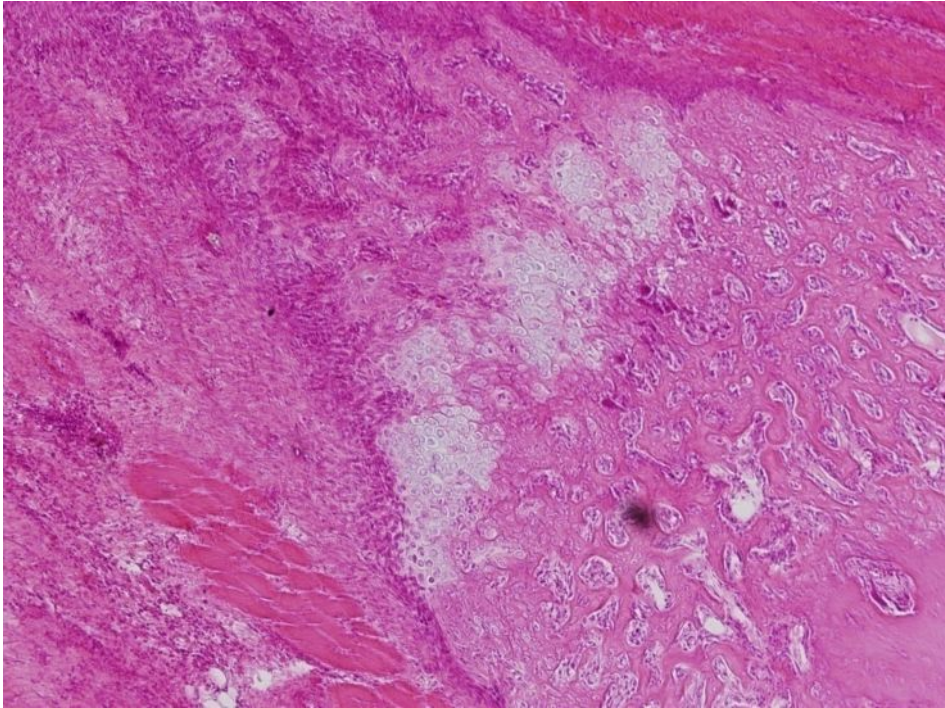
Histolojik değerlendirmede kullanılan preparatlardan örnekler aşağıda gösterilmiştir (Şekil 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30):



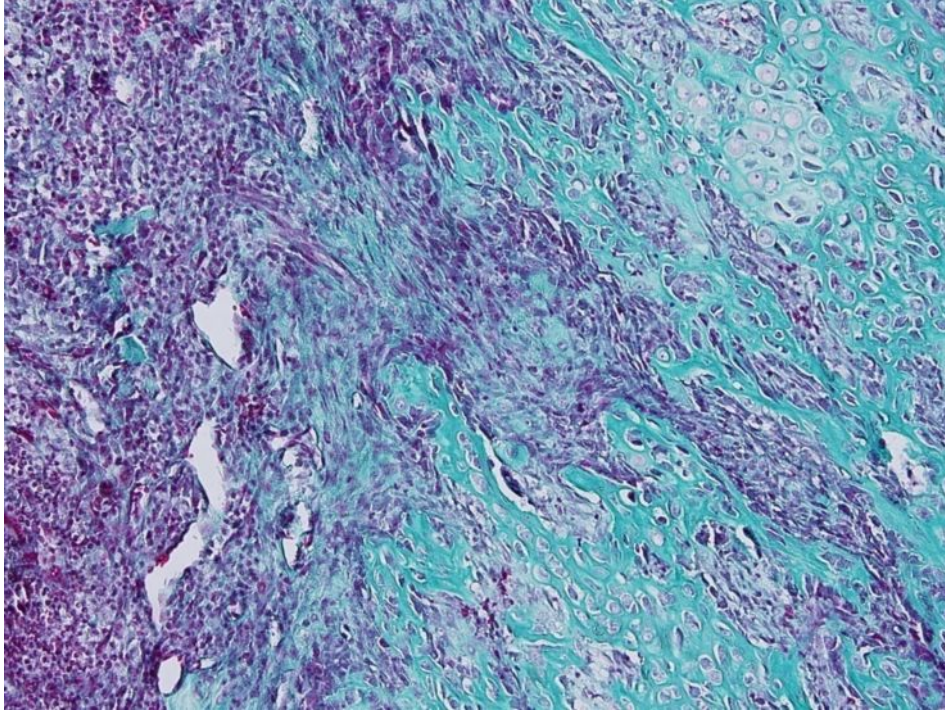
Şekil 19. Kontrol grubunun 7. gündeki (H&E) boyama görüntüsünde bol miktarda fibröz doku ve yer yer kıkırdak doku görülmekte (H&E X10).



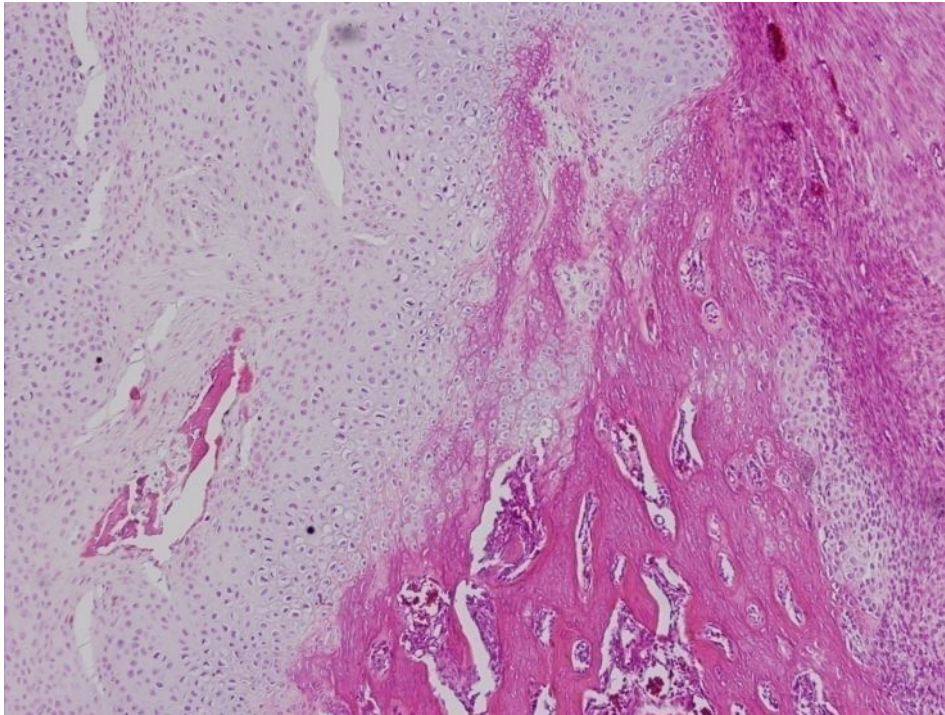
Şekil 20. Kontrol grubunun 7. gündeki Trikrom Masson ile boyama görüntüsünde kırık hattındaki kırmızı-yeşil fibröz bağ dokusunu ve yer yer yeşil renkteki kıkırdak doku görülmekte (Trikrom Masson X20).



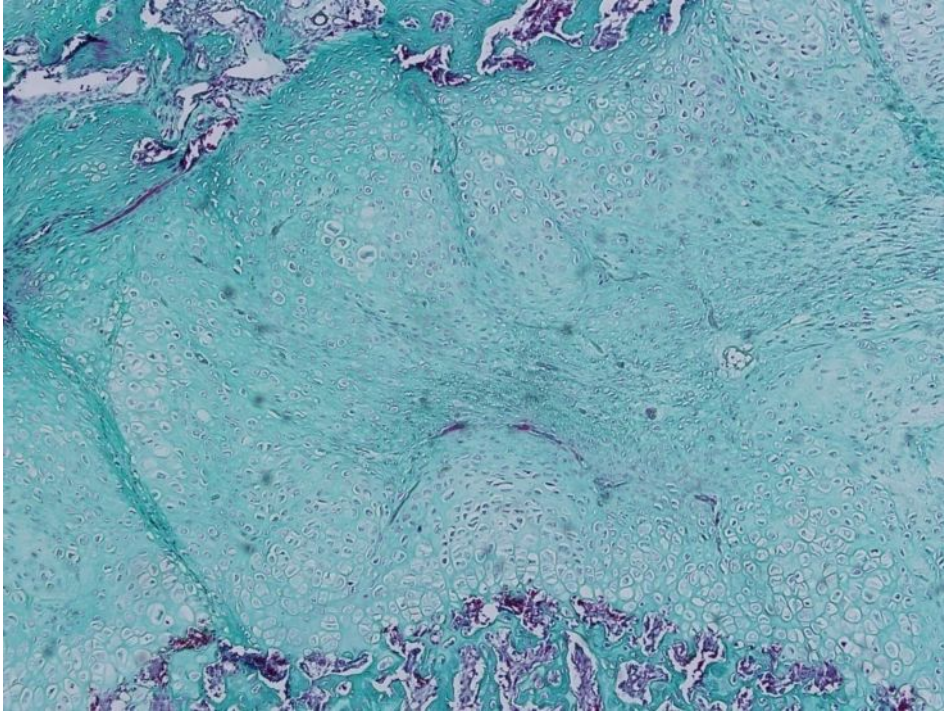
Şekil 21. Ginkgo biloba grubunun 7. gündeki (H&E) boyama görüntüsünde bol miktarda fibröz bağ dokusu ve yer yer kıkırdak doku görülmekte (H&E X10).



