

**T.C.**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRIK İYİLEŞMESİNE NİTRİK OKSİTİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. ÇAĞATAY HAN MALKOÇ**

**TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. CELÂL BAKİ**

**TRABZON-2000**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. MATERYAL VE METOT.....	14
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇLAR .....	46
7. ÖZET.....	47
8. İNGİLİZCE ÖZET.....	48
9. KAYNAKLAR.....	49

## GİRİŞ

Tüm canlı organizmaların büyümesi ve gelişmesi, kendilerini oluşturan hücrelerin büyüme, çoğalma ve farklılaşması ile sağlanır. İskeletin oluşumu, büyümesi, devamlılığı ve iyileşmesi ömür boyunca kemik oluşumuna bağlıdır (1).

Kemiğin yapım ve yıkımı için yönlendirilmiş hücresel fonksiyonlar, sistemik hormonlar ve "lokal faktörler" tarafından düzenlenir. **Lokal faktörler**, iskelet hücreleri tarafından sentezlenirler ve büyüme faktörlerini, prostoglandinleri ve sitokinleri içerirler (2).

Kemiğin yapısını, içeriğini ve organizasyonunu anlamak; kas-iskelet sistemindeki hasarları, hastalık ve deformiteleri optimum tedavi imkanı sağlar. Kemik hücre aktivitesinin düzenlenmesi ve kemik hücrelerinin tanınmasındaki son yıllardaki ilerlemeler; kırıklar, gecikmiş kaynamalar, kaynamamalar ve iskelet deformitelerinin tedavisinde önemli değişikliklere yol açmıştır (1).

Kırık iyileşmesi, kemiğin oluşumu, iskeletin gelişimi, büyümesi ve devamlılığını sağlayan mekanizmanın aynısı ile gelişir (1).

1987 yılında fizyolojik bir mediyatör olarak keşfedilen ve serbest bir radikal olan Nitrik Oksit (NO)' in, kemik metabolizmasında bir dengeleyici molekül olarak rol oynadığı düşünülmektedir (3). Birçok araştırmacı NO' in kemik metabolizmasının otokrin-parakrin düzenleyicisi olarak hareket edebileceği görüşündedir (3-6).

Son yıllarda klasik tanı yöntemleri yanında Akım Sitometri (AS) yöntemi de prelinik ve klinik tıp bilimlerinde önemli bir ileri tanı yöntemi olarak yerini almaya başlamıştır. AS, temel olarak hücrelerin büyüklüğüne, yoğunluğuna ve granülaritesine bağlı olarak tek hücre düzeyinde araştırma imkanı sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemle

hücrelerin biyolojik ve fiziksel özelliklerinin kantitatif ölçümü objektif ve doğru olarak yapılabilmektedir (7).

Ratlar üzerinde yapılan deneysel çalışmamızda ; NO sentezini uyaran L-arginin aminoasidinin kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri, L-arginin verilen ve verilmeyen grupların karşılaştırılması yapılarak ortaya konulmaya çalışıldı. NO'in, kırık iyileşmesindeki yeri ve öneminin ortaya konması amacıyla biyokimyasal ve patolojik çalışmanın yanında kantitatif bir metod olan AS ile kırık iyileşmesindeki hücresel farklılaşmayı da tespit etmeyi amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

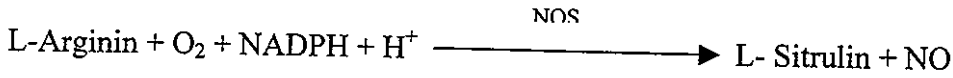
### NİTRİK OKSİT

Nitrik Oksit (NO) , serbest radikal bir molekül olup, bir oksijen ve bir azot atomunun oluşturduğu doğadaki en küçük 10 molekülden biridir. Birçok serbest radikale göre daha az reaktiftir. Biyolojik sistemlerde yarılanma ömrü 30 saniyeden daha kısadır. Yüksüz olduğundan dolayı hücre içinde ve hücre membranları arasında hızlı, serbest olarak diffüze olabilir. Bundan dolayı birçok sistemde haberci olarak etki gösterebilir. NO, aynı zamanda , sitotoksik bir mediyatör olarakta etkisini gösterebilir(8).

#### Nitrik Oksit Sentezi

Endotel-derived relaxing factor (EDRF) olarak NO'in tanımlanmasından beri makrofajlar, endoteliyal hücreler, lenfositler, nötrofiller, hepatositler, fibroblastlar, nöronlar, düz kas hücreleri, kondrositler gibi çeşitli hücre tiplerinde, L-arginin aminoasidinden NO üretimi gösterilmiştir (3,9,10).

NO, L-argininden Nitrik Oksit Sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile sentezlenir:



Oluşan NO, aerobik şartlar altında hızlı bir şekilde nitrat (NO<sub>3</sub>) ve nitrit (NO<sub>2</sub>)'e dönüşür. NO'nun yarı ömrü in-vivo olarak çok kısadır. Direkt ölçümü zordur (11).

Nükleotidlerindeki aminoasit sıralamasına göre 3 tip NOS izoformu tariflenmiştir : Nöronal (nNOS), endoteliyal (ecNOS) ve indüklenebilen (iNOS) form (2,12).

NOS enzimlerinin fonksiyonlarının benzer olmasına rağmen doku dağılımları ve katalitik aktiviteleri farklıdır (8). ecNOS ve nNOS birlikte yapısal NOS (cNOS) enzimi olarak adlandırılır (13). ecNOS ve nNOS enzimleri sadece vasküler ve nöral dokularda değil, adale, dalak, timus, osteoblast ve osteoklast gibi hücre derivelerinde de bulunurlar (6).

