

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**LEPTİN'İN SIÇANLARDA KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
HİSTOLOJİK ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Gökçen KERİMOĞLU

Trabzon-2010

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**LEPTİN'İN SIÇANLARDA KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
HİSTOLOJİK ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Gökçen KERİMOĞLU

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Esin YULUĞ

Trabzon-2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
3. MATERYAL VE METOD.....	21
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7. TÜRKÇE ÖZET.....	49
8. İNGİLİZCE ÖZET.....	50
9. KAYNAKLAR.....	51

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusu ve gelişen teknoloji ile ilişkili olarak kemik yaralanmaları; gerek sıklığındaki gerekse yaralanmanın şiddetindeki artış nedeniyle hekimler ve hastalar açısından güncel bir sağlık problemi olarak tıptaki yerini korumaktadır (1).

Kırık, kemiğin fiziksel bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanabilse de sorun sadece kemik dokusunda sınırlı kalmayıp çevre yumuşak dokularda ve farklı organ sistemlerinde de çeşitli problemler oluşturur (1,2). Kırık oluşumu ve tedavisi, kişi ve toplum için hem beden ve ruh sağlığı açısından hem de ekonomik açıdan zor bir süreçtir.

Kırık iyileşmesi, hücrel ve biyokimyasal olayların karmaşık dengesi sonucunda gerçekleşen ve birçok hormon ve büyüme faktörü ile yönlendirilen özel bir yara iyileşmesi sürecidir. Bu kadar çok faktörün etkilediği bu hassas sürecin çeşitli nedenler ile sekteye uğraması, kırık iyileşmesinde başarısızlığa neden olarak kaynama gecikmesi yada kaynamama ile sonuçlanacaktır. Bu da mevcut problemi herkes açısından daha dramatik hale getirecektir. Anlaşılmaya çalışıldıkça daha da karmaşıklaşan bu sürecin problemsiz olarak takip edilebilmesi için, kırık iyileşmesini etkileyen faktörleri araştıran çalışmalar gittikçe artan sıklıkta devam etmektedir.

Leptin, başlıca beyaz yağ dokusu tarafından salgılanan, obese (Ob) geni tarafından kodlanan, peptid yapılı bir hormondur. Özellikle enerji tüketimini ve yiyecek alımını düzenlemesiyle tanınmaktadır (3). Bu etkilerinin yanında, erişkin osteoblast ve kondrositlerinde leptin reseptörleri gösterilerek; leptinin, kemik büyümesi ve gelişmesinde uyarıcı bir rolü olduğu bildirilmiştir (4). Ayrıca leptin, kemik oluşumu üzerine etkisini sadece sistemik bir hormon olarak değil, endokondral kemikleşmede anjiogenezi düzenleyerek lokal bir faktör olarak da gösterir (5).

Bu deneysel çalışmada, leptinin gerek kondrosit ve osteoblastlar, gerekse anjiogenez üzerine olan etkilerinden yola çıkılarak; kırık iyileşmesine etkilerinin histolojik olarak araştırılması ve bu bulguların radyolojik verilerle uygunluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde, benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

2.1.1. Kemik Dokusunun Tanımı, İçeriği

Kemik, ekstrasellüler matriksi kalsifiye olmuş özel bir bağ dokudur. Vücuttaki en sert dokulardan biri olmasına rağmen, üzerine gelen stres yükleri ile devamlı olarak şekil değiştirir. Kemik; beyin, spinal kord ve torasik kavitedeki organlar gibi dokuları koruyan ve destekleyen iskelet sisteminin ana yapısını oluşturur. Üzerine yapışan kasların kasılması ile vücudun hareket etmesini sağlar. Kan hücrelerini yapan kemik iliğini barındırmasının yanı sıra; kalsiyum, fosfat ve diğer iyonlara ait bir depo olarak da iş görür. (6,7).

2.1.2. Kemik Histolojisi

Kemik, hücreler arası kireçlenmiş materyal olan kemik matriksi ve bu matriks içinde dizilim gösteren hücrelerden oluşur. Bu hücreler; osteositler (Yunanca osteon, kemik + kytos, hücre), osteoblastlar (osteon + Yunanca blastos, tohum), osteoklastlar (osteon + Yunanca klastos, kırılmış) ve osteoprogenitör hücrelerdir (7).

Kemiğin dış yüzeyi; dışta sıkı bağ dokusu ve içte osteoprogenitör hücreleri içeren periosteum ile kaplıdır. Kemiğin santral kavitesi ise özel ince bir bağ dokusu, osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlardan oluşan tek tabakalı endosteum ile örtülüdür (6).

A. Kemik Hücreleri

Osteoprogenitör Hücreler

Embriyonik mezenkimal hücrelerden kaynaklanan ve kök hücrelerin özelliklerine (çoğalma potansiyeli ve farklılaşma kapasitesi) sahip olan hücrelerdir. Mitoza girme yeteneklerini devam ettirerek, büyüme ve transkripsiyon faktörlerini içeren düzenleyici bir

mekanizma ile osteoblastlara farklılaşabilirler (6,8). Üstelik düşük oksijen basıncı altındaki belli durumlarda bu hücreler kondrojenik hücrelere de farklılaşabilirler.

Osteoprogenitör hücre iğsi şekilli olup, soluk boyanan oval nükleusa sahiptir. Soluk boyanan sitoplazması az sayıda granüler endoplazmik retikulum (GER), az gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda serbest ribozom içerir. Osteoprogenitör hücreler, periosteumun sellüler iç tabakasında ve Havers kanallarını çevreleyen endosteumda bulunurlar (6). Bu hücreler, yaşam boyunca canlı kalarak; erişkinde kemik kırıklarının onarımı esnasında ve diğer hasarlarda yeniden aktive olurlar (8).

Osteoblastlar

Osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerden köken alan; kemik matriksinin organik kısımlarının üretilmesinden sorumlu hücrelerdir (6,7). Tip I kollajen ve kollajen olmayan proteinleri sentezlerler. Osteoblastlar tarafından salgılanan nonkollajen proteinler; osteoklastların farklılaşmasını düzenleyenler (a. nükleer faktör kappa B (**RANK**) aktivasyonu için reseptör ligandı (**RANKL**), b. makrofaj koloni stimule edici faktör (**M-CSF**), c. **osteoprotejerin**), kemik mineralizasyonu için gerekli olanlar (**osteokalsin**, **osteonektin**, **osteopontin**) ve osteoblastların ekstrasellüler matrikse integrinler aracılığıyla bağlanmasına aracılık eden **kemik siyaloproteinidir**. Diğer yandan kemik inorganik kısımlarının çökebilmesi için de yaşayabilir durumdaki osteoblastların varlığı gereklidir (8).

Osteoblastlar, özellikle kemik yüzeylerinde yan yana tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar. Aktif olarak matriks sentezlerken, kübikden prizmatığe kadar değişik şekillerde olup, bazofilik sitoplazmaya sahiptirler (7). Elektron mikroskopisinde çok miktarda GER ve iyi gelişmiş Golgi kompleksi bulunduğu görülür. Işık mikroskopisinde ise çok sayıda periyodik asit schiff (PAS) ile boyanan sekretuar granüller görülür (6). İşlevleri azalmaya başladığında yassılaşırlar ve sitoplazmalarındaki bazofilik özellik azalmaya başlar. Bazı osteoblastlar gittikçe yeni meydana gelmiş matriks ile kuşatılarak osteosit haline gelirler. Osteoblastlar, önceden yapılmış eski kemik matriksi ile temasta olan yüzeylerinden **osteoid** adı verilen yeni ve henüz kireçlenmemiş matriks tabakası salgırlar (7). Osteoblast membranlarında integrinler ve paratroid hormon reseptörleri bulunur. Paratroid hormonunun bu reseptörlere bağlanması osteoblastın RANKL ekspresyonunu artırırken, osteoprotejerin sentezini bloke eder. Ayrıca osteoblast hücre

membranları alkalen fosfataz enziminden de zengindir; bu sebepten dolayı aktif kemik yapımı boyunca kan alkalen fosfataz seviyeleri yüksek bulunur (6,8).

Osteositler

Osteoblastlardan türeyen osteositler matriksin kanalcıkları arasındaki boşluklarda (**laküna**) bulunurlar. Her boşluk içinde bir osteosit, uzantıları ve beraberinde az miktarda kireçlenmemiş matriks vardır (7). Osteositlerin uzantıları, **kanalikül** adı verilen ince silindirik kanalcıklar ile bağlantılıdır. Kanaliküller içinde bulunan komşu hücre uzantıları oluklu bağlantılar (gap junction) ile bağlanır ve bu yapılar aracılığı ile moleküller hücreden hücreye geçer (7,8).

Osteoblastlar ile karşılaştırıldığında yassı badem şeklindeki osteositler azalmış GER, Golgi ve koyulaşmış kromatin içerirler (7). Osteositler inaktif hücreler gibi görünmelerine rağmen kemik devamlılığı için gerekli maddeleri salgırlar (6). Bu hücreler aktif olarak kemik matriksinin bakımından sorumlu olup, ölümlerini takiben matriks erimesi görülür (7).

Osteoklastlar

Osteoklastlar kemik iliğindeki monosit-makrofaj progenitör hücre soyundan kaynaklanan, çok çekirdekli, büyük ve hareket edebilen hücreler olup kemiğin rezorbsiyonundan sorumludurlar (Şekil 1) (6-8).

Osteoklast farklanması kemik iliğinden türeyen M-CSF reseptörü ekspresse eden bir monositin kemik oluşum bölgesine gelmesiyle başlar. Monosit dokuya geçince makrofaj olur ve osteoblastlarca salgılanan M-CSF ligandı reseptörüne bağlanır. Böylece osteoblastlarca sentezlenen RANKL için RANK ekspresyonunu uyarır. RANKL, RANK (reseptör) yoluyla osteoklasta bağlanır. Sonuçta tek çekirdekli monosit, henüz kemiği rezorbe edemeyen çok çekirdekli olgunlaşmamış osteoklastı oluşturur. Osteoblast ayrıca osteoklastın RANK reseptörüne göre RANKL'a daha yüksek afinite ile bağlanan bir glikoprotein olan osteoprotejerin salgılar. Bu da osteoklast öncüllerinin osteoklastlara farklılaşmasının tamamlanmasını önler (8). Bu şekilde oluşan osteoklastlar, kemiğin eritilerek emildiği yerlerdeki **Howship lakünası** adı verilen enzimler ile oyulmuş çukurlara yayılırlar (7).

Aktif osteoklastlarda kemik matriksine bakan yüzeyde hücre membranı derin katlantılar (**büzgülü kenar**) yapar. Bu parmak benzeri aktif ve dinamik katlantılar, emilim bölgesi olarak bilinen subosteoklastik bölge içine doğru uzanır. Büzgülü kenar, hücre dinlenme fazına girdiğinde gözlenmez (7,8). Büzgülü kenarı, hücre organlarını içermeyen aktin filamanlarından zengin bir sitoplazma kuşağı (**saydam kuşak**) çevreler. Bu kuşak, osteoklastların kemik matriksine yapıştığı yer olup kemik erimesinin meydana geldiği **mikro çevreyi** oluşturur (6).

Kemik rezorpsiyonu sırasında osteoklastlar; içindeki karbonik anhidraz enzimi, su ve karbondioksitten karbonik asit oluşumunu katalizler. Böylece karbonik asit, hücre içinde hidrojen ve bikarbonat iyonlarına ayrılır. Daha sonra bikarbonat iyonları sodyum iyonları ile birlikte plazma membranını geçerek yakındaki kapillerlerin içine girer. Hidrojen iyonları ise mikro çevrenin pH'sını düşürmek için osteoklastların büzgülü kenar zarındaki proton pompaları aracılığıyla subosteoklastik bölge içine taşınır. Çevre asidikleşir ve matriksin inorganik komponenti çözülür. Mineraller, osteoklast sitoplazmasına girerek yakındaki kapillerler içerisine taşınır. Kollajenaz ve jelatinaz gibi lizozomal hidrolaz ile metalloproteinazlar ise, dekalsifiye kemik matriksinin organik içeriğini çözmek için yine osteoklastlar tarafından subosteoklastik bölge içine salgılanırlar. Enzimler yardımıyla çözülen organik matriks üyeleri endositoz ile osteoklast içine alınır; aminoasit, monosakkarid ve disakkaritlere parçalandıktan sonra yakındaki kapillerlere verilir (6).

Osteoklastların işlevleri çeşitli sitokinler ve hormonlar tarafından kontrol edilir. Örneğin osteoklastların tiroidten salgılanan kalsitonin hormonu için reseptörleri vardır. Bu reseptöre bağlanan kalsitonin, osteoklastın büzgülü kenarının kaybolmasına neden olarak onu inaktifleştirir (8).

B. Kemik Matriksi

Kemik matriksi organik ve inorganik bileşiklerden oluşur.

İnorganik Madde

Kemik matriksinin kuru ağırlığının % 65'ini oluşturur (6). Bol kalsiyum (Ca^{2+}) ve fosfor içerir; ilave olarak bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da bulundurur. Ca^{2+} ve fosfor başlıca hidroksiapatit kristalleri ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) şeklinde bulunur (6,7). Bu kristaller 40 nanometre (nm) boyunda, 25 nm genişliğinde, 1,5-3 nm

kalınlığında olup Tip I kollajen lifleri boyunca uzanırlar (6). Hidroksiapatit kristallerinin yüzeyindeki iyonlar su ile karışır ve kristalin etrafında su, iyon tabakası oluşturur. Bu tabaka, yani **hidratasyon kabuğu** kristaller ile vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştırır (7).

Kemiğin sertliği ve gücü kollajen ile hidroksiapatit kristallerinin ilişkisine bağlıdır. Eğer kemik dekalsifiye edilirse (kemiğin tüm mineralleri uzaklaştırılırsa) normal şeklini korur, fakat çok bükülebilir olur. Aksine organik bölüm kemikten uzaklaştırılırsa kemik yine asıl şeklini korur ancak kırılma eğilimi artar (6).

Organik Madde

Kemiğin kuru ağırlığının % 35'ini oluşturur. Tip I kollajen lifleri (% 90), kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asitten zengin proteoglikanları ve kollajen olmayan proteinleri içerir (8).

Kemik matriksi PAS ile boyanır. Kondroitin sülfat, keratan sülfat gibi sülfatlı glikozaminoglikanlardan dolayı hafif metakromazi gösterir ancak kollajenin çokluğundan dolayı asidofiliktir (6). Kollajen 50-70 nm çapında geniş bantlar şeklinde görülür.

Osteoblastlar tarafından sentezlenen kemik glikoproteinleri (osteokalsin, osteopontin ve osteonektin) matriks kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumlu olabilir (8). Bu glikoproteinleri içermeyen ancak Tip I kollajen içeren diğer dokular normal olarak kireçlenmezler (7).

C. Periosteum ve Endosteum

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

Periosteum; dış ve iç olmak üzere iki tabakadan oluşur. Dış tabaka; kollajen liflerden, fibroblastlardan oluşur ve kan damarlarından zengindir. Dış tabakadaki kollajen lif demetlerinden oluşan **Sharpey lifleri** matriks içine girerek periosteumu kemiğe bağlar. Periosteumun içte bulunan ve hücreden zengin olan tabakası; fibroblastlara benzeyen, bölünüp farklılaşarak osteoblastları meydana getirme potansiyeline sahip osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır (7,8).

Endosteum, Havers kanalları dahil kemiğin bütün boşluklarını ve kemik iliğini barındıran süngerimsi duvarları örter (8). Tek tabaka halinde yassılaştırmış osteoprogenitör hücreler ile çok az miktardaki bağ dokusundan oluşur (7).

Periosteum ve endosteumun ana fonksiyonları; kemiksi dokunun beslenmesi ve devamlı olarak yeni osteoblast üreterek kemik büyüme ve onarımının sağlanmasıdır (7).

2.1.3. Kemik Yapısı

Kemikler, anatomik şekillerine göre; tibiada olduğu gibi iki baş arasında bir gövdenin olduğu uzun kemikler, el bileği karpal kemiklerinde olduğu gibi boyları ve genişlikleri aynı olan kısa kemikler, kafatası kemiklerinde olduğu gibi yassı ve ince olan yassı kemikler, etmoid kemikte olduğu gibi diğer sınıflara sokulamayan irregüler kemikler ve patellada olduğu gibi tendonların içinde gelişen sesamoid kemikler şeklinde sınıflandırılır (6).

A. Makroskopik Kemik Tipleri

Uzun kemiklerin uzunlamasına kesitine çıplak gözle bakıldığında iki farklı bölge ayırt edilir (6). **Kompakt kemik**, boşluk içermeyen yoğun alanlardan oluşurken; **süngerimsi kemik** ise çok sayıda birbirine açılan boşluklardan oluşur. Ancak mikroskop altında, gerek kompakt gerekse süngerimsi kemiğin boşluklarını ayıran kemik bölmelerinin histolojik yapısı temelde aynıdır. Süngerimsi kemik, kemik iliği tarafından doldurulan boşluğu sınırlayan spiküllerden veya trabeküllerden oluşan bir ağ örgüsünden medyana gelir (7).