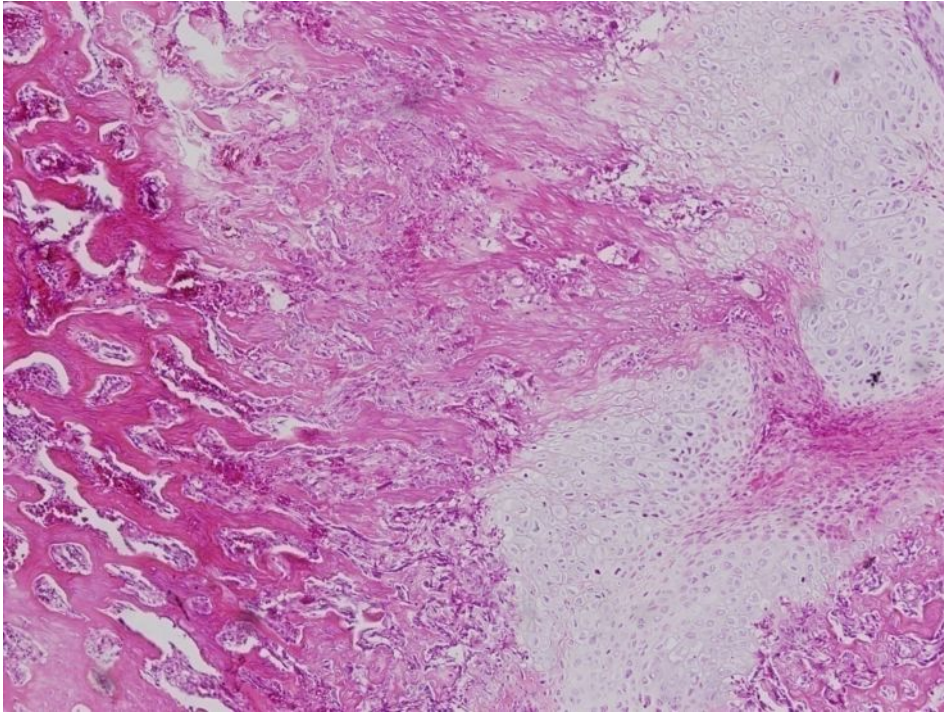
Şekil 22.Ginkgo biloba grubunun 7. gündeki Trikrom Masson ile boyama görüntüsünde kırık hattındaki kırmızı-yeşil fibröz bağ dokusunu ve yer yer yeşil renkteki kıkırdak doku görülmekte (Trikrom Masson X20).



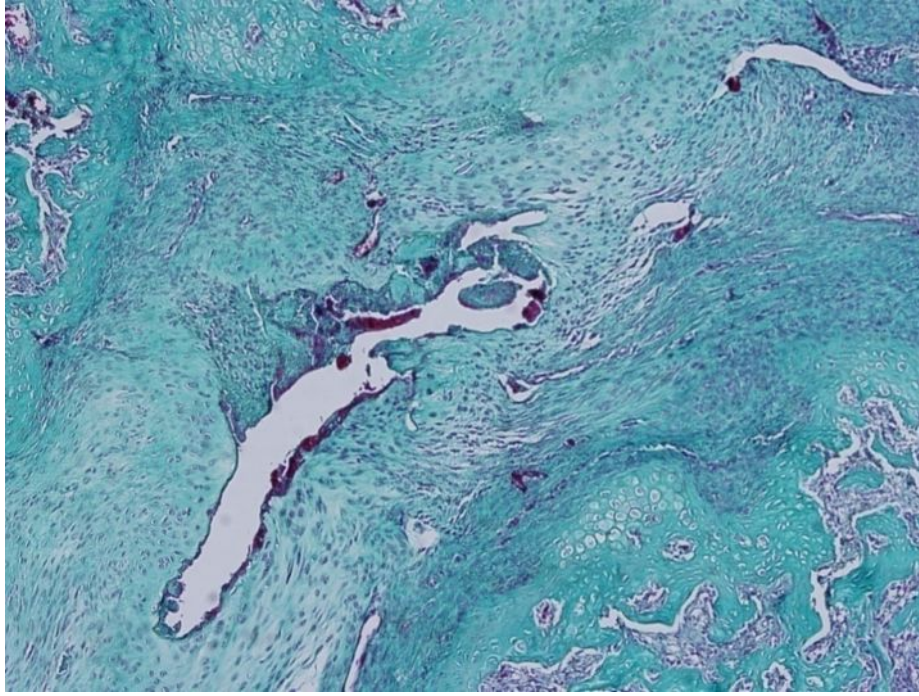
Şekil 23. Kontrol grubunun 21. Gündeki (H&E) boyama görüntüsünde bol miktarda kıkırdak doku görülmekte (H&E X 20).



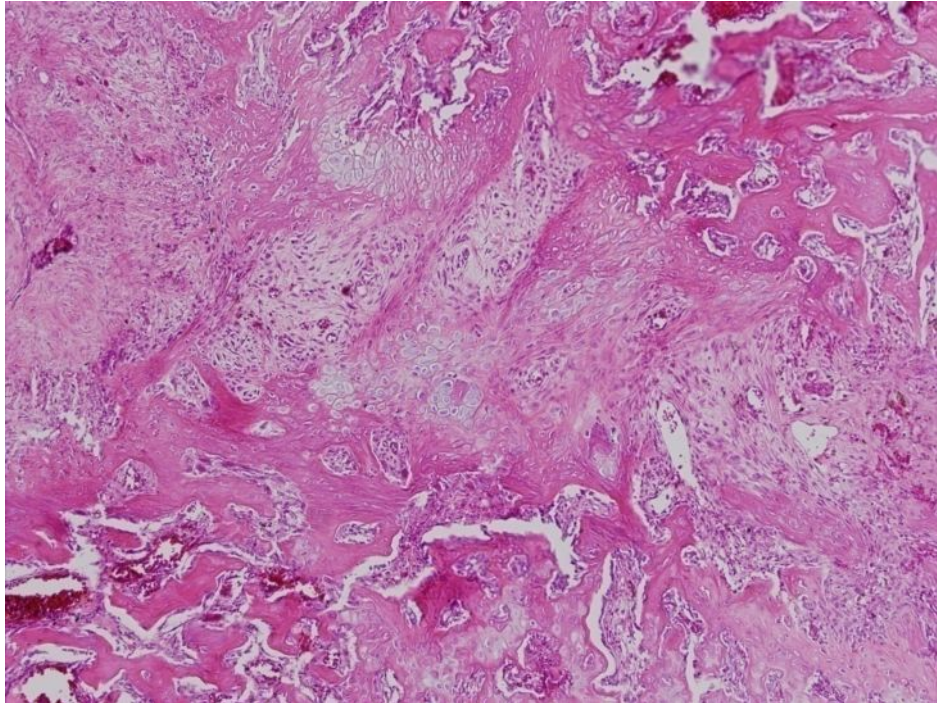
Şekil 24. Kontrol grubunun 21. gündeki Trikröm Masson ile boyama görüntüsünde bol miktarda yeşil renkte izlenen kıkırdak doku görülmekte (Trikröm Masson X10).



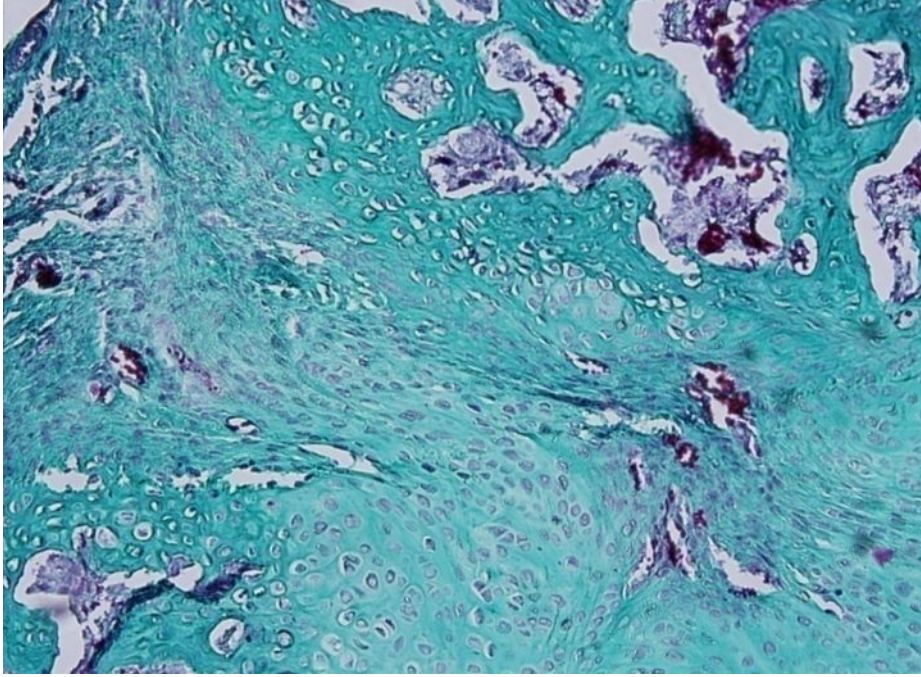
Şekil 25. Ginkgo biloba grubunun 21. gündeki (H&E) boyama görüntüsünde bol miktarda kıkırdak doku ve yer yer olgunlaşmamış kemik görülmekte (H&E X10).