Kemik hücre kültürü ve immunohistokimyasal çalışmalar; kemik iliğinde, stromal hücrelerde, osteoblastlarda, osteositlerde ve osteoklastlarda yaygın ecNOS dağılımını göstermiştir (14,15). Endotelial NOS (ecNOS) m.RNA, tüm kemikte Reverse Transcribed Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) incelenmesiyle de belirlenmiştir (6).

Nöronal NOS (nNOS) m.RNA, kemik ve kemik iliği kültürlerinde RT-PCR ile tespit edilebilirken, immunohistokimyasal tekniklerle kemik ve kemik hücre kültürlerinde tespit edilememiştir (6).

Kültüre edilmiş kemik hücrelerinde RT-PCR ile iNOS m.RNA'nın düşük seviyelerinin belirlenmesine rağmen, normal kemikte immunohistokimyasal teknikler kullanılarak iNOS proteini belirlenememiştir (6).

### **Nitrik Oksit ve Kemik Metabolizması**

NO, osteoblast ve osteoklastlarda biyolojik bir etkiye sahiptir. Yeni çalışmalar NO'nin kemik metabolizmasının dengelenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (2,3). Hem osteoklast hem de osteoblastlar NOS'ı indükler ve NO oluştururlar. Kemik hücreleri, sitokinlere (16,17), östrojen (18) ve mekanik yüklenmeye (19) cevap olarak NO üretirler. Kemik mikroçevresindeki bu NO üretimi, normal kemik fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar (20).

Birçok kemik hücresinde sitokin ve/veya endotoksinle stimülasyona cevap olarak iNOS üretimi uyarılabilir (16,17). iNOS , interlökin-1 (IL-1), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) , interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) , lipopolisakkaritler (LPS) ve çeşitli hücre tiplerindeki endotoksinler tarafından aktive edilir. Oysa glukokortikoidler, antienflamatuvar sitokinler, IL-4, IL-10 ve transforme edici büyüme faktörleri (TGF) ise inhibitördür (5,21,22).

Değişik hücre tipleri, sitokin stimülasyonundan sonra NO üretimi için değişik yetenektedir. İnsan primer osteoblast kültürleri NO' in belirgin oluşumu için 2 veya 3 sitokin kombinasyonu gerektirir. Oysa insan kondrositlerinde IL-1 ve TNF gibi tekil sitokinlerle NO üretimi olabilir (15). Rodent hücreleri, insan hücrelerine göre sitokinlere daha çok cevap verirler (22).

Osteoklastların iNOS üretimindeki yeteneği tam olarak açık değildir. Sitokin uyarımlı NO' in yüksek seviyelerinin osteoklastlar üzerine potent inhibitör etkisi vardır (5,16,23). NO'in , osteoklast oluşumunu ve aktivitesini inhibe etmesi ile ilgili moleküler mekanizma tam olarak bilinmemektedir (2). Kemik rezorpsiyonunda NO'in inhibitör etkisini izah etmeye yardımcı iki mekanizma olabilir :

- 1) Öncül hücrelerden osteoklast oluşumunda potent inhibitör etki.
- 2) Olgun osteoklastlarda rezorptif aktivitede direkt inhibitör etki (23).

Yüksek NO konsantrasyonu, kemik rezorpsiyonunu inhibe ederken, düşük konsantrasyonu osteoklast fonksiyonu için gereklidir. Kemik rezorpsiyonunun sitokinler tarafından uyarıldığı kesindir. IL-1 ve TNF, kemik rezorpsiyonu için potent stimülatördür (24). Bu sitokinler, kemik ve kemik iliği hücre kültürlerinde NO üretiminde artmaya yol açarlar . Bu uyarı, NOS inhibitörlerince inhibe edilebilir (16).

Kemik oluşumu ve osteoblast fonksiyonunda NO'in etkileri, kemik rezorpsiyonundaki kadar açık değildir. Her ne kadar osteoblast proliferasyonu veya genel olarak osteoblastta NO'in direkt etkisi gösterilemese de birçok otör, osteoblast proliferasyonu ve metabolizmasında NO'in rolü olduğu görüşündedirler (3). NO'in basal üretiminin osteoblast gelişiminde ve sitokin üretiminde otokrin stimülatör etki gösterdiği bilinmektedir (25). Normal kültür şartları altında osteoblast gelişiminde NOS inhibitörlerinin etkisi yoktur. Oluşmuş NO üretiminin, normal osteoblast fonksiyonunu ne ölçüde etkilediği açık değildir (2). Ancak, pro-enflamatuvar sitokinlerin kombinasyonları veya NO donörlerince farmakolojik olarak üretilen yüksek miktardaki NO konsantrasyonu, osteoblast gelişimi ve farklılaşmasında potent inhibitör etkiye sahiptir (22). NO'in osteoblast proliferasyonunda doza bağlı inhibitör etkisi vardır (3).

## KIRIK İYİLEŞMESİ

Bir kırığın tamiri, farklılaşmamış osteokondral progenitör hücrelerin olgun osteoblastlara ve kondrositlere dönüşümüne ihtiyaç duyan osseoz dokunun sentezini gerektirir(26). Kırık bir kemiğin iyileşmesi, tüm kemiğin kendi kendine onarımına öncülük eden kompleks biyolojik bir olaydır. Diğer dokuların çoğunda fibroblastlar aracılığı ile skar benzeri bir tamir gerçekleşir. Böyle bir iyileşme süreci kemik tamirinde tamamen yetersiz olacaktır.