Uzun kemiklerin gövdesi **diyafiz**, küremsi uç kısımları **epifiz** olarak adlandırılır (6,7). Büyüme dönemindeki kişilerde diyafiz, kıkırdak **epifizyal plak** ile epifizden ayrılmıştır. Epifizyal plak ile diyafiz arasındaki süngerimsi kemik kolonları **metafiz** olarak adlandırılır (6). Uzun kemiklerin epifizleri ince bir tabaka kompakt kemik ile örtülü süngerimsi kemikten oluşurken, diafizlerinin ise hemen hemen tamamı kompakt kemikten oluşur.

Kısa kemikler, genellikle etrafı kompakt kemik ile çevrelenmiş süngerimsi kemik merkezine sahiptirler. Kafatasının üst kısımlarını oluşturan yassı kemikler, **plaka** adı verilen iki tabaka kompakt kemik ve aralarında **diploe** adı verilen süngerimsi kemik tabakasından oluşur (7).

B. Mikroskopik Kemik Tipleri

Mikroskopik olarak iki tür kemik vardır: Birincil, olgunlaşmamış veya örgü kemik ile ikincil, yetişkin veya lamelli kemik (6).

Birincil (olgunlaşmamış, örgü) kemik dokusu; geçici bir dokudur ve yetişkinlerde kafatası düz kemik eklemlerinin civarı, diş alveolleri ve bazı tendoların kemiğe girdiği yerler dışında ikincil kemik dokusu ile değiştirilir (7). Birincil kemik, embriyonun gelişiminde ve kırık iyileşmesinde beliren ilk kemik dokusudur (6). Kollajen liflerinin düzensiz sıralanışına ilave olarak daha az mineral içerik ve ikincil kemiğe nazaran daha fazla osteosit içermesi, birincil kemik dokusunun diğer özelliklerindedir (7).

İkincil (yetişkin, lamelli) kemik dokusu; olgun kemiklerde bulunur. 3-7 mikrometre kalınlığında paralel veya konsantrik lamellerden oluşur. Lamel içerisindeki kollajen lifleri birbirlerine paralel olarak düzenlenmiştir. Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren endosteum ile örtülü **Havers Kanalı** adı verilen bir kanalın etrafını saran 4-20 adet dairesel kemik lamellerinden oluşan tüm komplekse **Havers sistemi** veya **Osteon** adı verilir. Osteosit içeren lakünalar, lamellerin arasında ve nadiren içlerinde bulunur. Her Havers sistemi; diyafizin uzun eksenine paralel bir silindir olup **sement çizgisi** adı verilen ve içinde az miktarda kollajen lif içeren oldukça kalsifiye matriks tarafından çevrelenir (6-8).

Kompakt kemik lamelleri; Havers sistemi, dış dairesel lameller, iç dairesel lameller ve ara (interstisyel) lamellerden ibarettir. İç dairesel lameller, kemik iliği boşluğunun etrafında; dış dairesel lameller ise hemen periostun altında yer alırlar. Dıştaki lameller içtekilerden daha fazladır. Bu iki dairesel lamel arasında pek çok Havers sistemi ve üçgenimsi veya düzensiz şekillenmiş ara lameller bulunur. Ara lameller, kemik büyümesi ve yeniden modellenmesi sürecinde yıkılmış Havers sistemlerinin lamellerinden arta kalanlardır. Havers sistemi gibi ara lameller de sement çizgileri ile sınırlanırlar. Kemik dokusu sürekli yeniden modellendiği için Havers kanallarının çapları büyük değişkenlik gösterir. Yeni oluşmaya başlamış sistemlerin kanalları daha büyüktür; lameller oluştukça kanal çapı daralır. Sürekli eklenen lamellerden merkezdeki kanala en yakın lamel en yeni oluşmuş olandır. Diğer bir deyişle sement çizgisinin yanındaki lamel en eski lameldir (6-8). **Volkman kanalları** ise Havers kanalları, kemik iliği boşluğu, periost arasında ilişki kuran enine veya oblik kanallardır. Bu kanallar dairesel lamel içermez bunun yerine lamelleri delerler (6-8).

2.1.4. Kemik Histogenezi

Embriyonik gelişim süresince kemik, başlıca iki yolla şekillenir. İntramembranöz (zar içinde kemikleşme) kemikleşmede, osteoblastların salgıladıkları matrikse doğrudan minerallerin çökmesi ile kemik şekillenirken; endokondral kemikleşmede (kıkırdak içinde kemikleşme) önceden mevcut kıkırdak modelin yerini kemik dokusu almaktadır. Her iki yolda da meydana çıkan ilk kemik birincil kemiktir. Birincil kemik geçici bir dokudur ve kısa sürede ikincil kemikle yer değiştirir. Kemik büyümesi esnasında, birincil kemik alanları, rezorbsiyon alanları ve ikincil kemik sahaları yan yana görülürler. Bu kemik yapım ve ortadan kaldırılışı (yeniden modellenme) büyüyen kemiklerin yanı sıra yetişkinlerde de hayat boyu meydana gelir; ancak yetişkinlerdeki değişim hızı epeyce yavaştır (6,7).

A. İntramembranöz (Zar İçinde) Kemikleşme

Çoğu yassı kemik, intramembranöz kemikleşme ile şekillenir. Kafatasının frontal ve pariyetal kemikleri yanı sıra oksipital, temporal, mandibula ve maksilla kemiklerinin bazı kısımları da bu şekildeki kemikleşme ile oluşur (7).

Bu tip kemik oluşumu membranöz bir kılıf oluşturan mezenkimden meydana geldiği için **intramembranöz kemikleşme** adını almıştır. Bu tip kemikleşmede yoğunlaşmış damarlanmasında artan mezenkim içerisinde bazı hücreler osteoblastlara dönüşür ve matriks biriktirmeye başlar. Bunu kireçlenme izler ve sonuçta bazı osteoblastlar kireçlenmiş matriks ile kuşatılarak osteosit olur (6-9). Mezenkimal doku yoğunlaşması bölgesindeki başlangıç noktasına **birincil kemikleşme merkezi** denir. Gelişen kemik adacıkları; kılcal kan damarları, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreleri içeren uzamış boşlukların duvarlarını oluşturur. Böylece birkaç grup kemikleşme merkezi hemen hemen aynı zamanlarda ortaya çıkar ve bunların duvarları kaynaştığında kemik, süngerimsi yapıya kavuşur. Büyüyen kan damarları ve farklılaşmamış mezenkim hücreleri, kemik duvarları arasında kalan bağ dokusu içinde kemik iliği hücrelerini oluşturur (7,9). Kemikleşme merkezleri işinsal olarak büyür ve sonunda kaynaşarak asıl bağ dokusunun yerini alır. Bağ dokusu tabakasının kemikleşmeyen kısımları; intramembranöz olarak gelişen kemiğin iç ve dış zarlarını (endosteum ve periosteum) yapar (7).

B. Endokondral Kemikleşme (Kıkırdak İçinde) Kemikleşme

Endokondral kemikleşme, meydana getirilecek kemiğin şeklini andıran küçük bir hiyalin kıkırdak model içinde meydana gelirken kemik oluşumu iki aşamada tamamlanır. Önce küçük bir hiyalin kıkırdak model oluşur; bu model büyümeye devam eder ve kemik gelişimi için yapısal bir kalıp sağlarken daha sonra rezorbe olarak yerini kemiğe bırakır. Bu tür kemikleşme daha çok kısa ve uzun kemiklerin oluşumundan sorumludur (6,7).

Bir uzun kemiğin endokondral kemikleşme ile meydana gelişinde şu olaylar birbirini izler: Başlangıçta ilk beliren kemik dokusu kıkırdak modelin orta kısmını saran içi boş kemik silindiridir. İntramembranöz kemikleşme ile oluşan ve **kemik halkası** adı verilen bu yapı spongiyöz kemik içerir (7,8). Daha sonra kıkırdak modelin merkezindeki kondrositler olgunlaşma sürecine girerler ve hipertrofik şekil alarak Tip X kollajen içeren bir matriks sentezlerler (8). Daha sonra matriks kalsifiye olur ve kıkırdak hücreleri ölür (9). Sonuçta kireçlenmiş kıkırdak matriksinden oluşan üç boyutlu yapı geride kalır (7). Ayrıca hipertrofik kondrositlerden salgılanan anjiogenik faktörler, perikondriumdan kan damarı oluşumunu uyarır ve osteoprogenitör hücreler bu damarlar ile kalsifiye kıkırdağın merkezine ulaşır (8). Bu hücreler osteoblastlara farklılaşarak kemik matriksi depolamaya başlar ve devamlı birincil kemik tabakalarını yaparak kıkırdağımsı kireçlenmiş matriksi sararlar (7,8). Bu aşamada kireçlenmiş kıkırdak bazofilik görünür. Sonra oluşan birincil kemik ise eozinofiliktir. Bu şekilde meydana gelen **birincil kemikleşme merkezi** diyafizde organize olurken; **ikincil kemikleşme merkezleri** daha sonra epifizlerde ortaya çıkar (7-9).

İkincil kemikleşme merkezlerinin çoğu doğumdan sonraki birkaç yıl içerisinde epifizlerde belirir ve epifizdeki kemikleşme her yöne doğru ilerlerken, kıkırdak sadece iki bölgede kalır. Birincisi; yaşam boyu kalıcı olan ve uzunlmasına büyümede katkısı olmayan eklem kıkırdağıdır. Diğeri ise, her iki epifizi diafize bağlayan epifiz plağıdır. Epifiz plağı, kemiğin uzunlmasına büyümesinden sorumlu olup yirmi yaş civarında spongiyöz kemikle yer değiştirir ve kemik, artık daha fazla uzamaz (9).

Epifiz plağı beş kuşağa bölünmüştür. Kemiğin epifiz tarafından başlayarak;

- a. Dinlenme kuşağı;** hücrelerinde yapısal değişiklikler olmayan hiyalin kıkırdaktan oluşur.
- b. Çoğalma kuşağı;** kondrositler hızla bölünür ve kemiğin uzun eksenine paralel sütunlar halinde yığılırlar.

c. Olgunlaşma ve hipertrofi kuşağı; sitoplazmalarında glikojen birikmiş büyük kondrositleri içerir ve kondrositler arasındaki matriks ince bir duvar halindedir.

d. Kireçlenme kuşağı; kondrosit apoptozu ile eş zamanlı olarak kırıkta matriksinin ince duvarları hidroksiapatit birikmesi ile kireçlenir.

e. Kemikleşme kuşağı; kan kapillerleri ile gelen osteoprogenitör hücreler kondrositlerden geriye kalan oyukları doldurur ve osteoblastlara farklılaşır. Daha sonra osteoblastlar kireçlenmiş kırıkta matriks üzerine kemik matriksini tortular ve böylece kemik boyuna uzamış olur (6-8).

2.2. Kırık İyileşmesi

Dıştan veya içten gelen zorlamalarla kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasına kırık denir (10). Kırık; kemik matriksinin haraplanmasına, hücrelerin ölümüne, periosteum ve endosteumda yırtılmalara ve kırık uçlarının yer değiştirmesine neden olur (6). Kırık sonrası oluşan fizyolojik reaksiyonlar, bozulan kemik bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yöneliktir ve sonuçta kemik, skar dokusu oluşturmaksızın yeniden yapılanmayla (rejenerasyon) iyileşir (2,7,10). Kırık iyileşmesi, kırık olduğu andan itibaren başlar ve düzenli kemik doku ile kırık uçları birleşinceye kadar devam eder (10).

Stabil kırıklarda, yani kırık uçları sıkı bir şekilde birbirleriyle temas halinde tutulduğunda, belirgin gözlenebilen bir kallus oluşturmaksızın kansellöz veya lameller kemik ile kırık iyileşmesi oluşur. Bu duruma **primer (doğrudan) kırık iyileşmesi** denir (1,2,10). Stabil olmayan kırıklarda ise, oluşan kırık kallusu ilerledikçe kırık uçlarını stabilize eder ve kırık kallusunun şekillenmesi çeşitli aşamalardan sonra lameller kemiği üretir (1,2).

2.2.1. Kırık İyileşmesinin Evreleri

Stabil olmayan kırık iyileşmesi evrelere bölünebilir. Bunlar kırık kemiği orijinal durumuna getiren yangı (enflamasyon), onarım (reperasyon) ve yeniden şekillenme (remodelizasyon) evreleridir (1,2,10,11). Histolojik olarak iyileşme süresindeki evreler birbirlerinden zaman olarak kesin sınırlar ile ayrılamaz ve her evre daima kendinden bir önceki veya bir sonraki evre içinde bulunur (10).

Yangı (enflamasyon) evresi (1-4 gün)

Kemiğin kırılmasıyla sadece kemik değil; kan damarları, kas ve periosteum gibi yumuşak dokular da zarar görür ve kırık bölgesinde lokalize kanama olur. Kırık uçları

arasında, periosteum altında ve eğer periosteum yırtılmışsa etrafında hematoma oluşturan kanama durur. Oluşan hematoma basıncı kırık uçlarının bir arada tutulmasına yardım eder (1,2,10).

Kırık hematoma onarım hücrelerinin göçünü kolaylaştıracak fibrinden bir yapı iskeleti sağlar. Ayrıca hematoma içindeki trombositler ve ölmüş veya zarar görmüş hücrelerden büyüme faktörü ve diğer proteinler salınır. Bunlar da kırık onarımında etkin olan hücre göçü, periostal hücre çoğalması ve onarım dokusu matriksinin sentezinde aracıdırlar.

Kırık olduktan sonra görülen geçici arteriyoller daralmayı; arteriyol, kılcal damar ve venüllerin genişlemesi izler. Vazodilatasyon ve plazma eksudasyonuna bağlı olarak kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur (10). Kemikğin 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 (6,10). Kırık bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Trombositlerden, ölmüş ve zarar görmüş hücrelerden serbest bırakılan enflamatuar mediatörler de kan damarlarının genişlemesine ve plazma sızdırıp taze kırık bölgesinde akut ödem oluşmasına katkıda bulunur. Enflamatuar hücreler, polimorf çekirdekli lökositler ve ardından makrofajlar ve lenfositler kırık bölgesine göç ederler. Bu hücreler ayrıca sitokinleri serbest bırakarak anjiyogenezi uyarır (2). Kırık alanını dolduran hematoma, küçük kapillerler ve çevre yumuşak dokudan gelen fibroblastlarca bir granülasyon dokusunu oluşturmak üzere istila edilir (6).

Onarım (Reperasyon) evresi (2-40 gün)

Onarım evresi kırık iyileşmesindeki en önemli evre olup, hematoma organize olması ile başlar. Kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7-12 gün sürer (10).

Oluşan hematoma organizasyonu genellikle kırık tamirinin ilk basamağı olarak tanımlanır. Deneysel çalışmalar; kırık sonrası oluşan hematoma kaybının kırık tamirini yavaşlattığını veya bozduğunu göstermiştir. Bunun sebebi yukarıda da bahsedildiği gibi hematoma; tamir hücrelerinin migrasyonu için bir fibrin taslak sağlamasıdır (1).

Bu evrede; mezenşimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip (pluripotent) hücreler, periosteumun iç tabakasındaki osteoprogenitör hücreler ve endosteumdaki osteoblastlar önemli rol oynarlar (1,2,6,10). Mezenşimal hücreler çoğalıp farklılaşarak

fibröz doku, kırık dokusu ve birincil kemikten ibaret olan kırık kallusunu oluşturur; bu da kırık uçlarını çevreler ve sabitler.

Oluşan kallus, kırık iyileşmesinin erken aşamalarında **kemik (sert) kallus** ve **fibröz-kırık dokusu (yumuşak) kallus** olmak üzere iki tiptir. Başlangıçta, kırık periferinde intramembranöz olarak şekillenen kallus sert kallustur. Yumuşak kallus ise oksijen basıncının düşük olduğu santral bölgelerde şekillenen fibröz ve kırık dokudan meydana gelir. Yumuşak kallus içindeki kırık dokular da zamanla endokondral ossifikasyon yoluyla kemikleşir ve kırık uçlarının stabilitesi artar (1,2,10).

Kırık iyileşmesinde en önemli faktör kanlanmadır. Kırık iyileşmesinde angiogenezin en önemli mediatörü olarak Fibroblastik Growth Faktör (FGF) düşünülse de; vasküler invazyon ve endotel hücre proliferasyonundan esas sorumlu uyarıcı henüz tanımlanamamıştır (1). Vasküler invazyon ve angiogenez önemlidir çünkü; kapiller damar gelişiminin yeterli olması, hücrelerin osteoblastlara dönüşümünü ve osteoblastların uygun matriksi sağlamalarını artırırken; yetersiz olması hücrelerin kondroblastlara dönüşümünü ve dolayısıyla kırık dokusu oluşumunu artırır (1,2,6,10).

Damar endoteli sialik asitten dolayı, kırık dokusu ise proteoglikanlardan zengin olduğu için negatif yüklüdür. Ca^{2+} burada pozitif yüklü ortam oluşturarak yeni damarların kırık dokuya yönelimini 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. Kırık dokudaki kondrositler hipertrofiye olduğunda alkalen fosfataz salgılar ve kondrositlerden kırık dokusu matriks vezikülleri de atılmaya başlar. Kırık dokusu matriks kalsifiye olur. Difüzyonla beslenen kondrositler, bu kalsifiye dokusu içinde kaldıklarında ölür ve buldukları yerde boş lakunalar kalır. Buralara kılcal damarlar ulaşır, onlarla beraber gelen kemik hücreleri lakunalara yerleşir ve kallus zamanla kemikleşir (10).

Kallusun mineralizasyonu ile kaynamanın olduğu söylenebilirse de kaynama henüz son noktasına ulaşmış değildir. Onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz kısımlarının geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzanması ile yeniden şekillenme evresi (remodelizasyon) başlar (1,10).