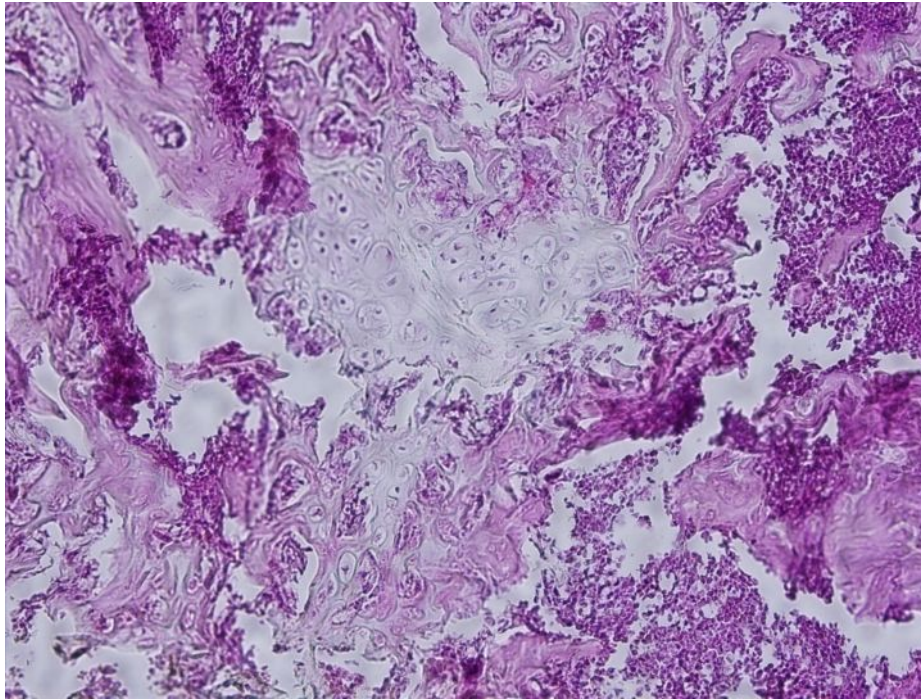
Şekil 26. Ginkgo biloba grubunun 21. gündeki Trikrom Masson ile boyama görüntüsünde bol miktarda yeşil renkte kıkırdak doku ve yer yer yeşil boyalı olgunlaşmamış kemik spikülleri ve kırmızı renkte kemik iliği görülmekte (Trikrom Masson X10).



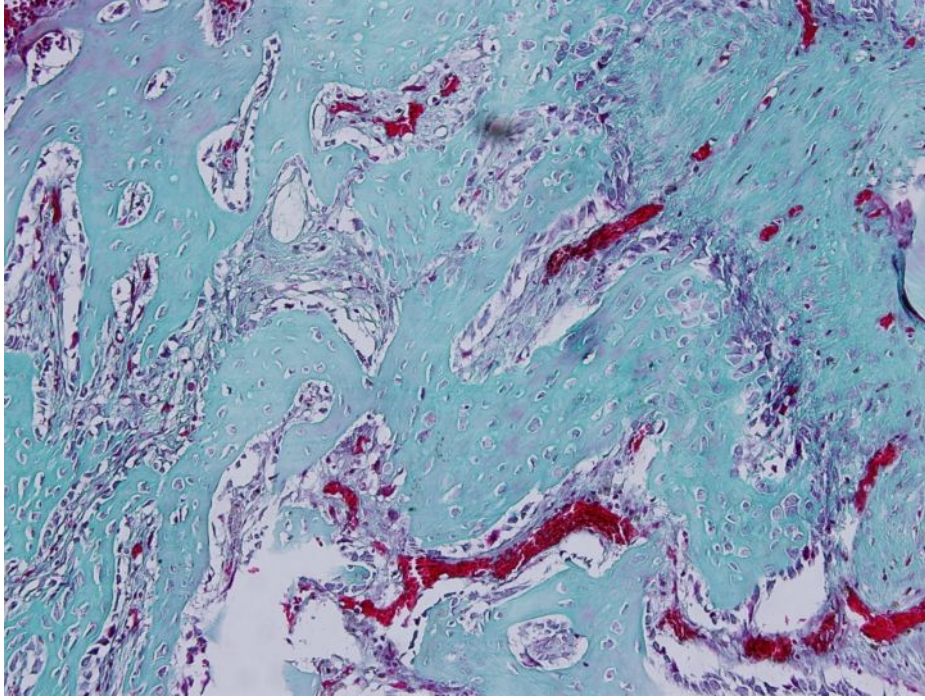
Şekil 27. Kontrol grubunun 35. gündeki (H&E) boyama görüntüsünde eşit miktarda olgunlaşmamış kemik ve kıkırdak doku içeren kırık hattı görülmekte (H&E X10).



Şekil 28. Kontrol grubunun 35. gündeki Trikrom Masson ile boyama görüntüsünde eşit miktarda yeşil renkteki kıkırdak doku ve kırmızı renkte kemik iliği içeren olgunlaşmamış kemik görülmekte (Trikrom Masson X20).



Şekil 29. Ginkgo biloba grubunun 35.gündeki (H&E) boyama görüntüsünde yaygın olgunlaşmamış kemik ve az miktarda kıkırdak doku içeren kırık hattı görülmekte (H&E X20).



Şekil 30. Ginkgo biloba grubunun 35. gündeki Trikrom Masson ile boyama görüntüsünde yaygın olarak yeşil renkte kemik spikülleri arasında kırmızı renkte kemik iliği ve az miktarda yeşil renkte kıkırdak doku içeren kırık hattı görülmekte (Trikrom Masson X20).

3.4. İSTATİKSEL BULGULAR

Yapılan istatistiksel değerlendirmede kontrol grubu ve Ginkgo biloba grubu hem kendi içlerinde ve hem de birbirleri ile karşılıklı olarak incelendi. Karşılaştırmada Mann-Whitney U testi, zamansal değişim ise Friedman varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon testi) kullanılarak incelenmiştir. Lane-Sandhu sistemine göre yapılan değerlendirme sonucunda elde edilen veriler aşağıda gösterilmektedir (Tablo 17, 18, 19, 0):

Tablo 17: Radyolojik olarak kemik oluşumu bakımından elde edilen istatistiksel verilerin dağılımı

	Kemik oluşumu 7. gün	Kemik oluşumu 21. gün	Kemik oluşumu 35. gün	P
1. Ortopedist				
Gb	1(1-2)	2(1-3)	2,5(2-3)	0,019
K	1(0-2)	2(2-3)	3(2-4)	0,004
P	0,424	0,567	0,480	
2. Ortopedist				
Gb	3(2-4)	3(3-4)	4(1-4)	0,878
K	2,5(1-3)	3(2-3)	3(1-4)	0,401
P	0,076	0,018*	0,534	

*: Kontrol ve Ginkgo biloba grupları arasında 21. Günde 2. Ortopedistin değerlerine göre kemik oluşumu bakımından Mann-Whitney U testi ile istatistiksel anlamlılık bulundu (p=0,018).

Tablo 18: Radyolojik olarak kaynama bakımından elde edilen istatistiksel verilerin dağılımı

	Kaynama 7. gün	Kaynama 21. gün	Kaynama 35. gün	P
1. Ortopedist				
Gb	2(0-4)	2(2-4)	2(2-4)	0,074
K	2(0-4)	2(2-2)	2(0-4)	0,951
P	0,680	0,143	0,903	
2. Ortopedist				
Gb	2(0-4)	2(2-4)	4(0-4)	0,368
K	2(0-2)	2(2-2)	2(0-4)	0,646
P	0,199	0,143	0,174	

Tablo 19: Radyolojik olarak yeniden yapılanma bakımından elde edilen istatistiksel verilerin dağılımı

	Yeniden yapılanma 7. gün	Yeniden yapılanma 21. gün	Yeniden yapılanma 35. gün	P
1. Ortopedist				
Gb	0(0-2)	2(2-4)	2(2-4)	0,009
K	0(0-2)	2(2-4)	2(2-4)	0,015
P	1,000	1,000	0,602	
2. Ortopedist				
Gb	2(0-4)	2(2-4)	4(0-4)	0,180
K	2(0-2)	2(2-4)	2(0-4)	0,589
P	0,464	0,535	0,174	

Tablo 20: Radyolojik olarak toplam değerler bakımından elde edilen istatistiksel verilerin dağılımı

	Toplam 7. gün	Toplam 21. gün	Toplam 35. gün	P
1. Ortopedist				
Gb	3(1-8)	6(5-11)	8(6-12)	0,008
K	3(1-8)	6(6-9)	7(4-12)	0,095
P	0,957	0,650	1,000	
2. Ortopedist				
Gb	7(2-12)	7(7-12)	12(1-2)	0,595
K	6,5(1-7)	7(6-9)	7(1-12)	0,453
P	0,124	0,063	0,377	

Grupların kendi içlerinde zamansal olarak değerlendirilmesinde kullanılan Friedman varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon testi) testi sonucunda elde edilen değerler arasındaki istatistiksel anlamlılık, kırığın radyolojik olarak iyileşme sürecinin aksamadan sürdüğünü göstermektedir. Grupların karşılıklı kıyaslamalarında ise 2. Ortopedistin verileri ışığında 21. günde Gb grubu ile K grubu arasında Gb grubu lehine istatistiksel anlamlılık bulundu ($p < 0,018$).