Progenitör hücrelerin mobilizasyon, proliferasyon ve farklılaşmasındaki herhangi bir yetersizlik yeni kemiğin formasyonunda yetersizliğe ve sonuç olarak kaynamamaya yol açacaktır (27). Bu progenitör hücrelerin, ve onların proliferasyon ve farklılaşmasını etkileyen sitokinlerin karakterize edilmesi, kırık tamir mekanizmasını anlamak ve kaynamama gibi klinik problemlere yeni tedaviler geliştirmek için çok gereklidir (28).

Klinik olarak başarılı bir kırık tamiri, kemiğin hasarlı uçları arasındaki boşluğu dolduran ve kemiğe uygulanan yüke dayanmak için gerekli kuvvete sahip yeni kemik matriksinin formasyonunu gerektirir. Bu süreç, zedelenmenin lokal ve sistemik etkilerine cevap veren osteokondral progenitör hücrelerin mobilizasyon, replikasyon ve farklılaşmasına ihtiyaç duyar (26).

Tamir süreci için hücrel cevabın önemi iyi bir şekilde gösterilmiştir. Fakat progenitör hücrelerin kaynakları hala tartışmalıdır. Periostun en iç kambiyum tabakasının ve kemik iliğinin progenitör hücreler içerdiğini ve her iki dokunun da kırık tamirinde rol oynadığını destekleyen deliller mevcuttur. Kemik iliği üzerindeki çalışmalardan elde edilen deliller, bu progenitör hücrelerde yaşla ilişkili bir azalmanın varlığını göstermiştir (29). Sonuç olarak kemik iliği ve periost, ortotopik ve heterotopik bölgelerde kemik formasyonunu uyarma kapasitesine sahiptir (30-32).

### Kırık İyileşmesinin Düzenlenmesi

Kırık iyileşmesi, osteoblast ve osteoklast serilerinin hücrelerini etkileyen ve onların; farklılaşmış hücrelerin replikasyonu, hücrelerin bütünleştirilmesi ve farklılaşmış hücrelerin fonksiyonları üzerindeki etkilerini oluşturan sistemik hormonlar ve lokal



faktörler tarafından düzenlenir (33). Bu sistemik hormonlar ve lokal faktörler Tablo-1'de gösterilmiştir.

**Tablo-1:** Kırık iyileşmesi ve kemik remodelinginin hormonal ve lokal düzenleyicileri

### 1.Sistemik Hormonlar

#### A)Polipeptid Hormonlar

- Paratiroid hormon
- Kalsitonin
- İnsulin
- Büyüme hormonu

#### B)Steroid Hormonlar

- 1,25-Dihidroksivitamin D<sub>3</sub>
- Glukokortikoidler
- Seks steroidleri
- Troid hormonları

### 2.Lokal Faktörler

#### A)Klasik polipeptid büyüme faktörleri

- İnsülin benzeri büyüme faktörleri
- Transforme edici büyüme faktörleri-β ailesi
- Fibroblast büyüme faktörleri
- Trombosit kökenli büyüme faktörü

#### B)İmmun ve hematolojik sistemlerden kaynaklanan sitokinler

- İnterlökinler
- Tümör nekroze edici faktör
- Koloni stimule edici faktörler

#### C)Prostoglandinler ve diğer faktörler

Konumuz itibariyle,burada sistemik hormonlar hakkında ayrıntılı bilgi verilmeyip, lokal faktörlere değinilmiştir.

**Lokal faktörler**, iskelet hücreleri tarafından sentezlenirler ve büyüme faktörlerini, sitokinleri ve prostoglandinleri içerirler. Lokal faktörlerin varlığı iskelet sistemine özgü değildir. Çünkü iskelet dışı dokularda da sentezlenirler ve otokrin büyüme faktörlerine cevap verirler. Lokal olarak üretilmiş bu faktörler hücre büyümesinde direkt ve muhtemelen önemli bir fonksiyona sahiptir (2).

### **Klasik Polipeptid Büyüme Faktörleri**

#### **İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF)**

Büyüme hormonu bağımlı polipeptidlerdir. IGF-1 ve IGF-2 olarak iki tiptir. Bu peptidler, kemik içeren birçok doku tarafından sentezlenirler ve benzer biyolojik

özelliklere sahiptirler (2). IGF-1, IGF-2'den 4-7 kez daha potanttir (34). Bazı şartlarda sistemik olarak etki gösterebilirler. Ancak lokal olarak doku büyümesi üzerine direkt ve muhtemelen daha önemli bir etkiye sahiptirler (2). IGF-1; kemik kollajen ve matriks sentezini artırır ve osteoblast serisi hücrelerinin replikasyonunu uyarır. Ayrıca kemik kollajen degradasyonunu da azaltır .

IGF-1'in sentezi ve kemik hücre reseptörlerine bağlanması hormonlar ve lokal faktörler tarafından düzenlenir. Kemik hücrelerinde cAMP'ı uyaran diğer ajanlar gibi Parathormon (PTH), IGF-1 sentezinin majör uyarıcısıdır (35). Glukokortikoidler ise IGF-1 sentezini inhibe ederler. Prostaglandin E<sub>2</sub> gibi lokal faktörler, IGF-1 sentezini, IGF-1 ve IGF-2'nin kemik hücrelerine bağlanmasını arttırlar (2).

### **Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\beta$ Ailesi (TGF- $\beta$ )**

TGF- $\beta$ , kemik içeren bir çok doku tarafından sentezlenir. Benzer biyolojik aktivitelere sahip üç formu da (TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, TGF- $\beta$ <sub>2</sub>, TGF- $\beta$ <sub>3</sub>) kemik dokuda mevcuttur. TGF- $\beta$ , osteoblast serisinin prekürsör hücrelerinin replikasyonunu uyarır. Ayrıca kemik kollajen sentezi üzerinde de direkt bir uyarıcı etkiye sahiptir ve kemik rezorpsiyonunu azaltır (36).