Yeniden şekillenme (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 remodelizasyon sırasında kazanır. Bu dönem, mineralize kallusun normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümünü ve gereksiz aşırı kallusun rezorbsiyonunu içerir (1,2,10).Yeniden şekillenme, maruz kaldığı yüke göre (Wolff kanunu) kemiğin normal konfigürasyon ve şeklini almasını sağlar. Süreç boyunca onarım evresinde oluşan birincil kemik lameller kemikle yer değiştirir (11). Lameller kemik kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur (10). 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 temel çok hücreli birimlere dayandıran **Hueter-Volkmann Kanunu**'dur (11).

2.2.2 Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Uygun tedaviye rağmen bazı kırıklar, bariz bir neden olmaksızın yavaş iyileşir (gecikmiş kaynama) veya iyileşemez (kaynamama) (2). Çoğu durumda kırık iyileşmesini olumsuz etkileyen nedenler belirlenebilir (1,2,10). Bunlar kabaca yaralanmanın şekline, hastanın durumuna, tedavi yöntemlerine ve yaralanan kemik dokusuna bağlı nedenler olarak sınıflanabilir (1,2,10,11).

Yaralanmaya bağlı etkenler:

Kırığın açık kırık olması, beraberinde yumuşak doku yaralanmasının olması, kemik kaybı olması, yaralanmanın şiddeti, eklem içi kırık olması, segmental kırık olması, yumuşak doku interpozisyonu olması, kan akımının hasarlanması gibi yaralanmayla ilişkili durumlar kırık iyileşmesini olumsuz olarak etkiler (1,2,10).

Hastaya bağlı etkenler:

İskelet olgunlaşana kadar yaş arttıka kırık iyileşmesi azalırken, iskelet gelişimi tamamlandıktan sonra yaşın ilerlemesi kırık iyileşmesi üzerine önemli bir etki göstermez (1,2,10,11).

Beslenme yetersizliği; hücre çoğalması, göçü ve matriks sentezinin enerji gerektirmesinden dolayı kırık iyileşmesini olumsuz etkiler (1,11). C vitamini kırık iyileşmesini olumlu etkiler (10,12). B6 vitamini eksikliği ise kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etki eder (10). Bunun yanı sıra diyabet, D hipervitaminözü ve rikets de kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etki gösterir. Ancak D vitamini kullanımı kırık iyileşmesini uyararak olumlu etkide bulunur (10,13).

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'ya maruz kalmanın osteoklast sayı ve aktivitesini 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 (1,14). Kalsitonin ve insülin de kırık iyileşmesini artırır (1). İlave olarak büyüme hormonu ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1); iskelet gelişiminde ve yeniden şekillenmesinde önemli rol oynar. Endokondral ossifikasyonu, periostal kemik oluşumunu ve lineer büyümeyi arttıran büyüme hormonu; bu etkilerini IGF sistemi aracılığıyla düzenler (1,11). Tiroid hormonu da kemik remodelizasyonuna olumlu etki eden bir hormondur (11).

Özellikle kortikosteroidler; mezenkimal hücrelerden osteoblast farklanmasını ve kemik organik matriks sentezini azaltarak kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Yine indometazin ve diğer non-steroidal anti enflamatuvar ilaçların kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri bulunmuştur (1).

Sigara kullanımı ve kanser tedavisinde kullanılan ajanlar kırık iyileşmesini olumsuz etkiler (1,11). Yine dikumarol ve hyalüronidaz kırık iyileşmesine yardım ederken, K vitamini antagonistleri genel olarak kırık iyileşmesini olumsuz etkiler (10). L-Dopa ve klonidin kullanımı da kırık iyileşmesine olumlu etki eder (10,15).

Yaralanan kemik dokusuna bağlı etkenler:

Kortikal kemik iyileşmesi, kansellöz kemik iyileşmesine göre daha problemlidir. Ayrıca kemik nekrozu ve kırılan kemiğin kanlanması bozulması da iyileşmeyi olumsuz etkiler.

Osteoporoz, osteomalazi, kemik tümörleri, paget hastalığı ve hiperparatroidi gibi patolojik yapıda kemiğe neden olan hastalıklarda da kırık iyileşmesi gecikebilir ya da olmayabilir (1).

Enfeksiyonlar da; enerji tüketimini arttırması, dokularda ödem, nekroza neden olması ve damarlarda tromboz oluşturmasından dolayı kırık iyileşmesini olumsuz etkiler (1,10,11).

Tedavi yöntemlerine bağlı etkenler:

Kırık uçları arasında tespit sonrasında kalan uyumsuzluk iyileşmeyi olumsuz etkilerken; her tür kırık tespiti, kırık uçlarının hareket etmesi nedeniyle oluşabilecek tekrarlayan yumuşak doku yaralanmalarını engelleyerek kırık iyileşmesini uyarır (1).

Kırık hattına yük verilememesi iyileşmeyi yavaşlatırken, kırık hattında mikro hareket olması ise iyileşmeyi olumlu etkiler.

Hiperbarik oksijen; uygulanma dozuna bağlı olarak kırık iyileşmesi üzerine olumlu veya olumsuz etkiler gösterir (10).

Düşük yoğunluklu pulse ultrason (Lipus) kemik rejenerasyonu üzerine olumlu etkilere sahiptir (16). Ayrıca kırık iyileşmesini uyarır ve kırık kallusunun mekanik gücünü arttırır (1,17).

Elektrik uygulamaları; kaynamama ve gecikmiş kaynama durumlarında kırık iyileşmesini arttırmaktadır (1,18). Fakat yeni oluşan kırıkların iyileşmesinde bu etkiye ait bulgu yoktur (1).

2.2.3. Kırık iyileşmesinin kontrolü

Kırık oluşumu sırasında osteoblast ve osteoklastlar iyileşme için yeterli miktarlarda bulunmazlar. Bu dönemde kırık iyileşmesi öncü ve destek hücreleri, kılcak damar, lenf ve sinir sistemi ve yerel aracılı mekanizmalarla sağlanır. Kırık sahasında yerel olarak üretilen ya da kan dolaşımı ile gelen ve bölgesel olarak kemik dengesini koruyabilen faktörlere ihtiyaç vardır (10). Hücreler tarafından salgılanan, sinyal molekülleri olarak fonksiyon

gören bu faktörler hedef hücrede otokrin, parakrin veya endokrin etkilere sahip olup; hücre farklanmasını, adezyonunu, çoğalmasını ve migrasyonunu direkt olarak etkilerler (1):

1. Prostaglandinler (PG): Araşidonik asitten, siklooksijenaz enzimleri vasıtasıyla sentezlenirler ve osteojenik etkilere sahiptirler (1). İltihap hücreleri için kemotaktik faktör olup akut iltihabi reaksiyonun önemli araçlarıdır. Hücre çoğalmasını hızlandırırlar ve lenfositlerin antikor yapımını düzenlerler. Ca^{2+} un hücre içine ve dışına hareketini kolaylaştırırlar. PGE_2 ve PGI_2 'nin kemik geri emilim gücü fazladır. PGE_1 ve PGE_2 yeni kemik yapımını artırır. $PGF_{2\alpha}$ kondrogenez ve kondrolizde etkilidir (10).

2. Kemik uyarıcı faktörler: Farklanmamış mezenşimal hücrelerin mitozunu destekleyerek yeni kemik hücrelerinin oluşumuna neden olurlar. Bunlar:

A. Dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming growth factor- β ; TGF- β); mezenkimal hücrelerin büyümesini, kollajen ve diğer ekstrasellüler matriksin sentezinin artmasını uyarır (1). Tüm hücrelerde bu faktörün reseptörü bulunur. En önemli kaynağı kemiğin hücre dışı matriksi ve trombositler olup kondrosit ve osteoblastlarda da sentezlenerek encondral kemikleşme sırasında hücre dışı matrikste birikir. Granülasyon dokusu oluşumuna etki eder (10).

B. Kemik morfojenetik protein (BMP); TGF- β süper ailesine ait nonkollajenöz glikoproteinlerdir. Lokal olarak sentezlenir; etkilerini otokrin ve parakrin mekanizmalar ile gösterir. 15 farklı tip tanımlanmıştır (1). Bunlardan BMP7 (osteojenik protein 1) uzun kırıkların kaynamama durumlarının tedavisinde önerilir (1). Mezenşimal hücrelerin kırıkta, kemik hücrelerine farklılaşmasına ve ektopik kemik uyarımının artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (10).

C. Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü (FGF); Asidik FGF (aFGF, FGF1) ve bazik FGF (bFGF, FGF2) ailenin en iyi bilinen üyeleri olup; bFGF daha potenttir. Anjiogenezi, endotelial hücre migrasyonunu uyarır ve fibroblastlar, kondrositler, osteoblastlar için mitojeniktir. Kallus bölgesini genişletir ve mineral içeriğini artırır (1).

D. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF); trombosit, makrofaj ve endotelial hücreler gibi çok sayıda hücre tipi tarafından sentezlenir. Güçlü mitojenik özelliklere sahip olup osteoblastların çoğalmasını uyarır (1). Ayrıca fibroblast çoğalmasını, mezenşimal hücre mitozunu, monosit ve makrofajların kırık bölgesine göçünü ve bağ dokusunda kollajen sentezini artırır (10).

E. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF); iki tipi tanımlanmıştır. Bunlardan IGF2 kemikte en çok bulunan büyüme faktörü olmasına rağmen IGF1 (Somatomedin C) büyümeyi arttırmada daha yüksek potansiyele sahiptir. Her ikisi de farklı osteoblastlar vasıtasıyla kemik matriks oluşumunu hızlandırır (1).

F. İnterlökinler (IL); Makrofaj ve monosit kökenlidir. IL-1 fibroblast çoğalması, kollajenaz ve PGE2 üretimiyle ilgilidir.

G. Diğerleri; Plazma fibronektini; yeni damar oluşumu için mitojeniktir. Epidermal büyüme faktörü (EGF); kemik geri emilimini hızlandırır. Epidermal hücre kaynaklı büyüme faktörü (ECGF); kırık ve kemik için mitojeniktir. Endotelial hücre kaynaklı büyüme faktörü (ECDGF); yeni damar oluşumu için mitojeniktir. Kondroblast kökenli büyüme faktörü (CDGF) ve makrofaj kaynaklı büyüme faktörü (MDGF) kırık iyileşmesi üzerine etki eder (10).

2.3. Leptin Hormonu

Leptin, obese (Ob) geni tarafından kodlanan, 16 kDa'lık 167 aminoasitli peptid yapısında bir hormondur (19). Yunanca ince anlamına gelen Leptos kelimesinden türetilmiştir (3). 1994 yılında Zhang ve arkadaşlarının ob genini klonlamasına ve bu genin ürünü olan proteinin keşfine kadar bu tokluk faktörü tam olarak belirlenmemiştir.

Başlıca yağ dokusundan sentezlenen leptin, vücuttaki yağ dokusunun boyutlarını düzenleyen etkilere sahiptir (19). Salgılanma hızı ve plazmadaki miktarı vücuttaki toplam yağ kitlesi ile doğru orantılıdır. Leptin, merkezi sinir sisteminde hipotalamus nükleusları vasıtasıyla iştahın azaltılmasında, metabolizma hızının ve enerji tüketiminin düzenlenmesinde de etkilidir (19-21). Leptinin merkezi sinir sistemi ve periferik dokular üzerine yaptığı etkiler ile triaçilgliserol sentezinde azalma, lipolizde ve lipid oksidasyonunda artma, kalori alımında azalma görülür (22).

Ayrıca leptin; fertilité (23), insülin duyarlılığı, immün fonksiyon (24), anjiogenez (25,26) ve hatta kemik oluşumunda (20,27) rol oynayan multifonksiyonel bir hormondur (28).

2.3.1. Leptin Reseptörleri

Leptin reseptörü (OB-R) ilk olarak fare koroid pleksusunda bulunmuştur. Sınıf I sitokin reseptör ailesine mensup tek membran geçişli bir reseptördür. Leptin reseptörleri

koroid pleksus, akciğer, böbrek dokularında fazla miktarda; daha düşük miktarlarda ise hemen hemen diğer tüm dokularda bulunur.

Leptin reseptörünün temel iki formu vardır; kısa (OB-R_S) ve uzun form (OB-R_L) . Bu iki formun dışında transmembran parçası olmayan çözümler leptin reseptörü formu da tanımlanmıştır (29).

Leptin reseptörü enzime bağlı reseptöre örnektir ve sitokin reseptör ailesinin üyesidir. Bu reseptörün kendisi enzimatik aktivite göstermez ama ilgili enzimler aracılığıyla sinyal iletir. Sinyal ileti yollarından birinde janus kinaz (JAK) ailesinden bir tirozin kinaz (JAK 2) aracıdır. Leptin reseptörleri dimer yapısında olup iki parçalıdır. Hücre dışı parçasına leptin bağlanması reseptörün yapısal değişikliğine; bu da hücre içi reseptör bağlantılı JAK 2 moleküllerinin fosforilasyonu ve aktivasyonuna neden olur. Daha sonra aktif JAK 2 molekülleri, Leptin reseptörü-JAK 2 kompleksindeki diğer tirozin kalıntılarını fosforile ederek hücre içi sinyal iletimine aracılık eder. Hücre içi diğer bir sinyal; sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinlerinin fosforilasyonudur. Bu da leptinin etkisiyle hedef genlerin transkripsiyonunu aktive ederek protein sentezini başlatır. JAK 2'nin fosforilasyonu, mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK) ve fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) gibi diğer hücre içi enzim yollarının da aktivasyonuna yol açar. Leptinin bazı etkileri bu hücre içi enzimlerin aktivasyonu sonucu hızlı bir şekilde gerçekleşirken, diğer etkileri yeni protein sentezi gerektirir ve daha yavaş gerçekleşir (21).

Kısa formda hücre içi parça kısadır, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) eksiktir ve başlıca kandan koroid pleksusa leptin taşınmasında rol aldığı düşünülmektedir. Kısa form sadece transportta rol oynamaz ayrıca çözümler reseptör kaynağı olarak da görev yapar.

Uzun form OB-R Janus Kinaz (JAK) ve STAT taşır. Neredeyse tüm dokularda OB-R_S daha fazla olmasına karşın hipotalamusta OB-R_L daha fazla bulunmaktadır (29).

Leptin hipotalamustaki arkuat ve ventromedial nükleusta reseptörlere sahiptir. Arkuat nükleustaki özel nöronlar iştah ve üremeyi düzenlerken; ventromedial nükleus kemik kütlelerini düzenler (30).

2.3.2. Leptinin Kemik Üzerine Etkileri

Leptinin kemik kütlesi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların zemininde kemik ve yağ dokusunun kemik iliğindeki aynı mezenkimal kök hücrelerden kaynaklanmaları yatmaktadır. Periferel yağ dokuları hormonal olarak aktiftir ve kemik döngüsünü düzenleyebilir (31). Bir adipokin olan leptin, insan kemik iliği stromal hücrelerinin osteoblastlara farklanmasını arttırırken; adipositlere farklanmasını azaltır (32). Bunun yanı sıra periferel endokrin ve parakrin mekanizmalar vasıtasıyla büyüme plağında kondrosit farklanmasının düzenlenmesi ve kıkırdak matriks olgunlaşmasında önemli role sahiptir (20). Ayrıca leptin kondrositlerin yanı sıra osteoblastların farklanmasına ve proliferasyonuna da etki ederek iskelet gelişimini düzenler (27).

Uygulama yoluna bağlı olarak leptinin kemik kütlesi üzerine iki karşıt etkisi vardır. Birisi periferel uygulandığında oluşan anabolik, iskelet koruyucu etki (4); diğeri intraserebroventriküler olarak santral uygulandığında oluşan osteopenik (33) etkidir. Hipotalamus üzerine leptin etkisiyle kemik yeniden oluşumu iki zıt etkili yolak tarafından düzenlenir. Sempatik sinir sistemi yolağı osteoklast farklanmasını uyarırken; hipotalamusta ekspresse edilen bir nöropeptid olan kokain - amfetamin ilişkili transkript (CART) yolağı ise osteoklast farklanmasını inhibe eder (30). Ayrıca OB-R_L olgun osteoblast ve kondrositlerde de bulunmaktadır. Bu da leptinin direkt olarak büyüme düzenleyici etkisinin olduğunu göstermektedir (4). Leptin osteoblastları ve osteoklastları etkileyerek kemik üzerinde direkt etki yapar ve sistemik leptin uygulanması kemik fragilitesini azaltır (34).

3. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Kasım 2009 ve Mayıs 2010 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

Çalışmada, denek olarak 54 adet, ortalama ağırlıkları 323 gr (295-352 gr) olan, 16 haftalık Spraque Dawley cinsi, erkek 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 adaptasyon döneminden sonra rasgele seçilmiş 18'erli 3 gruba ayrıldı. 1. grup kontrol, 2. ve 3. gruplar ise çalışma grubu olarak planlandı. Çalışma gruplarına farklı dozlarda Leptin (Leptin Rat, Recombinant, BioVendor, Czech Republic) 0,5 ml olacak şekilde verildi. Gruplar; 0,5 ml serum fizyolojik verilen **kontrol grubu**, 0,1µg/kg leptin verilen **0,1 leptin grubu** ve 0,3µg/kg leptin verilen **0,3 leptin grubu** olarak belirlendi. Bu gruplar da kendi içerisinde 14. gün, 21. gün ve 35. günde değerlendirilmek üzere 6'şar sıçandan oluşan 3'er alt gruba ayrıldı. Böylece 9 grup elde edildi.