Histolojik bulgular incelendiğinde; kontrol ve Ginkgo biloba gruplarının kendi içinde Friedman varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltilmeli Wilcoxon testi) testi kullanılarak yapılan karşılaştırmalarında, yedinci, yirmibirinci ve otuzbeşinci günler arasında anlamlı düzeyde bir artış saptandı. Bu artış her iki grupta da 7. ve 21. günler arasında, 7. ve 35. günler arasında ve 21. ve 35. günler arasındaki sonuçlardan kaynaklandı ($p < 0,0005$). Bu da bize histolojik olarak kırık iyileşmesinin, hem kontrol hem de Ginkgo biloba grupları için, zaman içerisinde aksamaya uğramadan devam ettiğini gösterdi.

Gb ve K gruplarının karşılıklı kıyaslanmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Buna göre Gb 1 ve K 1 gruplarının (yedinci gün) karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0,535$). Gb 2 ve K 2 gruplarının (yirmibirinci gün) karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p = 0,009$). Yine Gb 3 ve K 3 gruplarının (otuzbeşinci gün) karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p = 0,001$).

Tablo 21: Huo histolojik puanlama sistemine göre elde edilen istatistiksel verilerin dağılımı

	Histoloji 7. gün	Histoloji 21. gün	Histoloji 35. gün	P
Gb	2(1-2)	6(5-7)	8,5(7-10)	0,008
K	2(1-2)	5(4-6)	6(6-7)	0,095
P	0,535	0,009	0,001	

Bu bulgular ışığında radyolojik olarak Ginkgo biloba kullanımının kırık iyileşmesi üzerine istatistiksel olarak 21. günde anlamlı bir etkisi olduğu saptanmıştır. Histolojik bulgulara göre ise 7.gün sonuçlarında Ginkgo biloba grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Ancak 21. ve 35. günlerde Ginkgo biloba kullanımının kırık iyileşmesini önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Kırık iyileşmesi, halen Ortopedi ve Travmatoloji'nin ayrıntıları tam olarak çözülemeyen konularından biridir. Kırık iyileşmesini etkileyen etkenler ve iyileşmenin hızlandırılması araştırmacıların üzerinde çalıştığı konulardan biridir. Özellikle kırık iyileşmesini hızlandırmak için çok çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Tekrarlayan tedavi gereksinimleri, işgücü kaybı, morbidite artışı ve tedavi maliyetlerinin artması nedeniyle kırık iyileşme sürecini hızlandırmak, kaynama oranlarını en üst düzeye çıkararak kişiyi en kısa sürede normal hayatına döndürmek için birçok yöntem ve ilaç denenmiş ve bir kısmı klinikte kullanım alanı bulmuştur.

Kırık iyileşmesi hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve ekstrasellüler matriksin birbirleriyle mükemmel bir işbirliğini kapsayan, iskelet büyüme ve gelişmesini özetleyen bir süreçtir (26,43). Hücresel düzeyde inflamatuvar hücreler, vasküler hücreler, osteokondral progenitör hücreler ve osteoklastlar onarım sürecinde önemli rol oynarlar. Moleküler düzeyde ise proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri, proosteojenik faktörler ve anjiogenik faktörler kırık onarımında önemli rol oynarlar (44).

Başarılı kırık iyileşmesi iç içe geçmiş aşamalardan oluşur. Bu aşamalar inflamasyon ile başlar, intramembranöz ossifikasyon, kondrogenesis, endokondral ossifikasyon ile devam eder ve yeniden yapılanma süreci ile tamamlanarak skarsız bir onarım ile sonuçlanır (45,46). Osteoblastlar kırık hattının proksimal ve distal tarafındaki periostal kenarlardan intramembranöz ossifikasyonu başlatırken, aynı zamanda yumuşak kallusu oluşturacak kırıkta depolanmasını ise kırık bölgesindeki kondroblastlar başlatır. Daha sonra yumuşak kallus kondrositlerin hipertrofiye olmaları ve apoptozise gitmeleriyle endokondral ossifikasyonu oluşturur (43).

Kırık iyileşmesini hızlandırmak için bir çok ilacın etkisi incelenmiş ve incelenmektedir. Bunlardan bir kısmı kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilerken bir kısmı da olumsuz yönde etkilemektedir. Sık kullanılan ilaçların kırık iyileşmesi üzerine etkileri literatürde önemli bir yer tutmaktadır.

Nonsteroid Anti inflamatuvar ilaçların (NSAİ) büyük bir bölümünün kırık iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkileri neredeyse kesinleşmiştir (46-48).

Yapılan deneysel bir çalışmada Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan Levodopa ve Levodopa-Carbidopa kombinasyonunun kırık iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiş, Levodopa'nın tek başına kullanıldığında kaynamayı hızlandırdığı ancak Levodopa-Carbidopa kombinasyonunun kaynama üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (49).

Kolesterol düşürücü ilaçlardan özellikle Simvastatin'in kırık iyileşmesini hızlandırdığını gösteren yayınlar son zamanlarda artmaktadır. Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, Simvastatin'in erken dönemde kırık iyileşmesini arttırdığı radyolojik, histolojik ve biyomekanik olarak gösterilmiştir (50). Adah ve arkadaşlarının (51) yaptığı başka bir çalışmada ise, rat femurlarında oluşturulan kemik defektlerinin statin kullanılması sonrası yapılan histolojik inceleme sonucunda azaldığı ve kaynamanın kontrol gruplarına göre arttığı gösterilmiştir. Statinin kemik yapım faaliyetini hızlandırdığı belirtilmektedir. Erdemli ve arkadaşlarının yaptıkları iki çalışmada (52, 53), Simvastatin'in ratlarda oluşturulan kırık modelinde kırık iyileşmesini hızlandırdığı histolojik olarak gösterilmiştir.

Bir aminoasit olan glutaminin kırık iyileşmesi üzerine etkisi ratlar üzerinde incelenmiş ve histolojik olarak iyileşmeyi azda olsa arttırdığı gösterilmiştir (54).

Tavşanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, oluşturulan kemik defektlerine hyaluronik asit ile muamale edilmiş kemik greftleri uygulanmış ve histolojik olarak kaynama incelenmiştir. Kontrol deneklerine göre hyaluronik asitle muamele edilmiş greftlerde kaynamanın anlamlı düzeyde fazla olduğu bulunmuştur (55).

Nitrik oksit'in ratlarda oluşturulan hayvan modelinde kırık iyileşmesini radyolojik ve histolojik olarak arttırdığı gösterilmiştir (56).

Kemik iyileşmesi üzerine amniyotik sıvının etkisi incelenmiş, bu amaçla tavşan kalvaryumlarında defekt oluşturularak defekt sahasına, izotonik sodyum klorür solüsyonu ve amniyotik sıvı enjeksiyonları yapılmıştır. Amniyotik sıvı uygulanan defektlerdeki kemik iyileşmesinin diğer gruplara göre histolojik olarak daha fazla olduğu izlenmiştir (57).

Günümüzde immün sistem hastalıklarında sıklıkla kullanılan steroidler kırık iyileşmesini uzun süreli kullanımda olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan deneysel bir çalışmada ise kısa süreli sistemik steroid kullanımının kırık iyileşmesi üzerine belirli bir etkisi saptanmamıştır (58).

Ailevi Akdeniz Ateşi tedavisinde ve heterotopik ossifikasyon profilaksisinde kullanılan Kolşisin'in kaynamayı engellediği ve kemiğin dayanıklılığını azalttığı histolojik ve radyolojik olarak gösterilmiştir (59).

Lokal olarak kırık bölgesine uygulanan Vasküler Endoteliyal Growth Faktör'ün hem angiogenezisi, hem de kırık iyileşmesini hızlandırdığı Street ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (60).