TGF- $\beta$  ile aminoasit dizilimini paylaşan kemik morfojenetik proteinleri de normal enkondral kemik formasyonunun şekillenmesini uyarırlar (37).

### **Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF)**

Asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörleri veya heparin bağlayan büyüme faktörü 1 ve 2 olarak ta bilinirler (FGF-1, FGF-2). FGF'ler, revaskülarizasyon ve yara iyileşmesinde önemli olduğu düşünülen anjiogenik faktörlerdir. Her iki faktör de kemik kollajen sentezleme kapasitesine sahip hücrelerin replikasyonunu uyarır (38).

### **Trombosit Kökenli Büyüme Faktörleri (PDGF)**

PDGF'leri başlangıçta kan trombositlerinden izole edilmiştir. Fibroblast gibi mezenkimal hücreler için major büyüme elemanıdır. PDGF, kemik rezorpsiyonunu ve kemik hücre replikasyonunu uyarır. Ancak direkt olarak kemik kollajen sentezini uyarmaz (39).

## İmmun ve Hematolojik Sistemlerden Kaynaklanan Sitokinler

İmmun ve hematolojik sistem üzerinde önemli etkileri olan sitokinlerin bir kısmı, iskelet hücreleri üzerine de etkilidir. Bu sitokinlerin, ilik hücrelerinden köken aldıkları, kemik mikroçevrede buldukları veya kemik hücreleri tarafından sentezlendikleri için kemik hücreleri üzerinde direkt etkili olduklarına inanılmaktadır (2).

Sitokinler; interlökinler (IL), tümör nekrozis faktör (TNF) , FGF, PDGF, IGF ve TGF- $\beta$  gibi işaret moleküllerini içerirler(2).

**IL-1'** in iki formu vardır: IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ . IL-1 , kemik remodelingi üzerinde kompleks etkilere sahiptir. Kemik rezorpsiyonunu ve kemik hücre replikasyonunu uyarır. IL-1 ve TNF- $\alpha$  , osteoblast ve kemik iliği stromal hücrelerinde IL-3, IL-6 ve IL-11 gibi sitokinlerin sentez ve salınmasında etkilidir. Bu sitokinler, osteoklast öncül hücrelerinin farklılaşmasını ve proliferasyonunu artırır (2).

**IL-6'**nın sentezinin östrojenler tarafından azaltılması, östrojen tedavisi sonrası gözlenen kemik rezorpsiyonundaki azalmayı açıklamaktadır (2).

**IL-4'** ün, osteoblast öncül hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonunu etkilediği bilinmektedir. IL-4, osteoblastik aktiviteyi artırdığı gibi , direkt etkiyle osteoklast aktivitesini de inhibe eder (2).

**TNF** veya kaşektin, sitostatik, sitolitik ve antiviral etkileri bilinen bir sitokindir. Tümör hücreleri üzerindeki büyümeyi inhibe edici özelliklerinin aksine, transforme olmamış hücrelerinin replikasyonunu uyarır. TNF etkisi altında replike olan hücreler, farklılaşırlar ve kemik kollajeni sentezlerler (40).

**İnterferon-gamma (IFN- $\gamma$ )**, osteoklast öncül hücrelerinin olgunlaşmasını azaltabilir. Bu sebeple, tek veya IL-4 ile birlikte osteonekrozisin tedavisinde denenmektedir (2,41).

PTH tarafından uyarılan **granülosit/makrofaj koloni** stimule edici faktörler, osteoklastların olgunlaşmasında rol oynarlar (2).

Özet olarak, kırık iyileşmesi ve kemik remodelingi sistemik hormonlar ve **lokal faktörler** tarafından düzenlenen kompleks bir işlemdir. Hormonlar ; sentezi ve

aktivasyonu etkilerler ve ayrıca hücrel metabolizma üzerinde direkt bir etkiye sahip olan lokal faktörlerin proteinlere bağlanmasını düzenlerler (2).

## HÜCRE SIKLUSU

Hücre siklusu bir hücrenin mitoz hazırlanması (interfaz) ve mitoz bölünmeyi ihtiva eden iki interfaz arasındaki devredir. Memelilerin somatik hücrelerinde hücre siklusunun beş dönemi vardır. Bunlar  $G_0$  (Postmitotik istirahat fazı  $G=$ gap),  $G_1$  (Proliferasyon fazı), S (Sentez fazı),  $G_2$  (Premitotik) faz ve M (Mitoz fazı) dönemleridir.  $G_1$ , S ve  $G_2$  fazları interfazı (İF) oluşturur ve interfaz hücre siklusunun %90'ından fazlasını ihtiva eder (42).

### **$G_0$ Fazı (Postmitotik İstirahat Fazı)**

Hücre siklusunun bölünmeyen istirahat halinde olan ve DNA sentezinin bulunmadığı dönemdir. Hücrenin DNA içeriği sabittir. Kromozomlar diploiddir.  $G_0$  fazında; aktivitesi geçici veya sürekli durdurulan hücreler, bir anlamda siklustan çekilir, metabolizmalarını değiştirir veya büyümelerini durdururlar. Bu hücreler fonksiyonlarını tamamladıktan sonra ölür veya bir stimülasyonla bölünme uyarısı alırlarsa siklusa girerler (42).