3.1. Cerrahi Teknik

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 süpin pozisyonda yerleştirildi. Sağ tibia cildi hem

ameliyat öncesi hem de sonrasında %10'luk povidone iodine (Batticon; Adeka, Samsun, Türkiye) solüsyonu ile temizlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Cerrahi uygulanacak bölgenin hazırlanması.

Daha sonra 1 mm çapındaki Kirschner çivisi cilt ve patellar ligament geçilerek sağ tibianın meduller kavitesi içine yerleştirildi ve tibia distaline doğru ilerletildi. Sonra 1 cm'lik longitudinal cilt insizyonu yapılarak direkt olarak tibiaya ulaşıldı ve ince bir drille tibianın orta bölgesine 3 adet delik açıldı. Kirschner çivisi tibianın içerisinde tutulurken el ile nazik bir manüplasyon yapılarak tibia kırıldı (35) (Şekil 2a, b). Daha sonra cilt 3.0 rapid vicryl ile kapatıldı.

İşlemden sonra sıçanlar normal beslenme ve yaşama şartlarına (her kafeste bir tane olacak şekilde) bırakıldı. Anestezinin etkisi geçtikten sonra; sıçanların kırık ayağına yük vermesinde herhangi bir kısıtlamaya gidilmedi. Sıçanlara, cerrahi işlemde önce veya sonra herhangi bir antibiyotik tedavisi uygulanmadı.



Şekil 2a. Tibiannın meduller kavitesi içine yerleştirilmiş Kirschner çivisi.



Şekil 2b. Oluşturulan tibia kırığının makroskopik görünümü.

Kontrol grubuna, cerrahi uygulanan günden başlamak üzere 14 gün boyunca her gün aynı saatte (08:00) günde bir kez intraperitoneal olarak 0,5 ml serum fizyolojik uygulandı. Bu grup cerrahi kontrol grubu olarak kullanıldı. Cerrahi uygulanan günden başlamak üzere 14 gün boyunca her gün aynı saatte (08:00) olacak şekilde; 0,1 leptin grubuna intraperitoneal olarak günde bir kez 0,1µg/kg, 0,3 leptin grubuna ise 0,3µg/kg Leptin uygulandı (Şekil 3).



Şekil 3. İntraperitoneal enjeksiyon uygulanması.

Her üç gruptan da, deneyin başlangıcında rasgele belirlenmiş olan 6'şar sıçan 14. günde, 6'şar sıçan 21. günde ve kalan 6'şar sıçan ise 35. günde anestezi uygulandıktan sonra servikal dislokasyon ile öldürüldü. Sıçanların sağ bacakları diz eklemi proksimalinden ampute edildi. Röntgen grafileri çekildikten sonra yumuşak dokuları diseke edilen örnekler histolojik değerlendirme için hazırlanmak üzere % 10'luk formaldehitin içine koyuldu.

3.2. Histolojik Takip, Boyama Ve Değerlendirme

Alınan örnekler nazikçe diseke edilerek kalan yumuşak dokuları uzaklaştırıldı ve kemikler kırık hattı görünecek şekilde her iki uçtan kısaltılarak, ayrı ayrı %10'luk nötral formaldehid solüsyonu içeren numaralandırılmış kaplara konuldu. 30 dakika sonra kanlanan solüsyon değiştirildi ve dokular 48 saat süreyle fikse edildi (36).

Fiksasyonu tamamlanan dokuların dekalsifikasyonu (kalsiyum tuzlarının dokudan uzaklaştırılması) için %10'luk formik asit solüsyonu kullanıldı. Dekalsifikasyon işlemi süresince solüsyon iki günde bir yeniden hazırlanarak değiştirildi (37). Yirmi gün oda sıcaklığında bu şekilde dekalsifiye edilen dokular dört saat akarsuda yıkandıktan sonra, dehidratasyon için alkol serilerinden geçirildi ve ksilen ile şeffaflaştırılmanın ardından parafine gömüldü (38).

Hazırlanan parafin bloklar mikrotom (Leica RM2255, Japan) ile 5 mikrometre (μm) kalınlığında kesilerek numaralanmış lamalar üzerine alındı.

Lam üzerine alınan kesitler zembil içine yerleştirildi ve etüvde 50°C'de 30 dakika bekletildikten sonra ksilen ve alkol serileri ile parafini giderilerek hidrate edildi. Bu şekilde hazırlanan kesitler hematoksilin ve eozin (H&E) ve safranin O ve fast green (SO&FG) boyama protokolleri (Tablo 1) ile boyandıktan sonra; alkol serileri ve ksilen uygulanarak dehidrate edilen preparatlar entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

Tablo 1: Hematoksilin ve Eozin ve Safranin O ve Fast Green boyama protokolleri

Hematoksilen ve Eozin Protokolü	Safranin O ve Fast Green Protokolü
1. Deparafinize ve hidrate etme	1. Deparafinize ve hidrate etme
2. Hematoksilin ile 5 dakika	2. Weigert demirli hematoksilini 10 dakika
3. Su ile yıkama	3. Akarsuda yıkama 10 dakika
4. Asit alkole daldırıp çıkarma	4. %0,001'lik fast green ile 5 dakika
5. Akarsuda yıkanarak morartma	5. %1'lik asetik asite daldırıp çıkarma
6. Eozin ile 5 dakika	6. %0,1'lik safranin O ile 5 dakika
7. Su ile yıkama	7. Entellan damlatarak lam ile kapatma
8. Alkol ve ksilen ile dehidrate etme	
9. Entellan damlatarak lam ile kapatma	

Hazırlanan preparatlar dijital kamera (Olympus DP71-Japan) takılı ışık mikroskobu (Olympus BX51-Japan) ile değerlendirilerek dijital ortama aktarıldı (DP controller 3.3.1292 version Olympus Corporation-Japan).

Preparatların histolojik değerlendirilmesinde Huo ve arkadaşlarının histolojik puanlama sistemi kullanıldı (Tablo 2) (39).

Tablo 2: Huo histolojik puanlama sistemi

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

3.3. Radyolojik Değerlendirme

Çekilen radyografiler, Lane-Sandhu puanlama sistemi kullanılarak değerlendirildi (40). Bu sisteme göre kemik oluşumu, kaynama ve yeniden şekillenme esas alındı (Tablo 3).

Tablo 3: Lane-Sandhu puanlama sistemi

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

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 13.0 programı kullanıldı. Grupların ölçümsel verilerinin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi (post hoc olarak Mann Whitney U testi) kullanıldı. Ölçümle elde edilen veriler median (min-max) olarak gösterildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak alındı; çoklu karşılaştırmalarda (post hoc) ise anlamlılık düzeyi $p < 0.05 / \text{karşılaştırma sayısı}$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Klinik bulgular

Anestezi ve enjeksiyonlara 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 tekrar açılma gözlenmedi. Çalışma süresince hiçbir sıçan ölmedi.

4.2. Radyolojik bulgular

Değerlendirilen radyografilerde, tüm sıçanlarda değişik derecelerde kaynama tespit edildi (Şekil 4a, b, c). Lane-Sandhu sistemine göre yapılan değerlendirme sonucunda elde edilen veriler Tablo 4'de görülmektedir.

Tablo 4: Lane-Sandhu puanlama sistemine göre elde edilen veriler

	14. Gün median (min-max)	21. Gün median (min-max)	35. Gün median (min-max)
Kontrol Grubu	0,5 (0-1)	2 (1-2)	2,5 (2-3)
0,1 Leptin Grubu	1 (0-1)	2 (2-3)	3,5 (3-4)
0,3 Leptin Grubu	1 (1-2)	2,5 (2-3)	4 (3-4) ^a

a: Kontrol ve 0,3 Leptin grubu arasında 35. günde Mann-Whitney U testi ile istatistiksel anlamlılık bulundu ($p < 0.017$).

Grupların radyolojik değerlendirme sonuçları karşılaştırıldığında 14. ve 21. günlerde gruplar arasında istatistiksel fark yoktu ($p=0,052$, $p=0,052$), 35. günde ise gruplar arasında istatistiksel fark vardı ($p=0,014$). Bu farkın kontrol grubu ile 0,3 leptin grubu arasındaki farktan kaynaklandığı anlaşıldı ($p=0,011$). 0,1 Leptin grubu ile 0,3 Leptin grubu arasında 35. günde istatistiksel fark yoktu ($p=0,575$).



Şekil 4a. Sırasıyla kontrol, 0,1 ve 0,3 Leptin gruplarının 14. gündeki radyolojik görüntüleri. Kırık hattı her üç grupta da açık bir şekilde mevcuttu. Değerlendirme sistemine göre gruplar arasında bariz bir fark tespit edilemedi.



Şekil 4b. Sırasıyla kontrol, 0,1 ve 0,3 Leptin gruplarının 21. gündeki radyolojik görüntüleri. Kırık hattı özellikle 0,3 leptin grubunda kaybolmaya başlamakla beraber değerlendirme sistemine göre gruplar arasında bariz bir fark tespit edilemedi.



Şekil 4c. Sırasıyla kontrol, 0,1 ve 0,3 Leptin gruplarının 35. gündeki radyolojik görüntüleri. Kontrol grubuyla 0,3 leptin grubu arasında istatistiksel olarak fark vardı.

Kontrol grubuna ait 14., 21., ve 35. günde elde edilen radyolojik veriler incelendiğinde değerlerin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Benzer şekilde 0.1 leptin grubunda ($p=0,001$) ve 0.3 leptin grubunda ($p=0,001$) 14., 21. ve 35. günler arasında istatistiksel fark vardı. Bu da bize radyolojik iyileşmenin, hem kontrol hem de leptin grupları için zaman içerisinde aksamaya uğramadan devam ettiğini göstermiştir.

4.3. Histolojik bulgular

Preparatların histolojik değerlendirilmesinde Huo ve arkadaşlarının histolojik puanlama sistemi kullanıldı (39). Bu sınıflandırmaya göre gruplara ait preparatlar fibröz doku, kıkırdak doku, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış kemik doku oluşumu açısından histolojik olarak değerlendirildi.

Kontrol grubunun 14. gündeki H&E boyamasında; kırık hattında kondrositlerin yoğun olduğu kıkırdak doku hakimiyeti ve yer yer fibröz bağ dokusu izlendi (Şekil 5a). SO&FG ile yapılan boyamada kondrositler belirgin idi ve kıkırdak doku ara maddesi kırmızı renkte görülmekteydi (Şekil 5b).

0,1 leptin grubunun 14. gündeki H&E boyamasında; kırık hattında yaygın kıkırdak doku hakimiyeti mevcut idi. Kıkırdak doku arasında yer yer olgunlaşmamış kemik doku izlendi (Şekil 6a). SO&FG ile yapılan boyamada olgunlaşmamış kemiğe ait kemik spikülleri yeşil renkte görülmekteydi (Şekil 6b).

0,3 leptin grubunun 14. gündeki değerlendirmesinde; H&E boyamada kıkırdak doku yanında az miktarda olgunlaşmamış kemik doku izlendi (Şekil 7a). SO&FG ile yapılan boyamada kıkırdak doku arasında olgunlaşmamış kemiğe ait yapılar yeşil renkte izlendi (Şekil 7b).

Kontrol grubunun 21.gündeki incelemesinde; H&E boyamada, eşit miktarda kıkırdak doku, olgunlaşmamış kemik doku ve olgunlaşmamış kemik doku içerisinde yer yer kemik iliği izlendi (Şekil 8a). SO&FG ile yapılan boyamada kırmızı renkteki kıkırdak doku yerini yer yer yeşil renkte izlenen olgunlaşmamış kemik dokuya bırakmakta idi (Şekil 8b).

0,1 leptin grubunun 21. gündeki incelemesinde; H&E boyamada, kırık hattında eşit miktarda kıkırdak doku ve olgunlaşmamış kemik dokusu izlendi (Şekil 9a). SO&FG ile

yapılan boyamada yeşil renkte izlenen kemik doku spikülleri arasında yer yer kırmızı renkte kıkırdak dokuya ait yapılar görüldü (Şekil 9b).

0,3 leptin grubunun 21. gündeki incelemesinde; H&E boyamada, yaygın olarak olgunlaşmamış kemik dokusu ve ortasında kıkırdak doku izlendi (Şekil 10a). SO&FG ile yapılan boyamada yaygın olarak yeşil renkte kemik spikülleri ve aralarında yer yer lacivert renkte kemik iliği ayırt edilmekteydi. Az miktarda ise kırmızı renkte kıkırdak doku izlendi (Şekil 10b).

Kontrol grubunun 35. gündeki incelemesinde H&E boyamada, yaygın olarak kıkırdak doku hakimiyeti ve az miktarda olgunlaşmamış kemik dokusu mevcuttu (Şekil 11a). SO&FG ile yapılan boyamada kırmızı renkte görülen kıkırdak ara maddesi hakimiyeti dikkati çekmekteydi (Şekil 11b).

0,1 leptin grubunun 35. gündeki incelemesinde H&E boyamada, bol miktarda olgunlaşmamış kemik dokusu ve yer yer kıkırdak adacıkları içeren kırık hattı izlendi (Şekil 12a). SO&FG ile yapılan boyamada yeşil renkte izlenen kemik spikülleri ve aralarındaki kırmızı renkli kıkırdak adacıkları dikkati çekti (Şekil 12b).

0,3 leptin grubunun 35.gündeki incelemesinde H&E boyamada, olgunlaşmamış kemik spiküllerinin hakimiyeti ve aralarında çok az miktarda kıkırdak doku adacıkları izlendi (Şekil 13a). SO&FG ile yapılan boyamada yine yaygın olarak olgunlaşmamış kemik spikülleri yeşil renkte ve aralarındaki kıkırdak adacıkları da kırmızı renkte izlendi (Şekil 13b).

Huo sınıflandırmasına göre yapılan histolojik değerlendirme sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 5’de görülmektedir.

Tablo 5: Huo sınıflandırmasına göre histolojik değerlendirme verileri

	14. Gün median (min-max)	21. Gün median (min-max)	35. Gün median (min-max)
Kontrol Grubu	4 (3-5)	5 (5-6)	6 (5-6)
0,1 Leptin Grubu	4,5 (3-5)	6 (5-6)	7 (6-7) ^b
0,3 Leptin Grubu	5 (4-6)	6,5 (6-7) ^a	7 (7-8) ^b

a:Kontrol ve 0,3 Leptin grubu arasında 21. günde Mann-Whitney U testi ile istatistiksel anlamlılık bulundu ($p<0.017$).

b:Kontrol ile 0,3 ve 0,1 Leptin grupları arasında 35. günde Mann-Whitney U testi ile istatistiksel anlamlılık bulundu ($p<0.017$).

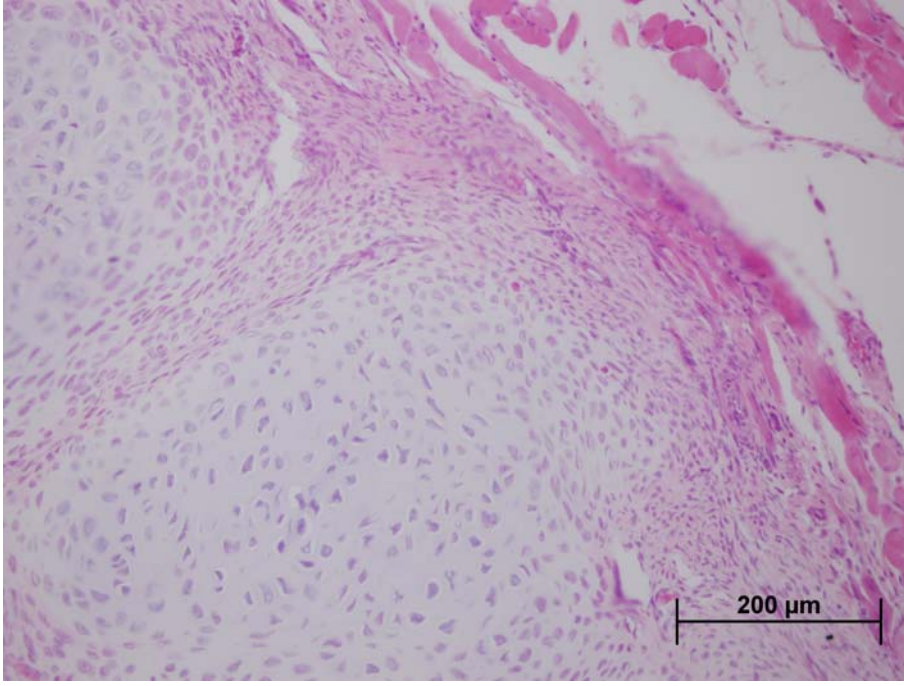
Grupların sonuçları karşılaştırıldığında; 14. günde gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ($p=0,102$). 21 ve 35. günlerde ise gruplar arasında istatistiksel fark mevcuttu (sırasıyla $p=0,012$, $p=0,001$).

21. gündeki farkın kontrol grubu ile 0,3 Leptin grubu arasındaki farktan kaynaklandığı görüldü ($p=0,011$). Kontrol grubu ile 0,1 Leptin grubu ve Leptin grupları arasında ise istatistiksel fark yoktu (sırasıyla $p=0,093$, $p=0,043$).