Ortopedi ve Travmatoloji'nin en önemli sorunlarından biri de enfeksiyonlardır. Özellikle açık kırıklar sonrası ortaya çıkan enfeksiyon, hem kırık iyileşmesini geciktirmekte hem de sistemik sorunlara yol açabilmektedir. Bu tür yaralanmalarda antibiyotik tedavisi zorunludur. Kapalı kırıkların cerrahi tedavisi öncesinde de enfeksiyonu önlemek için antibiyotik profilaksisi yapılmaktadır. İşte bu antibiyotiklerin de kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri söz konusudur. Huddleston ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada femur kırıkları sonrası uygulanan Sefazolin ve Siprofloksasin'in kırık iyileşmesi üzerine olan etkileri radyolojik, histolojik ve biyomekanik olarak incelenmiştir. Hiç ilaç tedavisi almayan grupta kaynama en hızlı bulunmuştur. Sefazolin alan gruptaki kaynama oranı kontrol grubuna yakın olarak tespit edilmiştir. En geç kaynama ise Siprofloksasin grubunda saptanmıştır (61). Kinolon grubunun diğer antibiyotikleri olan Levofloksasin ve Trovafloksasin ile yapılan benzer bir deneysel çalışmada bu ilaçların kırık iyileşmesini geciktirdikleri gözlenmiştir (62). Sık kullanılan antibiyotiklerden biri olan Gentamisin'in de kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilediğine dair yayınlar mevcuttur (63).

Kırık iyileşmesini hızlandırmak amacıyla çeşitli faktörler de araştırılmaktadır. Günümüzde en ilgi çeken ajanlardan biri BMP (Bone Morfogenik Protein)'dir (64). Rekombinant BMP-2'nin yapılan deneysel çalışmalarda kemik iyileşmesini hızlandırdığı bulunmuştur (65,66). Kaynamama ve geç kaynama durumlarında BMP klinik olarak kullanılmaya başlanmıştır (67).

Kırık iyileşmesini hızlandırmak için yapılan çalışmaların bir kısmı da sitokinler ve büyüme faktörleri üzerinedir. Kaygusuz ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Granülosit Koloni Stimule Edici Faktör (G-CSF) ve Naproksenin rat tibialarında oluşturulan kırık modeli üzerine etkilerini ve bunların serum TGF- β 1 ile olan ilgisini araştırmışlardır. Bu çalışmada kırık iyileşmesi ile serum TGF- β 1 düzeyinin uyumlu olduğu gösterilmiştir. Tek başına Naproksen kullanımının kırık iyileşmesini geciktirdiği, G-CSF kullanımının kaynamayı hızlandırdığı ve G-CSF ile Naproksen kullanımının kontrol grubuna göre bir fark yaratmadığı bulunmuştur (68).

Türk ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada E vitaminin kırık iyileşmesi üzerine etkisi incelenmiş ve olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (69).

Kırık iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda, oluşturulan kırık modelinin de oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (45,70,71). Kapalı basit kırık, açık osteotomi şeklinde oluşturulan kırık, kaynamama modeli ve segmental kırık modelleri kullanılabilir. Kırığın yapısı ve koşullar; ortamdaki hücrelerin çeşitliliği, endojen büyüme faktörlerinin yoğunluğu ve hücrelerdeki reseptör oranı üzerinde oldukça etkilidir (70,72). Kapalı kırık modeli literatürde birçok çalışmada kullanılmış olmasına rağmen açık osteotomi ile oluşturulan kırıkta kaynamanın geç olması ve kaynamamaya yatkınlık oluşturması nedeniyle kullanılacak tedavi yönteminin etkinliğini göstermede daha başarılı olabileceği belirtilmiştir (71). Biz de bu doğrultuda çalışmamızda cerrahi diseksiyon sonrası açık osteotomi ile kırık oluşturduk.

Çalışmamızda kullandığımız Ginkgo biloba'nın daha önce yapılan çalışmalarda bir çok etkisi gösterilmiştir. Bu etkileri şöyle sıralanabilir:

Ginkgo biloba'nın metabolik ve nörohormonal düzenleyici mekanizmalar yoluyla vasküler yapı, kan elemanları ve diğer vücut sıvılarında etkinliğinin olduğu

düşünülmektedir. Bu mekanizmaların iskemik serebrovasküler olaylarda kombine olarak çalıştığı ve çoklu etkinliğinin rol oynadığı düşünülmektedir (73).

Ginkgo biloba'nın kan viskozitesini azaltarak ve kan akımını arttırarak vazoregülatör etki yaptığı belirtilmektedir. Bu etki 60 hastada yapılan bir çalışmada ciltte gösterilirken, 10 hastada yapılan bir diğer çalışmada ise tırnak yatağında kan akım hızının arttığı fakat viskozitenin değişmediği saptanmıştır (74,75). Özellikle ginkgolide B'nin platelet aktive edici faktör'ü (PAF) antagonize ederek antiagregan etki yaptığı bildirilmiştir. Bu şekilde Ginkgobiloba PAF'in trombosit agregasyonunu uyarıcı, nötrofillerde degranülasyon ve oksijen radikali üretimini arttırıcı etkilerini azaltmaktadır (76,77). Ginkgo biloba'nın superoksid anyonlarını temizleyici etkisi ile "endotelium derived relaksing factor"un (EDRF) yarı ömrünü uzattığı bu yolla güçlü vazorelaksan ve antiagregan etki ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (78).

Kladikasyo intermittans hastalarında Ginkgo biloba'nın, lokal arteryel ve kapiller perfüzyon değişiklikleri ile ilişkisini gösterecek şekilde transkutanöz oksimetri ve doppler değerlerinde düzelme meydana getirdiği izlenmiştir (79,80). Yine Ginkgo biloba tedavisi sonucu oküler kan akım hızında belirgin artış saptanmıştır. Doppler ile yapılan bu çalışmada oftalmik arterin diastol sonu akım hızında artış olurken, arteriel kan basıncı, kalp hızı ve göz içi basınçta değişiklik olmadığı gözlenmiştir (81).

Serebrovasküler kan akımında azalmaya bağlı semptomları olan yaşlı hastalarda Ginkgo biloba ile yapılan bir çok çalışmada tedavi ile belirti ve bulgularda anlamlı azalmalar olduğu bildirilmiştir. 1989 da Vorberg G. Ginkgo biloba tedavisi ile konsantrasyon ve hafızada düzelme, başağrısı, anksiyete ve tinnitusta azalma, dizzines hissinde düzelme gözlemlemiştir (82).

Ginkgo biloba ekstrelerinin yaşlı hastaların konsantrasyon ve hafıza sorunları, enerji eksikliği ve yorgunluk durumlarında, anksiyetede ve depresif şikayetlerde, baş dönmesi ve kulak çınlamasında düzeltici etkileri olduğu belirtilmiştir. Ginkgo biloba tedavisi ile serebral yetmezlik bulgularının hepsinde önemli düzeyde, olumlu yönde farklılıklar saptanmıştır. İlaç olarak dejeneratif yada multi infarkt demansta da kullanılmaktadır (78).

Ginkgo biloba'nın güçlü antioksidan özellikleri vardır. Ortamda bulunan süperoksit, hidroksil ve peroksit radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak hücreleri lipid ve protein oksidasyonuna karşı korurlar (83).

Ginkgo biloba ekstresi (EGb 761), C vitamini, E vitamini gibi antioksidanların, yaşlanma ile mtDNA'da meydana gelen oksidatif hasarı ve mitokondriyal glutatyon oksidasyonunu engellediği saptanmıştır. Ayrıca beyin ve karaciğer mitokondrilerinde yaşlanma ile meydana gelen morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri azalttığı gösterilmiştir (84).

Oksidatif stresin oluşturduğu endotelial hücre hasarının önlenmesinde Ginkgo bilobanın tedavi edici etkileri vardır. Son çalışmalarda EGb 761'in nöron, miyosit ve vasküler endotelial hücreler üzerine koruyucu etkileri ile serebral, kardiyak ve pulmoner hastalıklarda tedavi edici olduğu bildirilmektedir (85-88).

Ginkgo biloba ekstresi'nin gentamisin nefrotoksitesisi gibi başka ilaçların oksidatif yolla oluşturduğu toksik yan etkilere karşı koruyuculuğu olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (89).

Ginkgo biloba ekstresi, dokularda kan dolaşımını artırarak hücrelerin oksijen alımını artırır ve ortamda bulunan toksinlerin temizlenmesini sağlar (86).

Ginkgo biloba'nın spinal kord sinir hücrelerini oksidatif stres sonucu oluşan apoptozisten koruduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde hipoksinin neden olduğu endotelial bozuklukların Ginkgo biloba ekstresi ile kısmen iyileştirilebileceği, bu bozukluklara karşı ise tam bir koruma sağlayabileceği belirtilmiştir (90).

Kontrollü olarak yapılan iki çalışmada ölümlerle sonuçlanabilecek yüksek irtifa hipoksisinden korunmak amacıyla Ginkgo biloba preparatları kullanılmıştır. Aşamalı olarak 5000 m. yüksekliğe çıkarılan insanlarda Ginkgo bilobanın koruyucu etkisi kanıtlanmıştır. Hızlı bir şekilde 4100 m. yüksekliğe çıkarılan insanlarda ise bu preparatın, akut dağ hastalığına karşı %50 oranda koruyuculuğu olduğu gösterilmiştir (91).