### **$G_1$ Fazı (Proliferasyon Fazı)**

DNA sentezinin hemen önündeki evredir. Hücreler için  $G_1$  fazı proliferasyona geçişte spesifik yollar kapsar ve hücreler DNA sentezine hazırlanır. İnsan vücudundaki farklılaşmamış hücrelerin %95'inden daha fazlası bu fazdadır. Hücre bölünme yönünde çevreden aldığı uyarı ile mRNA sentezini başlatır. Bu hücrelerin DNA içerikleri 2N olarak ifade edilen diploid özelliktedir. Bu fazın sonunda DNA sentezi başlar (42).

### **S Fazı (Sentez Fazı)**

Aktif DNA sentez ve replikasyonunun gerçekleştiği bu dönemde hücrelerin DNA içeriği 2N-4N arası artış gösterir. Yaklaşık 7-8 saat sürer. S fazı hücrenin DNA'sı replike olana kadar devam eder. DNA içeriği 4N olması ile S fazı sonlanır bunu kısa bir  $G_2$  fazı izler (42).

## G<sub>2</sub> Fazı (Premitotik Faz)

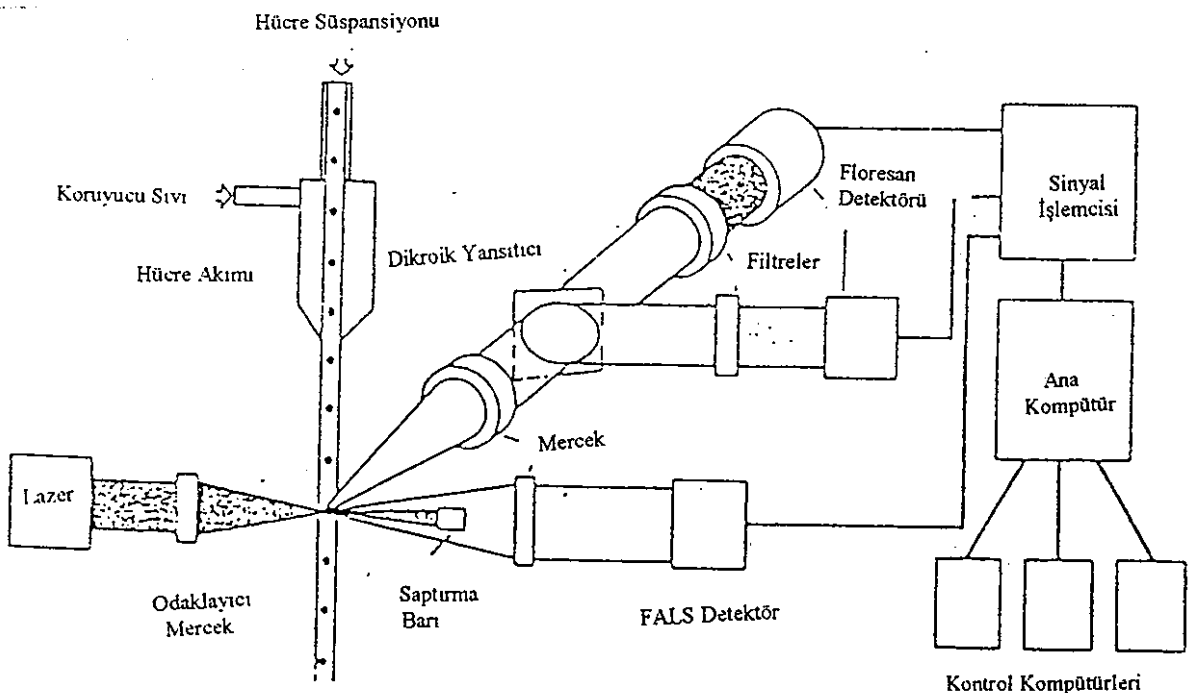
Sentez ve mitoz fazları arasında gerçekleşen bu kısa dönemde hücrenin DNA içeriği tetraploiddir (4N). Ortalama dört saat kadar sürer. Protein ve RNA sentezi bu fazda da devam eder (42).

## M Fazı (Mitoz Fazı)

Ökaryotik hücreler mitozda kromozomlarını ikiye ayırırlar. Bu dönemde önce nükleer bölünme ve bunu takiben sitokinezis meydana gelir. Mitoz bölünme tamamlandıktan sonra hücreler hücre siklusundan çıkarak G<sub>0</sub> veya G<sub>1</sub> fazından birine geri dönerler. Genellikle Profaz, Metafaz, Anafaz ve Telofaz bölümleriyle incelenen mitoz, memeli hücrelerinde 30 dakika ile 2,5 saat kadar sürmesine karşın ortalama bir saat olarak kabul edilir (42).

## AKIM SİTOMETRİ

Akım sitometri; tek tek hücrelerin veya diğer biyolojik partiküllerin, cihaz içine bir sıvı içerisinde tek sıra halinde alınarak fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değerlendirildiği bir yöntemdir. Bu düzenek, bir çok farklı sistemin birleşimi ile ortaya çıkan oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir (42-44) (Şekil 1).



Şekil-1: Akım sitometri düzeneginin şematik görünümü

Akım sitometri çalışmasının ilk aşamasında özel yöntemlerle taze veya parafine gömülü dokulardan hazırlanan ve nükleik asitlere bağlanan, bağlandıkları yerde floresan veren florokrom boya ile işaretlenen örneklerin akım sistemi içinden geçirilerek akım odasına ulaşmaları sağlanır. Bu geçiş esnasında hücreler tek sıra halinde olup, lazer ışığı altında uyarılarak görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak genellikle Argon iyonu kullanılır. Alternatif olarak Crypton, Helium, Cadmium gibi yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları da uygulanabilir. Bu şekilde, hücreye bağlı florokromun lazer ışınlarıyla aktifleşmesi, ışığın yoğunluğuna bağlı olarak hücrenin boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrenin canlılığı hakkında bilgi edinme imkânı doğurur. Boyanın floresan emisyonu hassas fotodiodlarda toplanır ve "photomultiply tubes" denilen özel sistemle elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve bilgisayar sistemine aktarılır. Böylece birkaç dakikalık süre içinde 10.000-1.000.000 hücrenin her birinin özellikleri teker teker belirlenebilir (42,43).