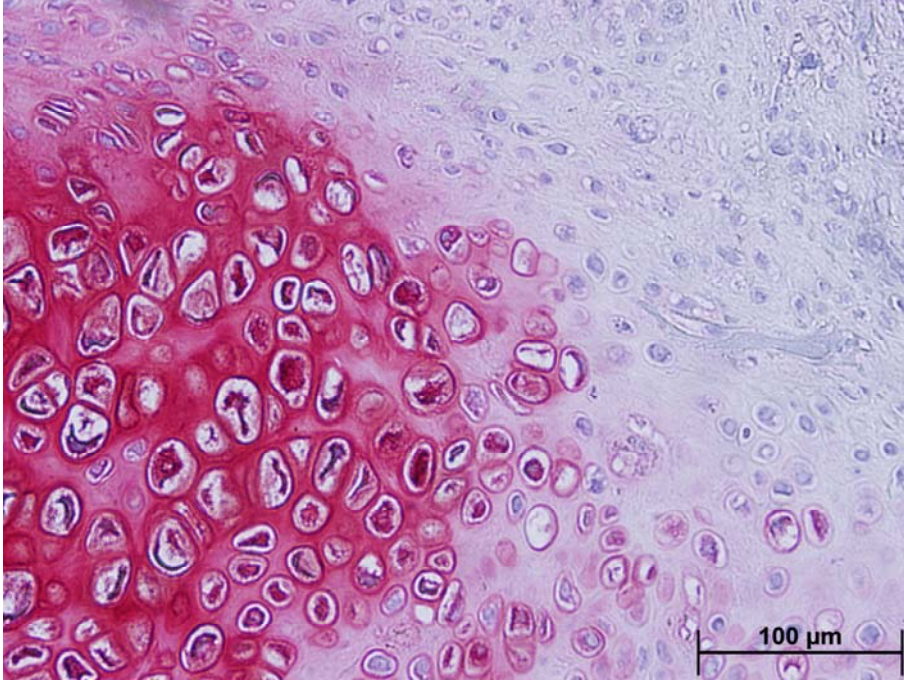
35. gündeki fark incelendiğinde; hem kontrol grubu ile 0,1 Leptin grubu arasında, hem de kontrol grubu ile 0,3 Leptin grubu arasında istatistiksel fark vardı (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,002$). Leptin grupları arasında ise istatistiksel fark yoktu ($p=0,176$).

Kontrol grubuna ait 14., 21., ve 35. günde elde edilen histolojik veriler incelendiğinde değerlerin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Benzer şekilde 0.1 leptin grubu ve 0.3 leptin grubunun 14., 21. ve 35. günleri arasında istatistiksel fark vardı (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,002$). Bu da bize radyolojik iyileşmenin, hem kontrol hem de Leptin grupları için zaman içerisinde aksamaya uğramadan devam ettiğini gösterdi.

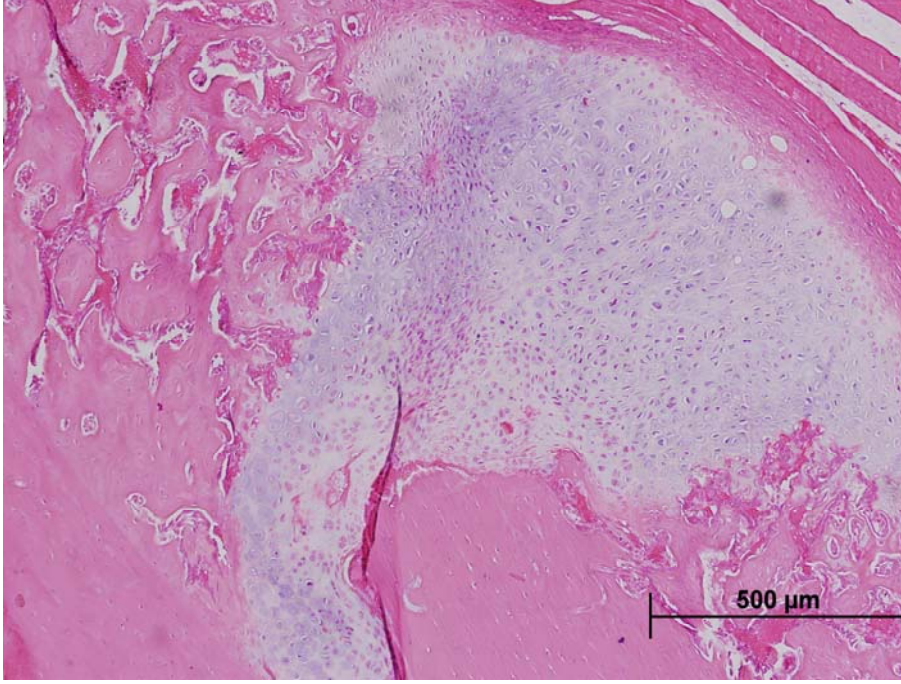
Kırık iyileşme süreci boyunca çalışma gruplarımızdaki kırık hatlarında histolojik olarak fibröz dokudan kıkırdağa, kıkırdak dokudan olgunlaşmamış kemik dokuya doğru bir değişim süreci izlendi. Bu dokuları temsil eden kondrosit, osteoblast, osteosit, osteoklast gibi hücreler gözlemlendi (Şekil 14, 15, 16)



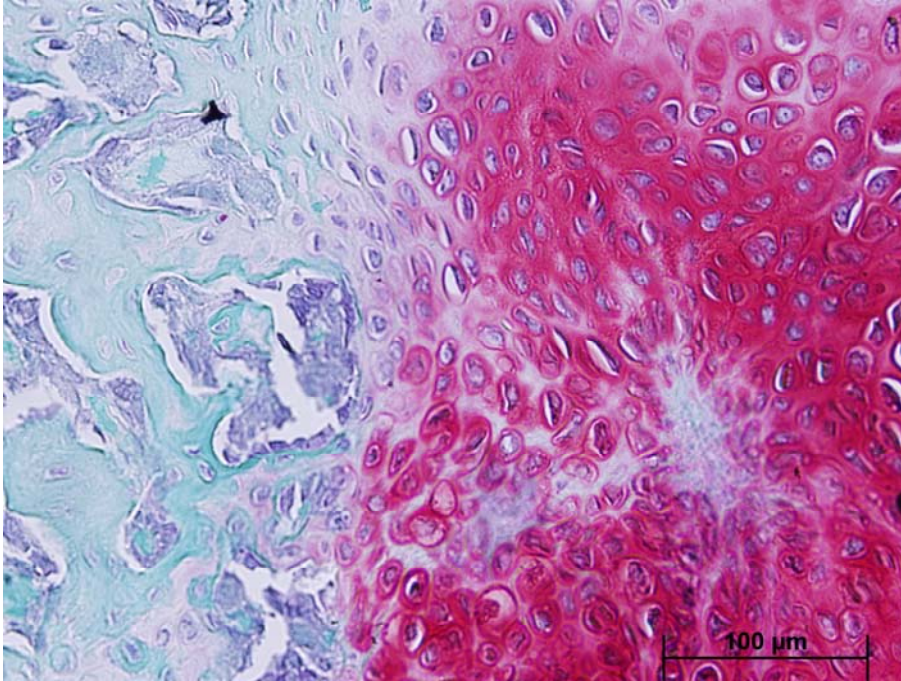
Şekil 5a. Kontrol grubunun 14. gündeki (H&E) ile boyama görüntüsünde bol miktarda kıkırdak doku ve yer yer fibröz doku görülmekte (H&E X20).



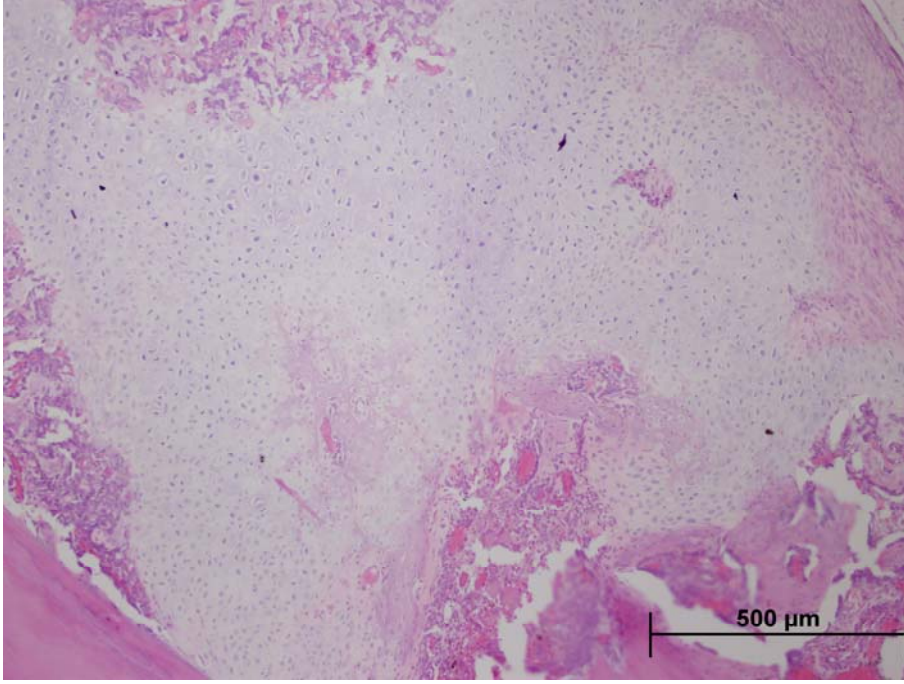
Şekil 5b. Kontrol grubunun 14. gündeki SO&FG ile boyama görüntüsünde kırık hattındaki kıkırdak doku ara maddesinin kırmızı ile boyandığı görülmekte (SO&FG X40).



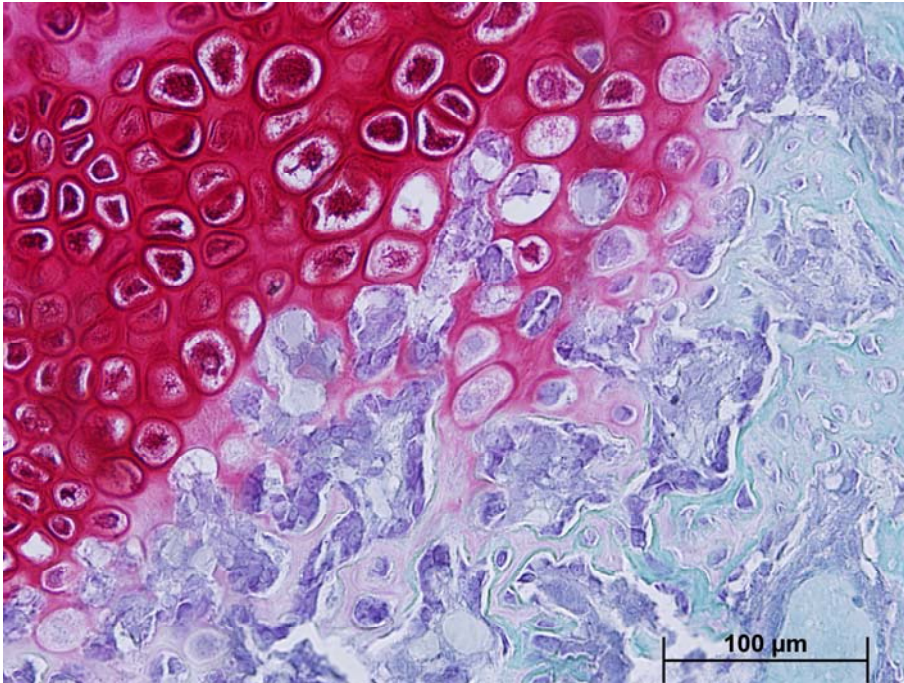
Şekil 6a. 0,1 leptin grubunun 14. gündeki görüntüsünde kırık hattında az miktarda olgunlaşmamış kemik ve bol miktarda kıkırdak doku görülmekte (H&E X10).



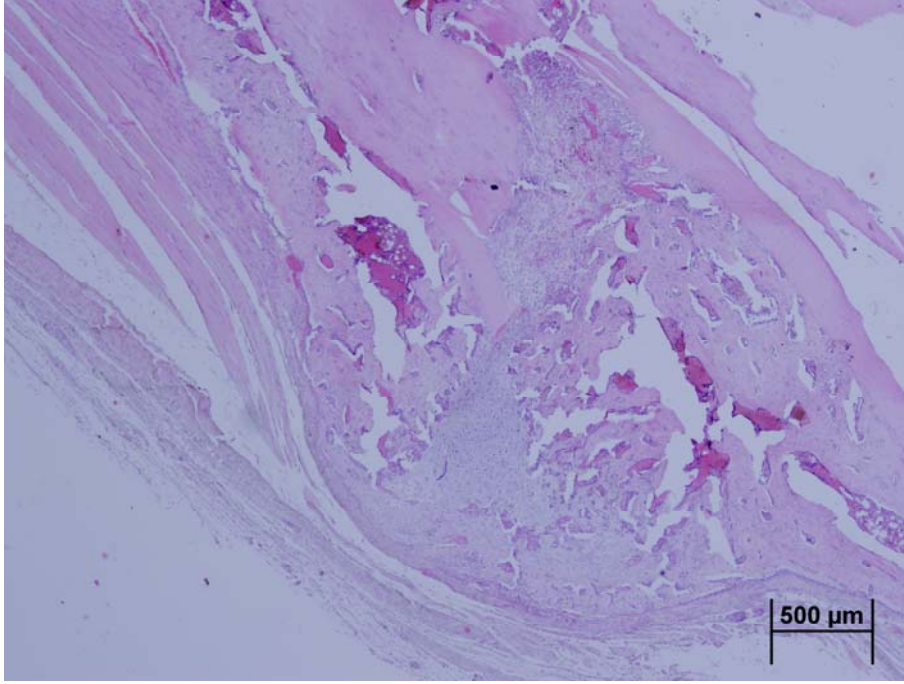
Şekil 6b. 0,1 leptin grubunun 14. gündeki görüntüsünde kırmızı boyalı kıkırdak doku ara maddesi ve yeşil boyalı olgunlaşmamış kemiğe ait kemik spikülleri görülmekte (SO&FG X40).



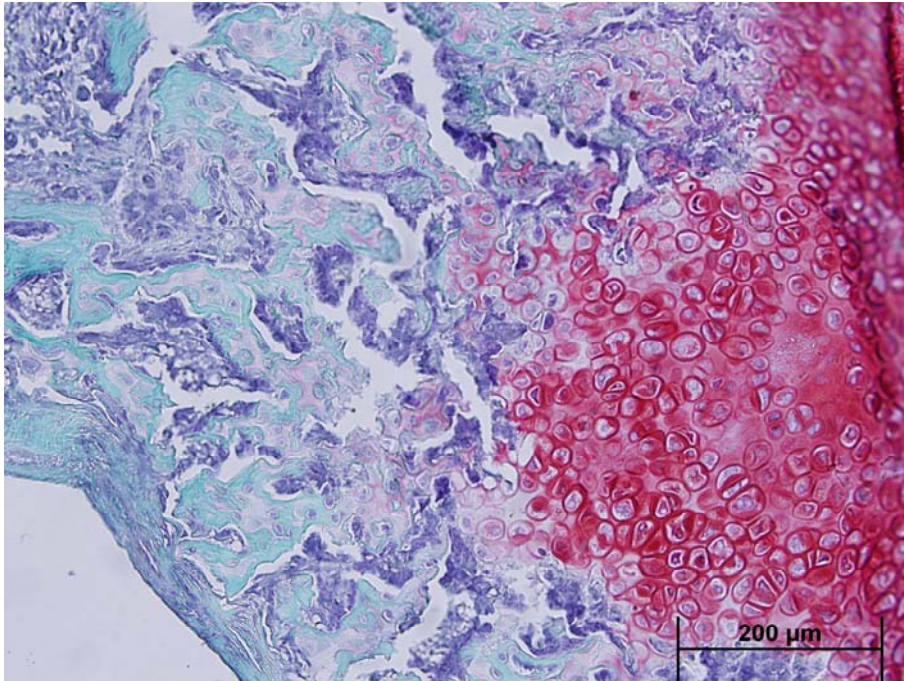
Şekil 7a. 0,3 leptin grubunun 14. gündeki görüntüsünde az miktarda olgunlaşmamış kemik ve bol miktarda kıkırdak doku görülmekte (H&E X10).