Ginkgo biloba'nın bir diğer etkisi ise cGMP fosfodiesterazı inhibe ederek endoteliumda gevşemeye neden olmasıdır (92,93). Ayrıca hipokampusta kolin alımını

uyarır ve alfa-adrenoseptörler ile muskarinerjik kolinoseptörlerin yaşa bağlı azalmasını inhibe eder (94,95).

Ginkgo biloba (EGb761)'nin PAF (platelet aktive edici faktör) inhibitörü olması, antioksidan özelliklerinin bulunması ve serbest oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştırarak vasküler gevşeme (relaksasyon) sağlaması, kanın viskozitesini azaltarak dokuların kanlanması ve oksijenlenmesini artırması nedeniyle kırık iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceği varsayılarak bu çalışma planlanmıştır. Ayrıca kırık bölgesine kan akımının artması ile onarım sürecinde rol alan medyatör ve sitokinlerin kırık bölgesine taşınarak yoğunluklarının artacağı düşünülmüştür. Bu amaçla literatürü taradığımızda böyle bir çalışmanın daha önce yapılmadığını gördük.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz radyolojik verileri değerlendirdiğimizde; 21. gündeki 2. Ortopedistin skorlarında Gb 2 ile K 2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p=0,018$). Ancak 1. Ortopedistin değerlerinde ise anlamlı bir fark yoktu.

Gb ve K gruplarının kendi içlerinde, zamansal olarak radyografik verilerini değerlendirdiğimizde kırık iyileşmesinin beklenen ilerleyişinin sürdüğünü gördük, bu da bize gerek uyguladığımız cerrahi tekniğin gerekse Ginkgo biloba'nın kırık iyileşme sürecine olumsuz bir etkisinin olmadığını düşündürdü.

Histolojik sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde ise; 7. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken, 21. ve 35. günlerde Ginkgo biloba'nın kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğine dair istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu gördük.

Ayrıca histolojik olarak 35. gündeki tüm grupların 21. gündeki gruplara göre daha fazla iyileşme göstermesi; 21. gündeki gruplarında 7. gündeki gruplara göre daha fazla iyileşme göstermiş olması bize çalışmanın uygun şekilde düzenlendiğini göstermektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ışığında, Ginkgo biloba'nın özellikle 21. ve 35. günlerde kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilemesinin mekanizması tam olarak belli değildir. Ancak kan dolaşımını ve oksijenizasyonu artırması nedeniyle kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini düşünmekteyiz.

Ginkgo biloba'nın kırık iyileşmesi üzerine görülen olumlu etkisinde uygun dozun bulunması için doz-etki çalışmalarının yapılması gerektiğinin, bunun yanı sıra oluşan kırık iyileşme dokusu üzerine biyomekanik çalışmaların yapılarak kallusun mekanik özelliklerinin de araştırılmasının daha uygun olacağı kanaatindeyiz. Ginkgo biloba'nın kırık iyileşmesindeki etki mekanizmasının açıklanmaya çalışılması için daha ileri düzeyde çalışmaların yapılması da gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Ginkgo biloba kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkilerini tespit etmek üzere düzenlenen bu çalışmada, sonuçlar radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmiştir. Ginkgo biloba verilen ve verilmeyen gruplar hem kendi aralarında hem de birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Deneysel çalışmamız sonucunda;

1- Radyolojik incelemede Lane-Sandhu skorlama sistemi kullanılmıştır. Kontrol grubunun radyolojik sonuçlarının zamana bağlı değişimi kendi aralarında karşılaştırıldığında özellikle kemik oluşumu ($p=0,004$) ve yeniden yapılanma ($p=0,015$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Bu farkın oluşmasının en büyük nedeni 7. ve 21. gün sonuçları ile 7. ve 35. gün sonuçları arasında yapılan karşılaştırmadır. Bu sonuç kaynama olayının beklendiği gibi zamanla giderek arttığını göstermektedir. Ginkgo biloba grubunun radyolojik sonuçlarının zamana bağlı değişimi kendi aralarında karşılaştırıldığında ise özellikle kemik oluşumu ($p=0,019$), yeniden yapılanma ($p=0,009$) ve toplam sonuçlar ($p=0,008$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Bu farkın oluşmasının en büyük nedeni yine 7. ve 21. gün sonuçları ile 7. ve 35. gün sonuçları arasında yapılan karşılaştırmadır. Bu sonuç da bize kaynama olayının beklendiği gibi zamanla giderek arttığını göstermektedir.

2- Ginkgo biloba grubu ve kontrol grubunun radyolojik olarak her bir zaman için karşılaştırılması yapıldığında ise özellikle 2. Ortopedistin 21. gündeki değerleri incelendiğinde kemik oluşumu bakımından Ginkgo biloba lehine olumlu yönde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,018$).

3- Histolojik sonuçlar Huo ve arkadaşları tarafından tarif edilen 10 basamaklı bir skalaya göre yapılmıştır. Kontrol ve Ginkgo biloba grupları kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ortalama sonuçları; yedinci gün 1,75, yirmi birinci gün

4,75 ve otuz beşinci günde ise 6,125 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,0005$). Radyolojik sonuçlarda olduğu gibi zaman içinde giderek artan bir durum söz konusudur. Bize kaynama olayının beklendiği gibi zamanla giderek arttığını göstermektedir. Ginkgo biloba verilen grupta ise sonuçlar yedinci gün 1,875, yirmi birinci gün 5,875 ve otuz beşinci gün ise 8,5 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,0005$). Radyolojik sonuçlarda olduğu gibi zaman içinde giderek artan bir durum söz konusudur. Bize kaynama olayının beklendiği gibi zamanla giderek arttığını göstermektedir.

4- Ginkgo biloba grubu ve kontrol grubu histolojik sonuçları her bir zaman için karşılıklı olarak kıyaslandığında ise yedinci günde Ginkgo biloba grubunun puanı daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Ancak hem yirmi birinci günde hem de otuz beşinci günde gruplar kıyaslandığında Ginkgo biloba lehine olumlu yönde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (21. gün için $p = 0,009$ ve 35. gün için $p = 0,001$).

Bu sonuçlar bize Ginkgo biloba kullanımının kırık iyileşmesini hızlandırdığını göstermiştir. Çalışmamızın başında Ginkgo biloba'nın kanın viskozitesini azaltarak dokuların kanlanması ve oksijenlenmesini arttırması, antioksidan özelliklerinin bulunması ve serbest oksijen radikallerini ortamdan uzaklaştırarak vasküler gevşeme (relaksasyon) sağlaması nedeniyle kırık iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceği düşünülmüştü. Sonuçlarımız bu hipotezle uyumlu bulunmuştur. Ancak Ginkgo biloba'nın kırık iyileşmesindeki etki mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için daha ileri düzeyde çalışmaların yapılması da gerekmektedir.

7. ÖZET

GİNGKO BİLOBA (EGb 761)' NİN SIÇANLARDA

KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ginkgo biloba ekstresi (EGb 761) Ginkgo biloba ağacının yapraklarından elde edilen bir bitki özütüdür. Platelet aktive edici faktörü (PAF) antagonize eden, serbest radikal uzaklaştırıcı eki gösteren, antioksidan özellikleri olan ve vasküler gevşeme sağlayan bir moleküldür. Kanın viskozitesini azaltarak dokuların kanlanmasını ve oksijenlenmesini artırır. Bu özellikleri nedeniyle klinikte demans, vertigo, tinnitus, kladikasyo intermitans gibi iskemik hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Ginkgo biloba'nın kırık iyileşmesi üzerine etkileri, rat femurlarında deneysel kırık modeli oluşturularak histolojik ve radyolojik olarak değerlendirilmiştir. Denek olarak 48 adet, ortalama ağırlıkları 224 gr (195-252 gr) olan, 20 haftalık Spraque Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, 1 haftalık uyum döneminden sonra rastgele seçilmiş 8'erli 6 gruba ayrıldı. Gb 1; 7 gün, Gb 2 ; 21 gün, Gb 3 ise 35 günlük deney grubu olarak belirlendi. Kontrol grubu olarak K1; 7 gün, K2 ;21 gün, K3 ise 35 günlük deney grubu olarak belirlendi. Ratların sağ femurlarında anestezi altında kırık oluşturuldu ve internal tespit yerleştirildi. Gb grubuna 60mg/kg EGb 761 orogastrik yolla günde 1 kez verildi. K grubuna ise EGb 761 verilmeyerek kontrol grubu olması sağlandı. Gb1 ile K1 grubu 7. günde, Gb2 ile K2 grubu 21. günde, Gb3 ile K3 grubu 35. günde sakrifiye edilip sağ femurlarındaki kırık hattında bulunan kaynama dokusu, radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilerek gruplar arası karşılaştırmaları yapıldı.