Akım sitometri son yıllarda, hematopatoloji, immunopatoloji ve sitopatolojide temel olarak; kantitatif tek hücre düzeyinde hızlı ve çok parametrelili analiz, hücrelerin fonksiyonel, morfolojik veya sitogenetik yapılarının tanımlanması, hücre subgruplarının ayırımı işlemi ve yapısal farklılaşmalarının belirlenmesi amacıyla ileri bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır (44).

Akım sitometri ile prognostik olarak hücre süspansiyonlarında hücrelerin DNA içeriği ve proliferatif aktivitelerinin tayini mümkün olabilmektedir. DNA'ya spesifik olan boyaların kullanılmasıyla yapılan DNA analizi sonucu, uzun ve pahalı olan konvansiyonel yöntemlerle gözden kaçabilen aneuploidik küçük hücre grupları bile saptanabilir. DNA analizi ile  $G_0$  ve  $G_1$  fazında bulunan hücrelerin ortalama DNA içeriği ve hücre siklusunda her fazda bulunan hücreler ile birbirlerine oranı tespit edilebilir. Pratikte DNA analizi yapılırken normal ve anormal hücrelerin mitotik aktiviteleri ve proliferasyon kapasiteleri hakkında da eş zamanlı olarak doğru ve güvenilir bilgiler elde etmek mümkündür (43).

Normal bir DNA histogramında  $G_0/G_1$  fazında bulunan hücreler, daima en yüksek fraksiyona ve diploid DNA ( $2N$ ) içeriğine sahiptirler. DNA içeriği kromozomların sayısı ve büyüklüğü ile ilgili olup her canlı için sabittir. Hücreler  $G_2$  ve M fazına ulaştıklarında DNA içeriği tam iki katına çıkar ( $4N$ ) ve  $G_2/M$  fazındaki hücreler  $G_0/G_1$  pikinden daha uzakta ve histogramın sağında yer alırlar. Siklusun S fazındaki hücreler ise  $2N$ 'den fazla

4N'den daha az sayıda DNA içeriğine sahip hücreler olup DNA histogramında söz konusu iki hücre grubu arasında izlenirler (43).

Histogramlarda DNA içeriğinin yayılımı hücre popülasyonunu yansıtan pik çevresinde bir miktar değişiklik gösterir. Bu değişiklik; boyama yöntemine, cihaza ait hatalara veya boya DNA'ya bağlanırken hücreler arasında ortaya çıkan farklılıklar gibi nedenlere bağlı olabilir ve "Coefficient of Variation" (CV) olarak ifade edilir. CV hücre popülasyonunun ortalama pik kanal numarasının standart sapmaya bölünmesiyle belirlenir. Yani CV değeri analizin kalitesini gösterir ve bu değer ne kadar düşükse çalışmanın o kadar güvenilir olduğunu gösterir (43).

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı ve Hematoloji Laboratuvarında, Ağustos 1999 – Mayıs 2000 tarihleri arasında yapıldı.

Çalışmada, denek olarak ortalama ağırlıkları 170gr.(150-200gr.) olan 8 haftalık 152 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar 14-10 saatlik ışık-karanlık siklusunda 20-24 C° de tek tek kafeslendi. Ratlar, Kagsan tarafından üretilen, % 1 kalsiyum, % 0.6 fosfor % 17 ham protein, 4000 I.U./ Kg A vitamini, 1000 I.U./ Kg. D vitamini içeren buzağı yemi ile beslenip, su ihtiyacı için 51 mg/lt. kalsiyum, 9 mg/lt. magnezyum, 3.4 mg/lt. nitrat içeren Hayat (Danone) suyu kullanıldı.

### Anestezi ve Kırık Oluşturulması

Ratlara anestezi için intraperitoneal yolla 30 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar-Parke Davis) verildi. Anestezi sağlandıktan sonra dijital kompresyon yöntemiyle sağ tibia cisim seviyesinde kapalı kırık oluşturuldu. İşlemden sonra hayvanlar normal beslenme ve yaşama şartlarında kafeslerine bırakıldı.

### Cerrahi Gruplar

Ratlar, beslenmelerini takiben bir hafta sonra rastgele 3 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol Grubu) : 8 rat, kırık oluşturulmadan akım sitometrik ve biyokimyasal inceleme için ayrıldı.

Grup II : Herbir alt grupta 9 rat olacak şekilde 8 gruba ayrıldı. Ketamin anestezisi altında dijital kompresyon yöntemiyle sağ tibia cisimlerinde kapalı kırık oluşturularak, Grup-IIa birinci gün, Grup-IIb üçüncü gün, Grup-IIc beşinci gün, Grup-IId yedinci gün, Grup-IIe onuncu gün, Grup-IIf ondördüncü gün, Grup-IIg yirmibirinci gün ve Grup-IIh yirmisekizinci gün olmak üzere; akım sitometrik, biyokimyasal ve patolojik inceleme için gruplandırıldı.