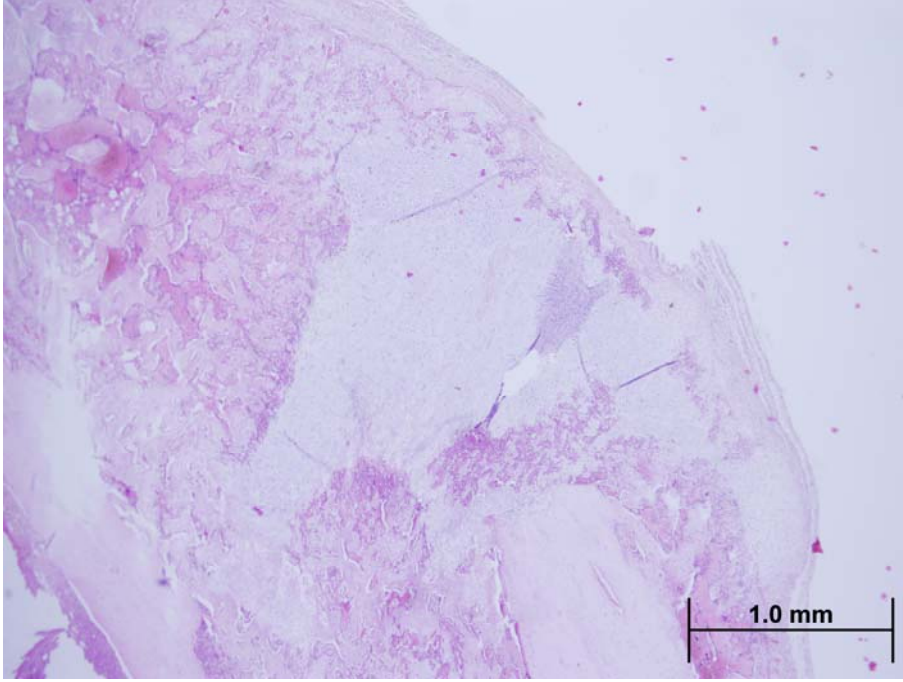
Şekil 7b. 0,3 leptin grubunun 14. gündeki görüntüsünde kırmızı boyalı kıkırdak doku ve bu dokunun yerini yeşil boyalı olgunlaşmamış kemiğe bırakması görülmekte (SO&FG X40).



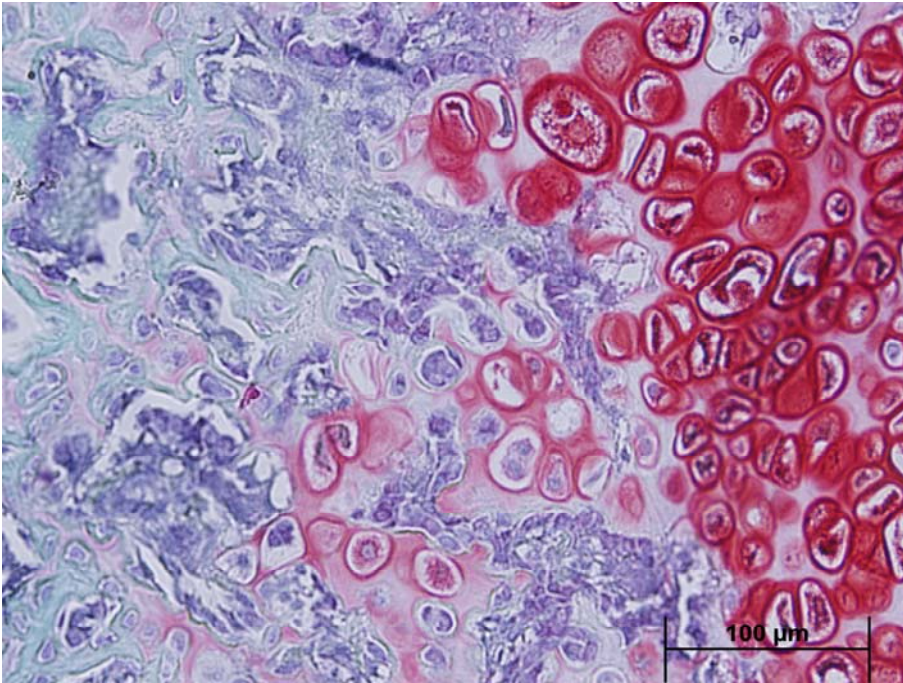
Şekil 8a. Kontrol grubunun 21. gündeki görüntüsünde eşit miktarda kıkırdak ve olgunlaşmamış kemik doku içeren kırık hattının longitudinal kesiti görülmekte (H&E X4).



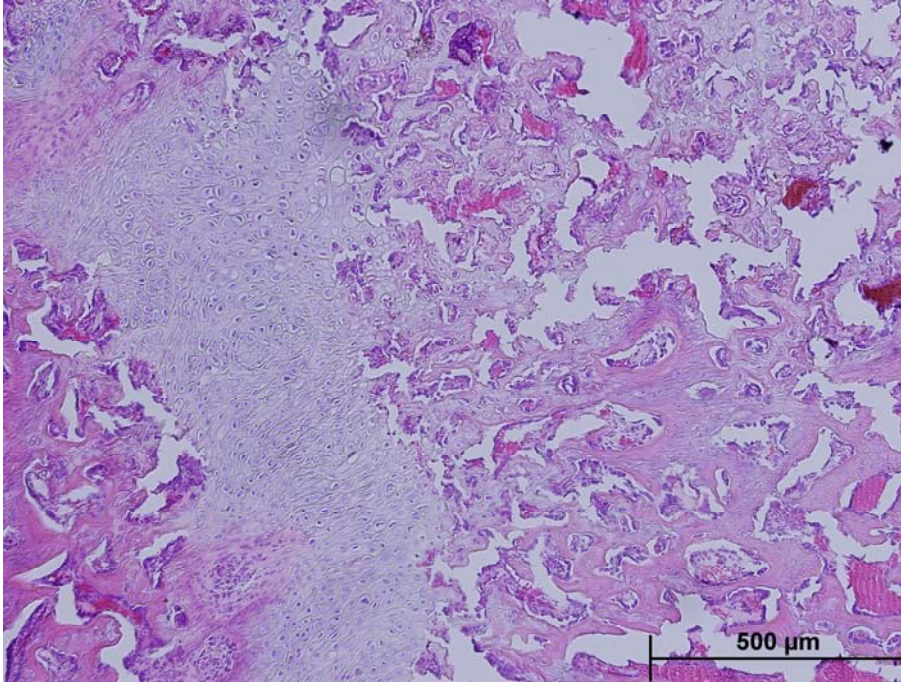
Şekil 8b. Kontrol grubunun 21. gündeki görüntüsünde kırmızı boyalı kıkırdak dokunun yerini yer yer bol miktarda kemik iliği içeren yeşil boyalı olgunlaşmamış kemiğe bıraktığı görülmekte (SO&FG X20).



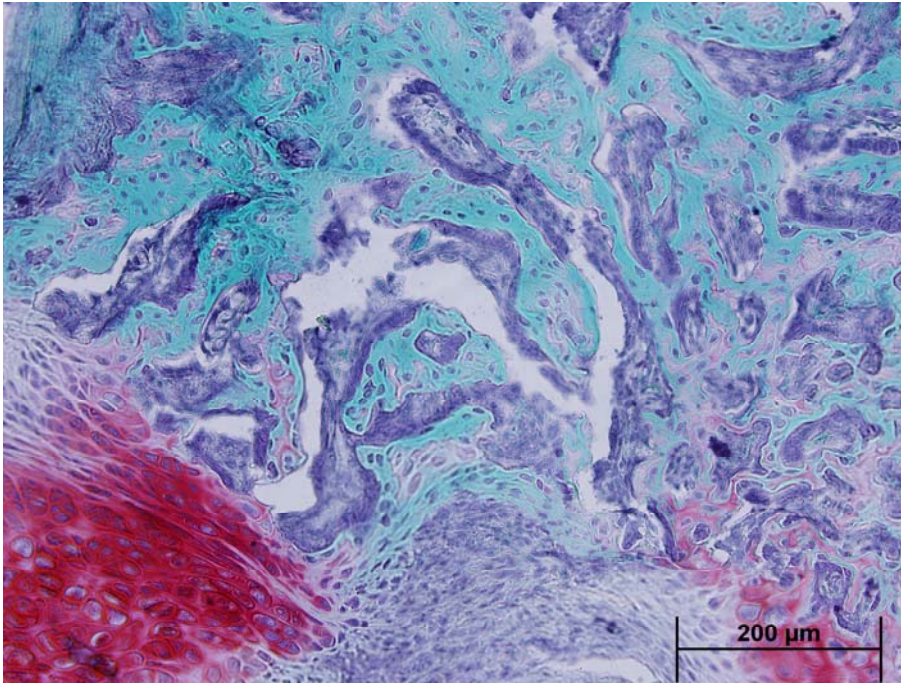
Şekil 9a. 0,1 leptin grubunun 21. günde ki görüntüsünde eşit miktarda olgunlaşmamış kemik ve kıkırdak doku içeren kırık hattı görülmekte (H&E X10).



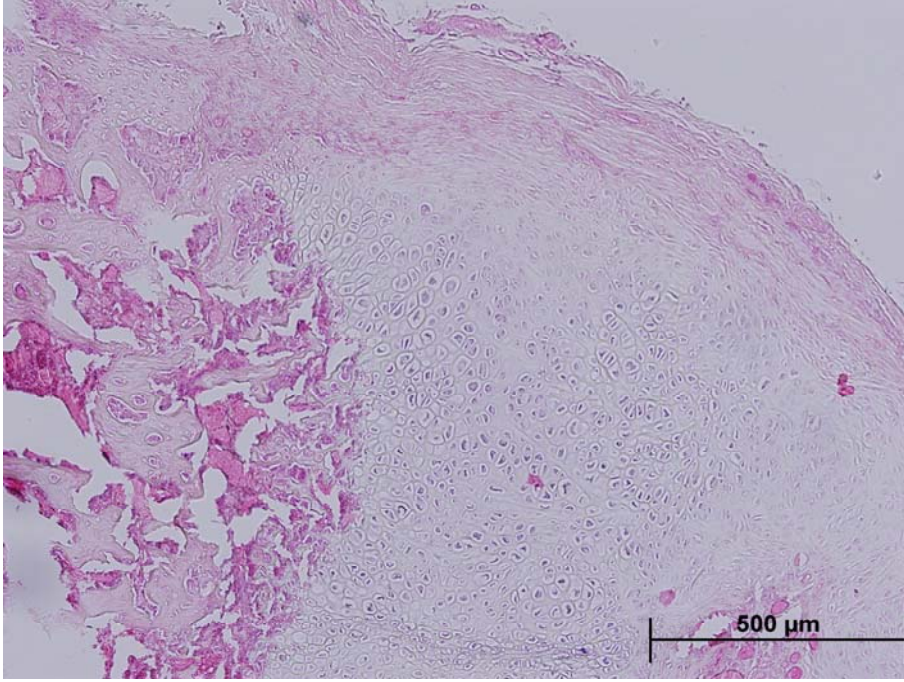
Şekil 9b. 0,1 leptin grubunun 21. günde ki görüntüsünde olgunlaşmamış kemiğe ait kemik spikülleri arasına uzanan kırmızı boyalı kıkırdak adacıkları görülmekte (SO&FG X40).



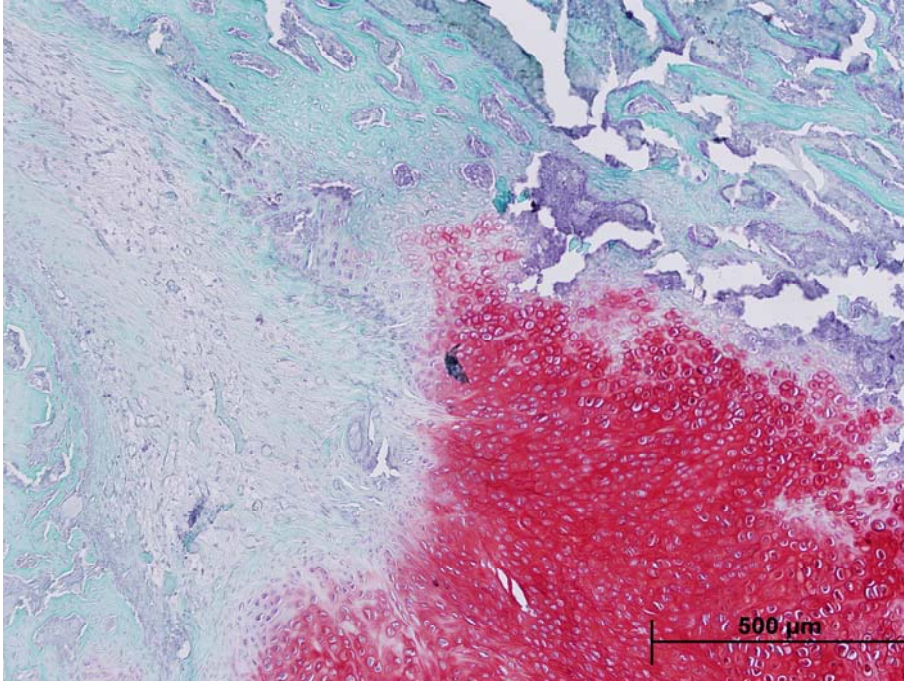
Şekil 10a. 0,3 leptin grubunun 21. gündeki görüntüsünde bol miktarda olgunlaşmamış kemik ve kıkırdak doku içeren kırık hattı görülmekte (H&E X10).



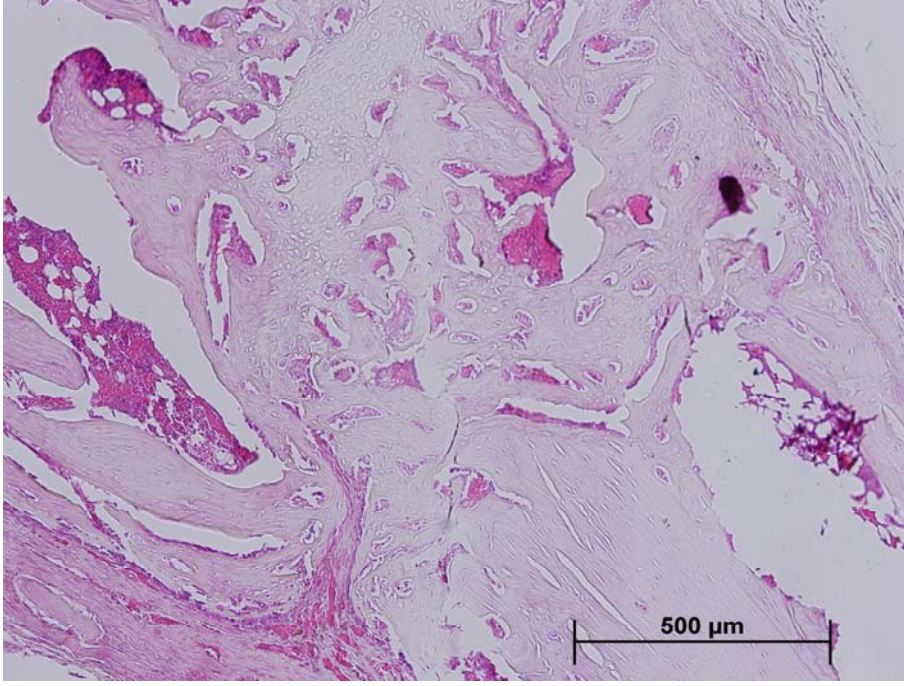
Şekil 10b. 0,3 leptin grubunun 21. gündeki görüntüsünde olgunlaşmamış kemiğe ait yeşil boyalı kemik spikülleri arasında lacivert-siyah boyalı kemik iliği; yer yer kırmızı boyalı kıkırdak doku ve ara maddesi görülmekte (SO&FG X20)



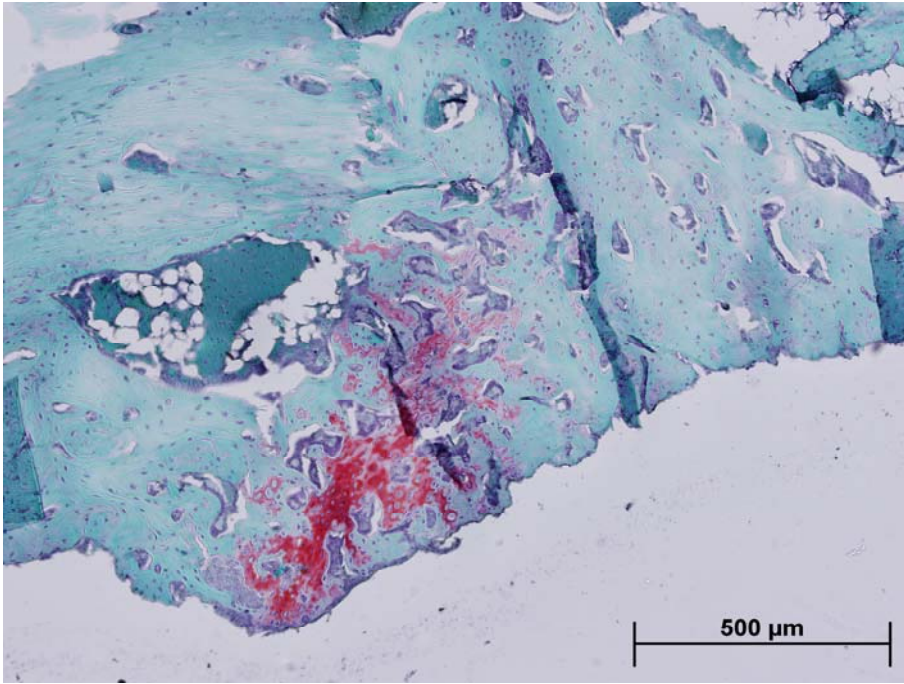
Şekil 11a. Kontrol grubunun 35. gündeki görüntüsünde ağırlıklı kıkırdak ve az miktarda olgunlaşmamış kemik doku içeren kırık hattı görülmekte (H&E X10).