Histolojik değerlendirmede Ginkgo biloba'nın gerek 21. gündeki gerekse 35. gündeki gruplarda kırık iyileşmesini hızlandırdığını tespit ettik. Radyolojik değerlendirmede ise özellikle 21. gündeki Ginkgo biloba grubunun kontrol grubuna göre daha fazla iyileşme gösterdiğini gözlemledik.

Sonuç olarak histolojik ve radyolojik değerlendirmelerde orogastrik yolla uygulanan Ginkgo biloba'nın, kırık iyileşmesini arttırdığını tespit ettik. Bir çok olumlu etkisi ispatlanmış olan Ginkgo biloba'nın kırık iyileşmesinde de olumlu bir etkisinin olabileceğini düşünüyoruz. Bu çalışma bu yönde yapılmış ilk deneysel çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Kırık, Kırık iyileşmesi, Ginkgo biloba ekstresi (EGb 761)

8. SUMMARY

EFFECTS OF GINKGOBILOBA (EGB 761) ON FRACTURE HEALING IN RATS

Ginkgo biloba extract (EGB 761) is a plant extract obtained from the leaves of Ginkgo biloba tree. It is a molecule with antioxidant characteristics which antagonises Platelet activating factor (PAF), removes free radicals and enables vascular relaxation. It enhances the blood supply and oxygenation of tissues by decreasing the viscosity of blood. Due to these characteristics, it is used for treatment aim in ischemic diseases such as dementia, vertigo, tinnitus and claudicatio intermittance.

In the present study, the effect of Ginkgo biloba on the healing of fractures was investigated histologically and radiologically by forming an experimental fracture model in rat femurs. As subjects of 48, average weight 224 g (range, 195 to 252 g), which, 20-week female Sprague Dawley rats were used. After an adaptation period of 1 week, rats were randomised into 6 groups with 8 rats in each one. Gb 1 was the 7 days , Gb 2 21 days experiment and Gb 3 35 days experiment group. There were also three control groups: namely 7, 21 and 35 days groups. On the right femurs of rats, fracture was created under anesthesia and internal fixation was made. In Gb groups, 60 mg/kg EGB 761 was administered once a day via orogastric route. It was not administered to control groups. On 7. day Gb1 and K 1 groups, on 21. day Gb 2 and K 2 groups, and on 35. day Gb 3 and K 3 groups were sacrificed and union tissue on the fracture line on right femurs was analysed histologically and radiologically and inter group comparisons were made.

In histological evaluation, it was established that Ginkgo biloba accelerated fracture healing both on 21 and 35 day groups. In radiological evaluation, especially on 21 day group Ginkgo biloba led to higher rate of improvement compared to control group.

In conclusion, it was established that Ginkgo biloba administered orogastrically enhanced healing of fractures in histological and radiological evaluations. It is our suggestion that Ginkgo biloba, with many proven favorable effects, may have positive effects in the healing of fractures. This study is the first experimental study in this direction.

Key words: Fracture, Fracture healing, Ginkgo biloba extract (EGB 761)

9. KAYNAKLAR

- 1) Schutte A, Topp SA, Knoefel WT, Brilloff S, Mueller L, Rogiers X, Gundlach M: Influence of ginkgo biloba extract (EGb761) on expression of EGR-1 mRNA and hsp-70 mRNA after warm ischemia in the rat liver. *Transplant Proc*, 33: 3724-3725, 2001.
- 2) Christen Y, Maixent JM: What is Ginkgo biloba Extract EGb 761? An overview from molecular biology to clinical medicine. *Cell Mol Biol*, 48: 601-611, 2002.
- 3) Pietri S, Maurelli E, Drieu K, Culcasi M: Cardioprotective and antioxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 833-842, 1997.
- 4) Kızgın S, İlhan A, Özişik HI, Özcan C: Vertebro baziler yetmezlikte Ginkgo biloba ekstralarının transkraniyal doppler ultrasonografi ile değerlendirilmesi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 10: 63-66, 2003.
- 5) Orhan İ, Hayıt H, Duksal İ, Özercan İH, Fırdolaş F, Semerciöz A: Tek taraflı testis torsiyonunda PAF antagonistinin karşı taraf testisin iskemik hasarındaki koruyucu etkinliği. *Türk Üroloji Dergisi*, 30:11-16, 2004.
- 6) Köse K, Doğan P, Aşçıoğlu M, Aşçıoğlu O: In vitro antioxidant effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in erythrocytes of Behçet's patients. *Jpn J Pharmacol*, 75: 253-258, 1997.
- 7) Sierpina VS, Wollschlaeger B, Blumenthal M: Ginkgo biloba. *Am Fam Physician*, 68: 923-926, 2003.
- 8) Brond AR, Rubin TC: Fracture Healing. In: *Surgery of the Musculoskeletal System*. Churchill Livingstone, New York, 1990, pp. 93-114.
- 9) Khan SN: Bone growth factors. *Orthop Clin North Am*, 31: 375-388, 2000.
- 10) Miller MD: Bone. In: Miller M (Ed) *Review of Orthopaedics*. Saunders, Philadelphia, 1996, pp. 1-22.
- 11) Gartner LP, Hiatt JL: Cartilage and Bone. *Color Textbook of Histology*. Saunders, Saint Louis, 1997, pp. 114-130.
- 12) Cruess RL: Healing of bone, tendon and ligament In: *Fractures*. Philadelphia, Lippincott Company, 1984, pp. 147-167.

- 13) Kılıçoğlu SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 55:143-150, 2002.
- 14) Jungueria CL, Carnerio J, Kelley O: Bone. In: Basic Histology. Appleton and Lange, New Jersey, 1995, pp. 132-151.
- 15) Brinker MR, O'Connor D: Kemik. In: Miller M (Ed) Miller'ın Ortopedi Kitabı (Çev. Yetkin H, Yazıcı M). Adya, Ankara, 2006, s. 1-44.
- 16) Junqueira LC and Carneiro J: Temel Histoloji (Çev. AYTEKİN Y, SOLAKOĞLU S). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006, s. 141-159.
- 17) Gartner LP, Hiatt JL: Color Textbook of Histology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001, pp. 134-154.
- 18) Kierszenbaum AL: Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Çev. Demir R). Palme Yayıncılık, Ankara, 2006, s. 118-145.
- 19) Gil FTH, Gracia MAA, Pingarron MC, Jerez LB: Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 11: 47-51, 2006.
- 20) Schenk RK: Biology of fracture. In: Browner B, Jupiter J, Levine A, Trafton P (eds) Skeletal Trauma, Saunders, Philadelphia, 2003, pp. 29-74.
- 21) Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology-II. In Pritchard DJ(ed). Instructional Course Lectures AAOS, 41:387-399, 1996.
- 22) Gil FTH, Gracia MAA, Pingarron MC, Jerez LB: Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 11:151-157, 2006.
- 23) Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh JL: Bone and joint healing. In Bucholz RW, Heckman JD (eds). Fractures in Adults. Lippincott Co, Philadelphia 2001, pp. 245-271.
- 24) Wilkins K: Travma. In: Lynn Staheli (Ed) Pediatrik Ortopedi (Çev. Yalçın S). Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, 2005, s. 203-260.
- 25) Us AK: Kırıklar hakkında genel bilgiler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü Ders Notları, Ankara, 2005.
- 26) Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res, 355: 7-21, 1998.
- 27) Phillips AM: Overview of the fracture healing cascade. Injury, 36:5-7, 2005.
- 28) Cornell CN, Lane JM: Newest factors in fracture healing. Clin Orthop Relat Res, 277:297-311, 1992.

- 29) McKibbin B: The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg*, 60B:150-162, 1978.
- 30) Bucholz RW, Heckman JD, Court-Brown C: *Rockwood and Green's Fractures in Adults*. Sixth ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2006, pp. 297-330.
- 31) Weinstein SL, Buckwalter JA: *Turek Ortopedi ilkeler ve Uygulamaları* (Çev. Alpaslan AM) Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009, s. 57-71.
- 32) Miller MD: *Miller'in Ortopedi Kitabı* (Çev. Yetkin H ve Yazıcı M) Akademi Doktorlar Yayınevi, Ankara, 2006, s. 1-23.
- 33) Ozaki A: Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 5:64-70, 2000.
- 34) Yılmaz C, Erdemli E, Selek H, Kınık H, Arıkan M: The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. *Arch Trauma Surg* 121: 426-428, 2001.
- 35) Brond AR, Rubin TC. *Fracture Healing*. In: *Surgery of the Musculoskeletal System*. Churchill Livingstone, New York, 1990, pp. 1: 93-114.
- 36) Wood G: General principles of fracture treatment. In: Canale (Ed) *Campell's Operative Orthopaedics*. Mosby, Philadelphia, 2003, pp. 2669-2724.
- 37) Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M: *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1998, s. 121.
- 38) Demirözer O: *Tedavide Kullanılan Bitkiler "FFD Monografıları"*. 1. Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri, 2007.
- 39) Odyakmaz B: *Deneysel Hipokside Ginkgo Glikozitlerinin Sitoprotektif Etkisi*. Yüksek Lisans. Gazi Üniversitesi, Ankara, 1994.
- 40) Kayaalp OS: *Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Feryal Matbaacılık, Ankara, 1998, s. 470.
- 41) Lane JM, Sandhu HS: Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*, 18: 213-225, 1987.
- 42) Huo MH, Troiano NW: The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res*. 9: 383-390, 1991.
- 43) Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA: Fracture healing as a postnatal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*, 88: 873-884, 2003.
- 44) Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA: Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*, 14: 1805-1815, 1999.