Grup III: Herbir alt grupta 9 rat olacak şekilde 8 gruba ayrıldı. İçme sularına kırık oluşturulmadan 2 hafta önce 2gr./dl. olacak şekilde L-arginin ( L-arginine hydrochloride, A-5131-SIGMA) konuldu. Suları hergün değiştirildi. Ketamin anestezisi altında dijital kompresyon yöntemiyle sağ tibia cisimlerinde kapalı kırık oluşturularak Grup-IIIa birinci gün, Grup-IIIb üçüncü gün, Grup-IIIc beşinci gün, Grup-IIId yedinci gün, Grup-IIIE onuncu gün, Grup-IIIf ondördüncü gün, Grup-IIIG yirmibirinci gün ve Grup-IIIH yirmisekizinci gün olmak üzere; akım sitometrik, biyokimyasal ve patolojik inceleme için gruplandırıldı. Kırık oluşturulduktan sonra da ratlar sakrifiye edilinceye kadar L-arginin içeren içme suyu almaya devam ettiler.

Her alt gruptan bir hayvan patolojik inceleme ve sekiz hayvan akım sitometrik DNA analizi ve biyokimyasal analiz için ayrıldı.

### **Biyokimyasal Analiz**

Ratlar, intraperitoneal yolla 30mg./kg.ketamin verilerek anestezileri sağlandıktan sonra, supin pozisyonunda tespit edildi. Orta hat insizyonuyla laparotomi yapılan hayvanların aortu ortaya kondu. Aortun bifurkasyosundan 21 G 5 ml.' lik enjektörle 4 ml. kan alındı. Alınan kanın 2 ml.' si kalsiyum-edta'lı tüplere, 2 ml.'si de normal cam tüplere konuldu. Tüpler yarım saat oda ısısında bekletildikten sonra santrifüj cihazında (NF 1215-NÜVE) 3000 devir/dk. (rpm) olacak şekilde 10 dakika santrifüj edildi. Ayrılan plazma ve serum, otomatik pipetlerle alınarak, 2 ml.'lik ependof tüplere konuldu. Tüpler, analizler yapılanaya kadar -85 C<sup>0</sup> de (Ultralow Freezer -NUAIRE) saklandı.

Grup I, Grup II ve Grup III'ün, otoanalizör ile (Hitachi-747) kalsiyum (Ca), fosfor (P) ve Alkale Fosfataz (AP) değerleri ölçüldü.

### **Nitrit ve Nitrat Tayin Yöntemi**

Kandaki nitrit, nitritin Griess reaktifi ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin optik dansitesi ölçülerek belirlendi.

Nitrat tayininde ise nitrat, önce nitrat redüktaz (E.C.1.6.6.2.) enzimi aracılığı ile nitrite dönüştürüldü ve nitrit tayini basamakları aynen uygulandı. Böylece numunelerdeki toplam nitrit + nitrat miktarı bulunmuş oldu. Bu değerden nitrit konsantrasyonu çıkarılarak nitrat miktarı tespit edildi.

### Kullanılan Çözeltiler :

#### 1. Griess reaktifi

Sülfanil amid 200mgr. (son konsantrasyonu % 0.01)

Fosforik asid 0.5 ml. (son konsantrasyon %2.5 )

N-Naftil-Etilen-Diamin 20mgr. (son konsantrasyon %0.01)

Yukarıdaki miktarlarda alınan maddeler, 20ml. deiyonize suda çözüldü. Griess reaktifi kullanmadan hemen önce hazırlandı, iyice karıştırıldı ve ışıktan korundu.

2. Deproteinizasyon çözeltisi (300gr./lt.  $ZnSO_4$ ) : 2.67 gr.  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  5ml. deiyonize suda çözüldü.

3. Tris HCl çözeltisi (20 mM pH=7.4) : 24.2 mgr. Tris tartıldı. Bir miktar deiyonize suda çözümlenerek pH 7.4 oluncaya kadar HCl ile titre edildi. Deiyonize su ile 10ml.'ye tamamlandı.

4. FAD çözeltisi (1mM.) : 4.15 mgr. FAD 5ml. çözelti (3)'de çözüldü.

5. NADPH çözeltisi (10 mM.) : 8.334mgr. NADPH 1ml. çözelti (3)'de çözüldü.

6. Nitrat redüktaz çözeltisi (10 U/lt.) : 20 U'lik nitrat redüktaz 2ml. çözelti (3)'de çözüldü.

7. Laktat dehidrogenaz çözeltisi (10mgr./2ml.)

8. Na piruvat (0.5 M.) : 55mgr.'ı 1ml. deiyonize suda çözüldü.

9. Fosforik asit çözeltisi (25gr/lt.) : 172 $\mu$ L o-fosforik asit (%85'lik) 10ml. deiyonize suda çözüldü.

#### 10. Standartlar :

100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 0  $\mu$ M'lik nitrit standartları  $NaNO_2$  kullanılarak hazırlandı.

50; 40; 30; 20; 10; 7.5; 5; 2.5; 0  $\mu\text{M}$ 'lik nitrat standartları  $\text{KNO}_3$  kullanılarak hazırlandı.

### **Nitrit Tayini :**

Nümuneler 1: 4 oranında deiyonize su ile dilue edildi. 400  $\mu\text{L}$ . dilue nümuneye deproteinizasyon için %30'luk  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'dan 20  $\mu\text{L}$ . ilave edildi. 10 dakika 6000 rpm' de santrifüjleme yapıldı. Her kuyucuğa 100  $\mu\text{L}$ . süpernatant + 100  $\mu\text{L}$ . Griess reaktifi koyuldu. Kör olarak 100  $\mu\text{L}$ . süpernatant + 100  $\mu\text{L}$ . fosforik asit kullanıldı. 10 dakika oda sıcaklığında enkübe edildi. 540 nm'de köre karşı mikrokuyucuk okuyucusunda okuma yapıldı.

Rat nümuneleri iki kere, standartlar üç kere çalışıldı. Her kuyucuk için 100  $\mu\text{L}$  standart kullanıldı.