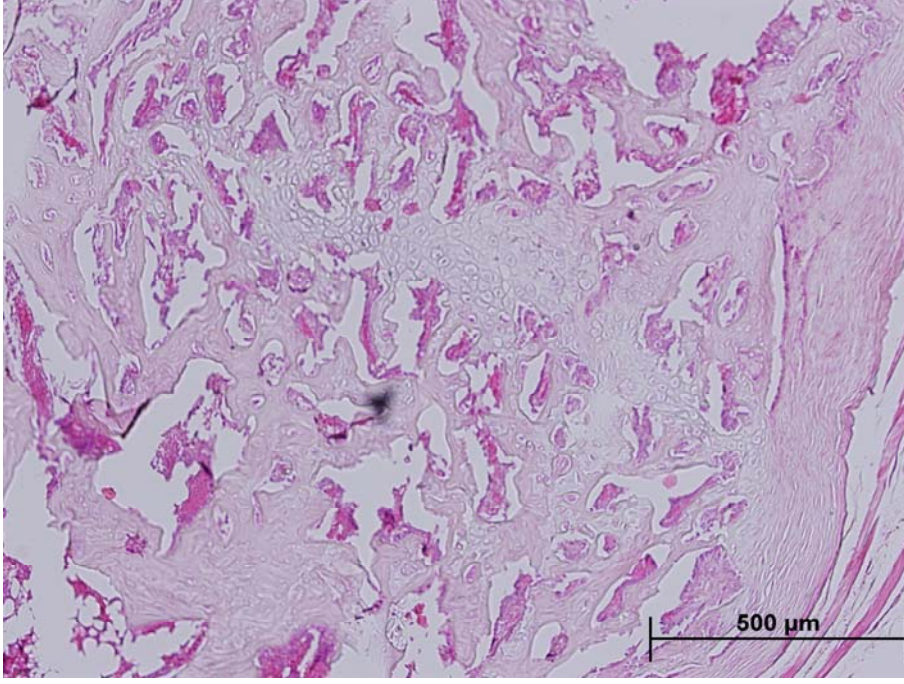
Şekil 11b. Kontrol grubunun 35. gündeki görüntüsünde kırmızı boyalı kıkırdak doku ve yer yer yeşil boyalı olgunlaşmamış kemik spikülleri görülmekte (SO&FG X10).



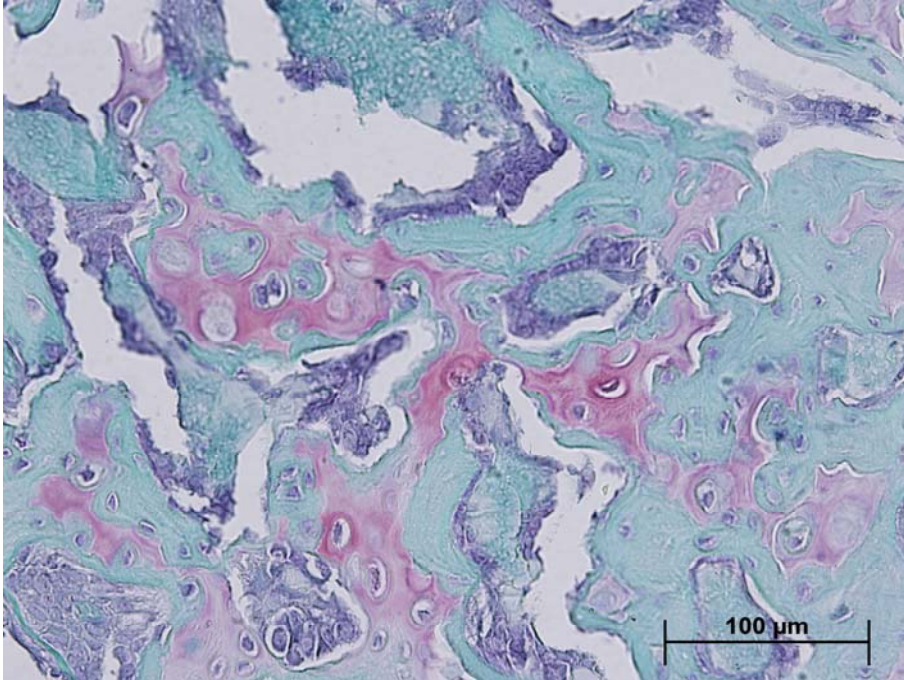
Şekil 12a. 0,1 leptin grubunun 35. gündeki görüntüsünde bol miktarda olgunlaşmamış kemik spikülleri ve yer yer kırıkta adacıkları içeren kırık hattı görülmekte (H&E X10).



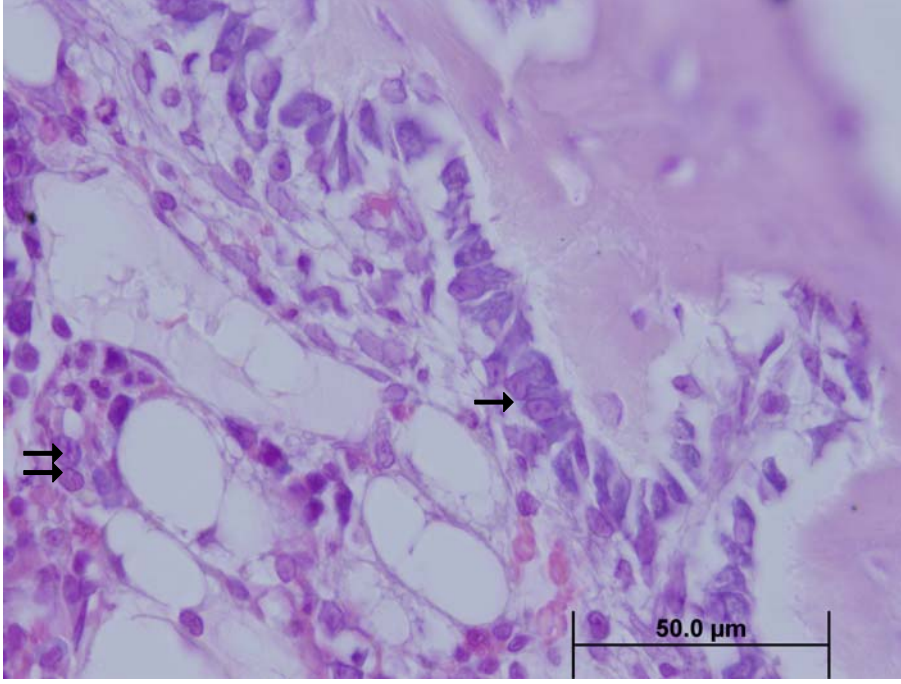
Şekil 12b. 0,1 leptin grubunun 35. gündeki görüntüsünde bol miktarda olgunlaşmamış kemiğe ait yeşil boyalı kemik spikülleri arasına uzanan kırmızı boyalı az miktarda kırıkta doku görülmekte (SO&FG X4).



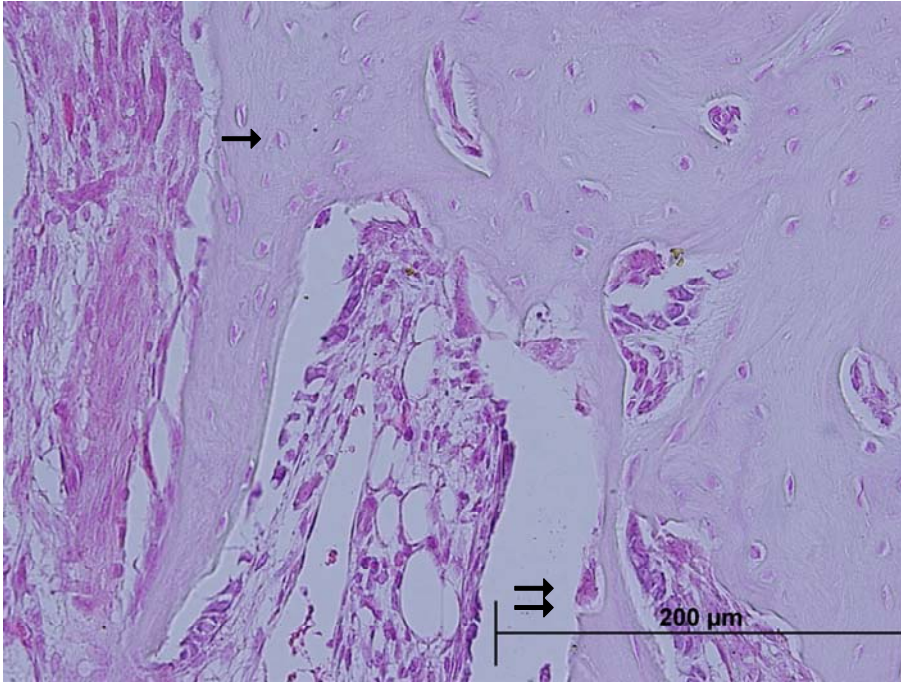
Şekil 13a. 0,3 leptin grubunun 35. gündeki görüntüsünde bol miktarda olgunlaşmamış kemik spikülleri içinde az miktarda kıkırdak adacıkları içeren kırık hattı görülmekte (H&E X10).



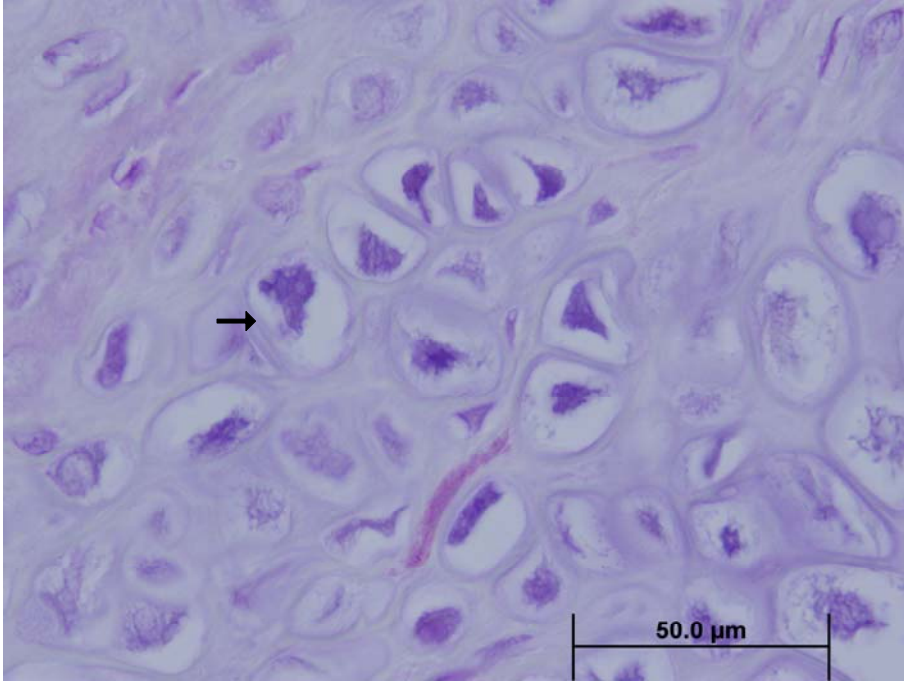
Şekil 13b. 0,3 leptin grubunun 35. gündeki görüntüsünde bol miktarda olgunlaşmamış kemiğe ait yeşil boyalı kemik spikülleri arasında kırmızı boyalı az miktardaki kıkırdak dokunun yerini yer yer kemik dokuya bırakması görülmekte (SO&FG X40).



Şekil 14. Kemik spikülü kenarında epitel hücreleri benzeri bir şekilde dizili osteoblastlar (→) ve kemik iliği (⇨) görülmekte (H&E X100).



Şekil 15. Kemik spikülleri kenarında Howship lakünası içinde çok çekirdekli osteoklastlar (⇨) ve lakünalar içinde osteositler (→) görülmekte (H&E X40).



Şekil 16. Lakünalar içinde yerleşmiş kondrositler (→) (H&E X100).

5. TARTIŞMA

Vücut yağ kitlesi ve kemik metabolizması arasındaki ilişkilerin açıklanması için yapılan çalışmalar gittikçe artarak devam etmekte ve literatürdeki yerini almaktadır. Özellikle son zamanlarda bu konuda yapılan çalışmalarda bir adipokin olan leptin popülerlik kazanmış; ancak bu ilişkideki pek çok nokta halen aydınlatılamamıştır. Kesin olan şudur ki, leptin kemik ve yağ dokusu arasında önemli fonksiyonel bir bağlantı sağlamaktadır (41-44).

Yapılan çalışmalarda özellikle leptinin angiogenez ve kondrosit, osteoblast farklılaşması üzerine olan etkilerinin açığa çıkarılması, bizi literatürde var olan leptin-osteoporoz çalışmalarının yanı sıra kırık iyileşmesi ile olabilecek ilişkisini araştırmaya yöneltti. Literatürde leptin ile kırık iyileşmesi ilişkisini araştıran bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır.

Kırık iyileşmesi hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve ekstrasellüler matriksin birbirlerini karşılıklı etkilemelerini kapsayan, iskelet büyüme ve gelişmesini özetleyen bir süreçtir (45-47). Hücresel düzeyde inflamatuvar hücreler, vasküler hücreler, osteokondral progenitör hücreler ve osteoklastlar onarım sürecinde anahtar rol oynarlar. Moleküler düzeyde ise pro-inflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri, pro-osteojenik faktörler ve anjiyojenik faktörler kırık onarımında rol oynarlar (45,48).

Başarılı kırık iyileşmesi iç içe geçmiş aşamalar serisidir. Bu aşamalar inflamasyon ile başlar, intramembranöz ossifikasyon, kondrogenezis, endokondral ossifikasyon ile devam eder ve remodeling ile tamamlanarak skarsız tamir ile sonuçlanır (45,49). 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 (46).

Literatürdeki bazı çalışmalarda leptinin kemik iliği stromal hücrelerinden adipogenezise farklılaşmayı inhibe ederken, osteoblastlara farklılaşmayı stimule ettiği belirtilmiştir (27,32). Bu bilgi bize leptinin kırık iyileşmesinde hücresel düzeyde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Leptin kemik kitlesini hipotalamus üzerinden farklı iki mekanizma ile kontrol eder. Birinci olarak, hipotalamusun gold-thioglucose duyarlı nöronlarındaki reseptörlerine bağlanarak sempatik sistemi aktive eder. Bu da osteoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eder. Böylelikle kemik oluşum ve rezorbsiyonu artar (41,42). Leptin osteoblastlardaki RANKL ekspresyonunu osteoblastların sempatik stimülasyonu ile arttırarak kemik rezorbsiyonunu arttırır (43). İkinci olarak; leptin, arkuat nükleus nöronlarındaki pro-opiomelanocortin (POMC) üzerindeki reseptörlerine bağlanarak hipotalamik CART ekspresyonunu arttırır ve bilinmeyen bir mekanizma ile RANKL ekspresyonunu azaltarak kemik rezorbsiyonunu inhibe eder (41).

Hipotalamus üzerinden olan bu iki etki mekanizmasına ek olarak leptin, direkt osteoblastlar üzerindeki reseptörlerine bağlanır, böylece osteoblastların büyümesini ve kemik mineralizasyonunu da arttırır (44).

Ayrıca yapılan bir çalışmada leptin uygulamasının fütal farelerde kondrosit ve osteoblast farklılaşmasını ve çoğalmasını etkileyerek iskelet gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (27).

Gerek osteoblast gerekse kondrosit farklılaşmasının arttırılması kırık iyileşmesinde olumlu katkı gösterebilecek bir etkidir. Biz de çalışmamızda leptin uyguladığımız gruplarda kırık iyileşmesinin kontrol grubuna kıyasla daha ileri seviyede şekillendiğini gözlemledik.

Özellikle intramembranöz ossifikasyonun başlatılmasında osteoblastların rolü dikkate alınacak olursa leptinin bu farklılaşmayı arttırarak dolaylı yoldan intramembranöz ossifikasyon üzerine de olumlu etkisi olabileceği düşünülebilir. Bunun yanı sıra leptin, büyüme plağındaki kondrosit farklılaşmasının düzenlenmesinde ve kırık matris olgunlaşmasında önemli role sahiptir (20). Benzer şekilde leptin endokondral ossifikasyon üzerine de olumlu etkiye sahiptir. Leptin gerek osteoblast farklılaşmasını stimule ederek, gerekse osteoblast üzerindeki reseptörlerine direkt olarak bağlanarak arttırdığı osteoblast büyümesi ve kemik mineralizasyonu yolu ile intramembranöz ossifikasyon üzerine de olumlu etki edebilir (44).

Ovariectomi ile indüklenmiş kemik kaybı olan ratlarda yapılan başka bir deneysel çalışmada, leptin uygulamasının trabeküler kemik kaybını azalttığı ve insan kemik iliği stromal hücrelerinde osteoprotegerin mRNA seviyelerini arttırdığı, RANKL mRNA seviyelerini ise azalttığı belirtilmiştir (50).

Angiogenez, yeni kan damarlarının oluşumudur ve oksijen hemostazı, besinlerin sağlanması, artık ürünlerin atılması, hücre ve biyolojik mediatörleri sağlamak için kırık iyileşmesinde teşvik edilir. Bunun ötesinde angiogenezis intramembranöz kemik oluşumunda ve endokondral ossifikasyonda önemli rol oynar (51,52). Bunlar da kırık iyileşmesinin doğal aşamalarıdır.