- 45) Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, 355 Supp: 56-65, 1998.
- 46) Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG: Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*, 19: 459-466, 2008.
- 47) Akman Ş, Göğüş A, Şener N, Bilgiç B, Aksoy B: Sıçan tibia kırıklar sonrası uygulanan diklofenak sodyum'un kırık kaynaması üzerine etkileri. *Hacettepe Ortopedi Dergisi*, 11:55-60, 2001.
- 48) Şener N, Akman Ş, Göğüş A, Bilgiç B. Sıçan tibia diafiz kırıklarında kalsiyum sülfatın kırık iyileşmesi üzerine etkileri. *Acta Ortop Traumatol Turc*, 35: 431-437, 2001.
- 49) Costa ER, Weinhold P, Tayrose GA, Hooker JA, Dahners LE: The effect of levodopa or levodopa-carbidopa (sinemet) on fracture healing. *J Orthop Trauma*, 20: 470-475, 2006.
- 50) Saraf SK, Singh A, Garbyal RS, Singh V: Effect of simvastatin on fracture healing-an experimental study. *Indian J Exp Biol*, 45: 444-449, 2007.
- 51) Adah F, Benghuzzi H, Tucci M, Russell G, England B: Cholesterol production inhibitor (statin) increased bone healing in surgically created femoral defect in an animal model. *Biomed Sci Instrum*, 43: 95-103, 2007.
- 52) Erdemli B, Kılıçoğlu SS, Erdemli E: A new approach to the treatment of osteoporosis. *Orthopedics*, 28: 59-62, 2005.
- 53) Kılıçoğlu SS, Erdemli E: New addition to the statin's effect. *J Trauma*, 63: 187-191, 2007.
- 54) Polat O, Kılıçoğlu SS, Erdemli E: A controlled trial of glutamine effects on bone healing. *Adv Ther*, 24: 154-160, 2007.
- 55) Aslan M, Şimşek G, Dayı E: The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl*, 20: 209-220, 2006.
- 56) Baldık Y, Talu U, Altinel L, Bilge H, Demiryont M, Aykaç-Toker G: Bone healing regulated by nitric oxide: an experimental study in rats. *Clin Orthop Relat Res*, 404:343-352, 2002.
- 57) Karaçal N, Koşucu P, Çobanoğlu U, Kutlu N: Effect of human amniotic fluid on bone healing. *J Surg Res*, 129:283-287, 2005.
- 58) Aslan M, Şimşek G, Yıldırım U: Effects of short-term treatment with systemic prednisone on bone healing: an experimental study in rats. *Dent Traumatol*, 21:222-225, 2005.
- 59) Dudkiewicz I, Brosh T, Perelman M, Salai M: Colchicine inhibits fracture union and reduces bone strength :in vivo study. *J Orthop Res*, 23:877-881, 2005.

- 60) Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 23;99:9656-9661, 2002.
- 61) Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R: Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg*, 82A:161-173, 2000.
- 62) Perry AC, Prpa B, Rouse MS, Piper KE, Hanssen AD, Steckelberg JM: Levofloxacin and trovafloxacin inhibition of experimental fracture-healing. *Clin Orthop Relat Res*, 414: 95-100, 2003.
- 63) Ince A, Schütze N, Karl N, Löhr JF, Eulert J: Gentamicin negatively influenced osteogenic function in vitro. *Int Orthop*, 31:223-228, 2007.
- 64) Westerhuis RJ, van Bezooijen RL, Kloen P: Use of bone morphogenetic proteins in traumatology. *Injury*, 36:1405–1412, 2005.
- 65) Eckardt H, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hall DW, Hvid I: Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. *Injury*, 36:489–494, 2005.
- 66) Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ: A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein 2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg*, 85-A: 1425–1435, 2003.
- 67) Einhorn TA: Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg*, 85-A Suppl 3: 82–88, Review, 2003.
- 68) Kaygusuz MA, Turan CC, Aydın NE, Temel I, Fırat S, Bulut T: The effects of G-SF and naproxen sodium on the serum TGF-beta 1 level and fracture healing in rat tibias. *Life Sci*, 80: 67–73, 2006.
- 69) Türk C, Halıcı M, Güney A, Akgün H, Şahin V, Muhtaroglu S: Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. *J Int Med Res*, 32: 507–512, 2004.
- 70) Simpson AHRW, Mills L, Noble B: The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg*, 88B: 701-705, 2006.
- 71) Jackson RA, McDonald MM, Nurcombe V, Little DG, Cool SM: The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model. *J Orthop Res*, 24:636-644, 2006.
- 72) Zimmermann G, Henle P, Kiisswetter M, Moghaddam A: TGF β as a marker of delayed fracture healing. *Bone*, 36:779-785, 2005.
- 73) Mc Kenna DJ, Jones K, Hugges K: Efficacy, safety, and use Ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Healt Med*, 7: 5: 70-90, 2001.

- 74) Költringer P, Eber O, Lind P: Mikrozirkulation und viskoelastizität des vollblutes unter ginkgo biloba extrakt. Eine plazebokontrollierte, randomisierte doppelblindstudie. *Perfusion*, 1:28-30, 1989.
- 75) Jung F, Mrowietz C, Kiesewtter H, Wenzel E: Effect of ginkgo biloba on fluidity of blood and peripheral microcirculation in volunteers. *Arzneimittelforschung*, 40:589-593, 1990.
- 76) Chung KF, Dent G, McCusker M, Guinot PH, Page CP, Barnes PJ: Effect of a ginkgolide mixtur in antagonising skin and platelet responses to platelet activating factor in man. *Lancet*, 248-51, 1987.
- 77) Braquet P, Hosford D: Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapeutic agents. *J Ethnopharmacol*, 32:135-139, 1991.
- 78) Kleijnen J, Knipschild P: Ginkgo Biloba. *The Lancet*, 340:7:1136-1339, 1992.
- 79) Mouren X, Caillard P, Schwartz F: Study of the antiischemic action of EGb 761 in the treatment of peripheral arterial occlusive disease by TcPo2 determination. *Int Angiology*, 45:413-417, 1994.
- 80) Thomson GJL, Vohra RK, Carr MH: A clinical trial of Ginkgo biloba extract in patients with intermittent claudication. *Int Angiology*, 9:75-78, 1990.
- 81) Chung HS, Harris A, Ritch R: Ginkgo biloba extract increases ocular blood flow velocity. *Ocul Pharmacol Therapeutics*, 15:233-240, 1999.
- 82) Vorberg G: Ginkgo biloba extract (GBE): a long term study of chronic cerebral insufficiency in geriatric patients. *Clin Trials J*, 22:149-157, 1985.
- 83) Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, Packer L: Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract Egb761. *Biochem Pharmacol*, 49: 1649–1655, 1995.
- 84) Sastre J, Pallardo FV, Vina J: Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, 49: 427-435, 2000.
- 85) Du G, Willet K, Mouithys-Mickalad A, Sluse-Goffart CM, Droy-Lefaix MT, Sluse FE: EGb 761 protects liver mitochondria against injury induced by in vitro anoxia/reoxygenation. *Free Radic Biol Med*, 27:596-604, 1999.
- 86) Liebgott T, Miollan M, Berchadsky Y: Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (Egb761) during ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*, 95:368–377, 2000.
- 87) Chen JX, Zeng H, Chen X: Induction of heme oxygenase 1 by Ginkgo biloba extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine (LPC) induced damage. *Pharmacol Res*, 43:63–69, 2001.

- 88) Ren de C, Du GH, Zhang JT: Protective effect of ginkgo biloba extract on endothelial cell against damage induced by oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol*, 40:809-814, 2002.
- 89) Niadu MU, Shifow AA, Kumar KV, Ratnakar KS: Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine*, 7:191–197, 2000.
- 90) Jiang X, Nie B, Fu S, Hu J, Yin L, Lin L, Wang X, Lu P, Xu XM: EGb761 protects hydrogen peroxide-induced death of spinal cord neurons through inhibition of intracellular ROS production and modulation of apoptotic regulating genes. *J Mol Neurosci*, 38:103-113, 2009.
- 91) Hackett PH, Roach RC: High-altitude illness. *N Engl J Med*, 345:107-114, 2001.
- 92) World Health Organization. WHO monographs on selected medicinal plants. *Folium Ginkgo*. 1:154-167, 1999.
- 93) Auguet M, DeFeudis FV, Clostre F, Deghenghi R. Effects of an extract of Ginkgo biloba on rabbit isolated aorta. *Gen Pharmacol*, 13: 225-230, 1982.
- 94) Blumenthal M, Commission E: Therapeutic guide to herbal medicines. Austin, Tex., American Botanical Council, 11-12, 1998.
- 95) DeFeudis FV: Bilobalide and neuroprotection. *Pharmacol Res*, 46:565-568, 2002.