Leptinin angiogenezis üzerine etkileri yeni bir konu olmakla beraber, Liapakis ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ratlarda yanık dokusunda eksojen leptin uygulamasının erken doku angiogenezisini arttırdığını bulmuşlardır (53). Benzer şekilde Kume ve arkadaşları da yaptıkları çalışma sonucunda leptinin endokondral ossifikasyondaki angiogenezin düzenlenmesinde rolü olduğunu vurgulamışlardır (5). Bouloumie ve arkadaşları da yaptıkları çalışma sonucunda leptinin angiogenezin güçlü bir modülatörü olduğunu vurgulamışlardır (26). Yine leptinin endotelial hücre göçünü ve aktivasyonunu in vitro, angiogenezisi de in vivo olarak etkilediği gösterilmiştir (26,53). Sonuç olarak leptin angiogenezde önemli bir rol oynar (28). Angiogenez üzerine bu olumlu etkilerinden yola çıkarak benzer şekilde kırık iyileşmesinde de angiogenezi arttırarak oldukça önemli bir role sahip olacağı ortaya çıkar. Nitekim leptin uygulaması ile elde ettiğimiz kırık iyileşmesindeki artıştan önemli oranda bu etkinin rol oynadığını düşünmekteyiz.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz radyolojik verileri değerlendirdiğimizde; gruplar arasında geç dönemde (35. gün) fark olması ve bu farkın kontrol grubu ile 0,3 Leptin Grubu arasında olmasından yola çıkarak leptinin doza bağlı olarak radyolojik kırık iyileşmesini geç dönemde olumlu yönde etkilediğini düşündük. Kontrol, 0,1 ve 0,3 Leptin Gruplarının zaman içerisindeki radyolojik değişiminin kesintiye uğramadan devam ettiğini tespit etmemiz de bize gerek uyguladığımız cerrahi tekniğin gerekse leptinin kırık iyileşme sürecine zıt yada olumsuz bir etkisinin olmadığını düşündürdü.

Histolojik sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde ise; 14. gündeki sonuçlar arasında her ne kadar istatistiksel fark tespit edilmese de grupların ortalama değerleri arasında rakamsal farklılık mevcuttu. 0,3 Leptin grubu 0,1 Leptin grubuna göre, 0,1 Leptin grubu ise Kontrol Grubu'na göre daha yüksek ortalama değerlere sahipti. İlave olarak 21. ve 35.

gündeki çalışma grupları ile Kontrol Grubu arasında istatistiksel fark olduğu gözlemlendi. 21. gündeki fark sadece Kontrol Grubu ile 0,3 Leptin grubu arasında iken, 35. gündeki fark hem 0,1 Leptin hem de 0,3 Leptin Grupları ile Kontrol Grubu arasındaki farktan kaynaklanmaktaydı. Dolayısıyla özellikle histolojik açıdan değerlendirildiğinde radyolojik sonuçlar ile benzer şekilde leptinin doza bağımlı olarak kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini tespit ettik.

Histolojik olarak 35. gündeki tüm grupların 21. gündeki gruplara göre daha fazla iyileşme göstermesi; 21. gündeki gruplarında 14. gündeki gruplara göre daha fazla iyileşme göstermiş olması bize çalışmanın uygun şekilde düzenlendiğini göstermektedir.

Elde ettiğimiz histolojik değerlendirme sonuçlarının literatürdeki benzer histolojik değerlendirme sınıflaması kullanan diğer çalışmalar ile zamansal olarak karşılaştırılması sonucunda özellikle kontrol grubunun literatürle uyumlu olduğu gözlemlendi (54,55).

Leptinin, kırık iyileşmesi üzerine olan olumlu etkisinin hangi mekanizma ile olduğu açıkça belli olmamakla beraber; endokondral kemikleşmedeki anjiogenezi düzenlemesi, osteoblast ve kondrosit farklanması ile çoğalmasını olumlu etkilemesi, kemik yapım-yıkım döngüsü üzerine olan etkileri nedeniyle bu sonuçta rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Kemik üzerine çeşitli etkileri olduğu ispatlanmış bir adipokin olan leptinin 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. Leptinin kırık iyileşmesindeki etki mekanizmasının açıklanmaya çalışılması için daha ileri düzeyde çalışmaların yapılması da gerekmektedir. Ayrıca osteoblastlarda leptin reseptörlerinin bulunmasından dolayı kırık iyileşmesinde kırık bölgesine lokalize leptin uygulamasının da ayrı bir çalışma konusu olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonucunda leptinin intraperitoneal uygulanması ile rat tibia kırık iyileşmesi üzerine doza bağımlı olarak olumlu etki yaptığı ve daha uygun doz aralığının belirlenmesi için etkin doz çalışmalarının yapılmasının gerektiği kanaatine varıldı.

6. SONUÇLAR

Kırık iyileşmesi üzerine intraperitoneal olarak uygulanan leptinin etkilerini araştırmak için yaptığımız deneysel çalışmamızın sonucunda;

1- Histolojik olarak 14. günde Kontrol Grubu ve 0,1 Leptin Grubu'nda fibröz ve kıkırdak doku oluşumu hemen hemen eşit miktarlarda gözlenirken, 0,3 Leptin Grubu'nda kıkırdak doku miktarının arttığı; ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı,

2- Histolojik olarak 21. günde 0,1 leptin grubunda kontrol grubuna göre kıkırdak ve kemik dokuda artış olduğu; 0,3 leptin grubunda ise kıkırdak ve kemik dokunun eşit miktarlara ulaştığı ve bu iyileşmenin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenirken; 0,3 leptin grubunda kemik oluşumu açısından 0,1 leptin grubuna göre artış olmakla beraber bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı,

3- Histolojik olarak, 35. günde kontrol grubunda ağırlıklı olarak kıkırdak doku izlenirken, 0,1 leptin grubunda eşit miktarlarda kıkırdak ve kemik doku, 0,3 leptin grubunda ise ağırlıklı olarak kemik doku izlendiği; bu değişikliklerin kontrol grubu ile 0,1 leptin ve 0,3 leptin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu,

4- Radyolojik olarak, leptinin kırık iyileşmesi üzerine kemik oluşumu, kaynama ve yeniden şekillenme açısından doza bağlı olarak 14. ,21. ve 35. günlerde olumlu etkilerinin olduğu ancak bu etkilerin 35. günde kontrol ve 0,3 leptin grubu arasında anlamlı olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; çalışmamızda kullandığımız cerrahi yöntemin kırık iyileşmesini takip etmede yeterli ve uygun olduğu; kırık iyileşmesinde leptinin olumlu etkilerinin doza bağımlı olarak arttığı ve bu olumlu etkilerinin doza bağlı değişkenlik göstermesinden dolayı uygun dozun belirlenmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

7. ÖZET

Leptin başlıca beyaz yağ dokusu tarafından salgılanan polipeptid yapılı bir hormondur. Vücutta metabolizma hızını, enerji tüketimini düzenlemesinin yanında fertilité, immün fonksiyon, anjiyogenez ve hatta kemik oluşumu üzerine etkilere sahip multifonksiyonel bir hormondur.

Bu çalışmada leptinin kırık iyileşmesi üzerine etkileri, rat tibialarında deneysel kırık modeli oluşturularak histolojik ve radyolojik olarak değerlendirilmiştir. Çalışma için, ortalama ağırlıkları 323 gr (295-352 gr) olan, 16 haftalık Sprague Dawley cinsi 54 adet rat kullanıldı. Rastgele seçilerek 3 gruba ayrılan ratların sağ tibialarında anestezi altında kırık oluşturuldu ve internal tespit yerleştirildi. 14 gün boyunca kontrol grubuna 0,5 ml serum fizyolojik, 0,1 leptin grubuna 0,1 µg/kg leptin ve 0,3 leptin grubuna 0,3 µg/kg leptin intraperitoneal olarak verildi. Bu gruplar da kendi aralarında 14., 21. ve 35. günlerde değerlendirilmek üzere 6'şar rattan oluşan 3'er gruba ayrıldı. Bu şekilde 9 grup oluşturuldu. Kontrol, 0,1 leptin ve 0,3 leptin gruplarına ait 6 rattan oluşan birer grup 14. , 21. ve 35. günlerde sakrifiye edilerek sağ tibiaları radyolojik ve histolojik olarak değerlendirildi ve gruplar arası karşılaştırmaları yapıldı.

Histolojik değerlendirmede leptinin gerek 21. gündeki gerekse 35. gündeki gruplarda kırık iyileşmesini hızlandırdığını tespit ettik. Radyolojik değerlendirmede ise özellikle 35. gündeki 0,3 leptin grubunun kontrol grubuna göre daha fazla iyileşme gösterdiğini gözlemledik.

Sonuç olarak histolojik ve radyolojik değerlendirmelerde intraperitoneal uygulanan leptinin, kırık iyileşmesini dozla ilişkili olarak artırdığı tespit edildi.

8. SUMMARY

Leptin is a polypeptide hormone, mainly secreted by white adipose tissue. It is a multifunctional hormone, regulating metabolic rate, energy expenditure and having effects on fertility, immune function, angiogenesis, and even bone formation.

In this experimental study, effects of leptin on fracture healing in rats' tibias were histologically and radiologically evaluated. Fifty-four Spraque Dawley rats, aged 16 weeks and a mean body weight of 323 g (range, 295 to 352 g), were used for this study. They were randomly and equally divided into three groups. Their right tibias were broken and intramedullary fixed histologically and radiologically under anesthesia.

0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ leptin were intraperitoneally administered for 0,1 leptin and 0,3 leptin groups respectively, for 14 days. 0.5 ml 0.9% normal saline was given to control group for the same period.

These groups were further divided into three groups, composed of 6 rats, to evaluate postoperatively at 14th, 21st, 35th days. Finally 9 groups were obtained. Six rats from each group (ie: control, 0,1 leptin and 0,3 leptin groups) were sacrificed at 14th day, another six rats from each group sacrificed at 21st day and the remaining six were sacrificed at 35th day after the operation. Then their right tibias were radiologically and histologically evaluated and the results of groups were compared.

We found leptin has positive effects on fracture healing both 21st and 35th days in histologic evaluation of groups. We also radiologically observed more healing in 0,3 leptin group than control group especially at 35th day.

As a result, we established intraperitoneal leptin administration has positive effects on fracture healing depending on doses, according to histological and radiological evaluations.

9. KAYNAKLAR

1. Bucholz RW, Heckman JD, Court-Brown C: Rockwood and Green's Fractures in Adults. Sixth ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2006, pp. 297-330.
2. Weinstein SL and Buckwalter JA: Turek Ortopedi İlkeler ve Uygulamaları (Çev. Alpaslan AM) Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009, s. 57-71.
3. Voet D, Voet GJ, Pratt CW: Fundamentals of Biochemistry Life At The Molecular Level. Lehigh Pres, USA, 2006, pp. 743-786.
4. Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H, Swick AG: Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. Regul Pept. 92: 73-78, 2000.
5. Kume K, Satomura K, Nishino S, Kitaoka E, Yamanouchi K, Tobiume S, Nagayama M: Potential role of Leptin in endochondral ossification. J. Histochem. Cytochem. 50: 159-169, 2002.
6. Gartner LP and Hiatt JL: Color Textbook of Histology. Second ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2001, pp. 134-154.
7. Junqueira LC and Carneiro J: Temel Histoloji (Çev. Aytakin Y ve Solakoğlu S) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006, s. 141-159.
8. Kierszenbaum AL: Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Çev. Demir R) Palme yayıncılık, Ankara, 2006, s. 118-145.
9. Moore KL and Persaud TVN: İnsan Embriyolojisi (Çev. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002, s. 405-424.
10. Kılıçoğlu SS: Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 55 (2):143-150, 2002.
11. Miller MD: Miller'ın Ortopedi Kitabı (Çev. Yetkin H ve Yazıcı M) Akademi Doktorlar Yayınevi, Ankara, 2006, s. 1-23.
12. Sarısözen B, Durak K, DinçerG, Bilgen OF: The Effects of Vitamins E and C on Fracture Healing in Rats. J İnt Med Res. 30: 309-313, 2002.
13. Fu L, Tang T, Miao Y, Hao Y, Dai K: Effect of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on fracture healing and bone remodeling in ovariectomized rat femora. Bone. 44: 893-898, 2009.

14. Ellegaard M, Jorgensen NR, Schwarz P: Parathyroid Hormone and Bone Healing. *Calcif Tissue Int*, DOI 10.1007/s00223-010-9360-5.
15. Costa ER, Weinhold P, Tayrose GA, Hooker JA, Dahners LE: The effect of levodopa-carbidopa (sinemet) on fracture healing. *J. Orthop Trauma*. 20(7): 470-475, 2006.
16. Claes L and Willie B: The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*. 93: 384-398, 2007.
17. Walker NA, Denegar CR, Preische J: Low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic field in the treatment of tibial fractures: A systematic review. *J Athl Train*. 42(4): 530-535, 2007.
18. Aaron RK, Ciombor DM, Jolly G: Stimulation of experimental endochondral ossification by low-energy pulsing electromagnetic fields. *J Bone Miner Res*. 4(2): 227-233, 1989.
19. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the Mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372: 425-431, 1994.
20. Kishida Y, Hirao M, Tamai N, Nampei A, Fujimoto T, Nakase T, Shimizu N, Yoshikawa H, Myoui A: Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification. *Bone*. 37: 607-621, 2005.
21. Guyton AC and Hall JE: *Tıbbi Fizyoloji (Çev. Çavuşoğlu H ve Yeğen BÇ) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2007, s. 905-917.*
22. Reidy SP, Weber JM: Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp Biochem Physiol*. 125: 285-297, 2000.
23. Rosenbaum M, Leibel RL: Leptin: A molecule integrating somatic energy stores, energy expenditure and fertility. *TEM*. 9 (3): 117-124, 1998.
24. Fantuzzi G, Faggioni R: Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol*. 68: 437-446, 2000.
25. Anagnostoulis S, Karayannakis AJ, Lambropoulou M, Efthimiadou A, Polychronidis A, Simopoulos C: Human leptin induces angiogenesis in vivo. *Cytokine*. 42: 353-357, 2008.
26. Bouloumie A, Drexler HCA, Lafontan M, Buse R: Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ. Res*. 83: 1059-1066, 1998.
27. Bertoni L, Ferretti M, Cavani F, Zavatti M, Resca E, Benelli A, Palumbo C: Leptin increases growth of primary ossification centers in fetal mice. *J Anat*. 215 (5): 577-583, 2009.
28. Lu H and Li C: Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res*. 10: 81-92, 2000.
29. Tartaglia LA: The leptin receptor. *J Biol Chem*. 272 (10): 6093-6096, 1997.

- 30.** Cohen MM: The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A.* 140: 2646-2706, 2006.
- 31.** Kawai M, Devlin MJ, Rosen CJ: Fat targets for skeletal health. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5: 365-372, 2009.
- 32.** Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL: Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology.* 140: 1630-1638, 1999.
- 33.** Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G: Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 100: 197-207, 2000.
- 34.** Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, Grey AB, Brom N, Myers DE, Nicholson GC, Reid IR: Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol.* 175: 405-415, 2002.
- 35.** Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S: Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med.* 22: 97-102, 1998.
- 36.** Bancroft JD and Cook HC: *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application.* Churchill Livingstone Medical Division of Langman Group UK Limited, London, England, 1994, pp. 373-413.
- 37.** Bancroft JD, Stevens A, Turner DR: *Theory and Practice of Histological Techniques.* Churchill Livingstone Medical Division of Pearson Profesional Limited, New York, USA, 1996, pp. 309-339.
- 38.** Demir R: *Histolojik Boyama Teknikleri.* Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye, 2001, s. 1-49.
- 39.** Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE: The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res.* 9: 383-390, 1991.
- 40.** Lane JM, Sandhu HS: Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.* 18: 213-225, 1987.
- 41.** Lieben L, Callewaert F, Bouillon R: Bone and metabolism: A complex crosstalk. *Horm Res.* 71: 134-138, 2009.
- 42.** Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G: The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell.* 122: 803-815, 2005.

- 43.** Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 111: 305-317, 2002.
- 44.** Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner Q, Gordeladze JO, Drevon CA: Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res*. 16: 1426-1433, 2001.
- 45.** Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG: Bone remodeling during fracture repair: The cellular Picture. *Semin Cell Dev Biol*. 19: 459-466, 2008.
- 46.** Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA: Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 88: 873-884, 2003.
- 47.** Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Rel Res*. 355S: 7-21, 1998.
- 48.** Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA: Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*. 14: 1805-1815, 1999.
- 49.** Komatsu DE, Warden SJ: The control of fracture healing and its therapeutic targeting: Improving upon nature. *J Cell Biochem*. 109: 302-311, 2010.
- 50.** Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S Riggs BL, Turner RT: Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology*. 142: 3546-3553, 2001.
- 51.** Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schütze N, Jakob F, Schell H: Differential regulation of blood vessel formation between Standard and delayed bone healing. *J Orthop Res*. 27: 1133-1140, 2009.
- 52.** Glowacki J: Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Rel Res*. 355S: 82-89, 1998.
- 53.** Liapakis I, Anagnostoulis S, Karayiannakis A, Korkolis D, Lambropoulou M, Matarasso A, Simopoulos C: Burn wound angiogenesis is increased by exogenously administered recombinant leptin in rats. *Acta Cir Bras*. 23: 118-124, 2008.
- 54.** Cebesoy O, Tutar E, Kose KC, Baltaci Y, Bagci C: Effect of strontium ranelate on fracture healing in rat tibia. *Joint Bone Spine*. 74: 590-593, 2007.
- 55.** Kerimoğlu S, Livaoğlu M, Sönmez B, Yuluğ E, Aynaci O, Topbas M, Yazar S: Effects of human amniotic fluid on fracture healing in rat tibia. *J Surg Res*. 152: 281-287, 2009.