Hesaplama : Mikrokuyucuk okuyucusunda 540 nm. dalga boyunda nümune ve standartların absorbantları okundu. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi. Bu grafikten yararlanılarak serum nitrit miktarı  $\mu\text{mol/L}$  olarak belirlendi.

### **Total Nitrit + Nitrat Tayini :**

100  $\mu\text{L}$ . serum alındı. 300  $\mu\text{L}$  distile su ilave edilerek dört kat dilue edildi. NADPH, son konsantrasyon 50  $\mu\text{mol/L}$ . olacak şekilde ilave edildi. FAD, son konsantrasyon 5  $\mu\text{mol/L}$  olacak şekilde ilave edildi. Nitrat redüktaz son konsantrasyon 200 U/Lt. olacak şekilde ilave edildi. Örnekler 20 dakika 37 C°'de inkübe edildi. Sodyum piruvat son konsantrasyon 10  $\mu\text{mol/Lt}$ . olacak şekilde ilave edildi. LDH son konsantrasyon 10 mg/Lt. olacak şekilde ilave edildi. 5 dakika 37 C°'de inkübe edildi. 20  $\mu\text{L}$ . % 30'luk  $\text{ZnSO}_4$  eklendi ve vortekslendi. 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Hazırlanan örneklerden herbir mikrokuyucuğa 100  $\mu\text{L}$ . süpernatant konuldu. Üzerlerine 100  $\mu\text{L}$ . Griess reaktifi eklendi. Renk meydana gelmesi için 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra O.D. 540 nm'de 100  $\mu\text{L}$ . fosforik asitle hazırlanan köre karşı okuma yapıldı.

Rat nümuneleri iki kere, standartlar üç kere çalışılarak hesaplama aynen nitritte olduğu gibi yapıldı.

### **Tibiaların Akım Sitometrik DNA Analizi İçin Hazırlanması**

Kan alma işlemi tamamlanan ratlar, eterli kavanozlarda sakrifiye edildikten sonra kırık tibia derisi anterior longitudinal insizyonla sıyrıldı. Tibia dizden ve ayak bileğinden dezartiküle edildi. Disseksiyonla kırık çevresi yumuşak dokular ve periost sıyrılarak, ayrı ayrı Phosphate Buffer (Bio systems) solusyonu içeren tüplere konuldu. Ardından kırık bölgesinin proksimalinden ve distalinden tibia kesildi. Kırık bölgesindeki medulla Phosphate Buffer solusyonu çekilmiş 21 G uçlu enjektörle ayrı bir tüpe yıkandı (Meduller lavaj). Kalan kortikal kısım bistüri ile Phosphate Buffer solusyonlu tüp içine yontuldu. Böylece kırık çevresindeki yumuşak doku, periost, korteks ve meduller dokular farklı dört tüpe ayrılmış oldu.

Disseksiyon ile ayrılmış dokular DNA analizi için tek tek petri kutusu içine aktarılarak bistüri ile defalarca parçalandı. Parçalanmış materyaller 16 G uçlu enjektörden defalarca geçirildi. Son olarak parçalı dokular ihtiva eden solüsyon DNA Mech (47 mikronmetrelik filtre) li enjektörden geçirilerek kaba partiküllerden ayrıldı. Süzölmüş hücre solüsyonu Coulter DNA-Prep Work station cihazına yerleştirilerek Coulter DNA Prep Reagents kit ile hücre DNA'ları otomatik olarak boyandı. Yarım saatlik inkübasyondan sonra DNA kontrol ile standandize edilmiş 488 nm argon iyon lazer ışınli akım sitometri cihazında (Coulter Epics Elite Esp) DNA analizleri yapıldı. En az 10.000 hücre sayılarak bilgisayar sistemine aktarıldı. DNA histogramında G0/G1, S, G2/M fazındaki hücrelerin oranları, CV değerleri Multicycle programı kullanılarak değerlendirildi.

### **Tibiaların Histopatolojik İnceleme İçin Hazırlanması**

Her gruptan birer hayvan sakrifiye edildikten sonra kırık tibia derisi anterior longitudinal insizyonla sıyrıldı. Tibia ayak bileği ve dizden dezartiküle edildi. Alınan dokular fosfat tamponlu %10'luk formalinde 24 saat tespit edildi. Sonra %10'luk nitrik asitle bir haftada dekalsifiye edildi. Dekalsifiye dokular musluk suyu ile yıkanıp yeniden tespit için %10'luk formol'de 24 saat daha bekletildikten sonra rutin takip sonucu parafin bloklara gömüldü. Bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, Masson's Trichrom'la (M-T) boyandı. Boyalı kesitler ışık mikroskopuyla incelendi. Fotomikroskopta resimleri çekildi ve mikrografları hazırlandı.

## **İstatistiksel Değerlendirme**

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 7,5 for Windows paket programı kullanıldı. Gruplar arası istatistiksel farkı araştırmak için gruplar bağımsız ve parametrik varsayımları yerine getirmediğinden nonparametrik Kruskal Wallis varyans analizi uygulandı. Post-Hoc ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney-U testi uygulandı.

## BULGULAR

### AKIM SİTOMETRİK BULGULAR

Meduller dokuların, kortikal dokuların, periosteal dokuların ve eksternal yumuşak dokuların, akım sitometrik analizleri ile grupların G0/G1, G2/M ve S fazlarıyla CV değerleri bulunarak ortalamaları (Ort) ve standart sapmaları (SD) hesaplanarak, sırasıyla Tablo-2,3,4 ve 5'de gösterilmiştir.

**Tablo-2:** Meduller dokuların akım sitometrik analiz sonuçları.

Grup	Sayı	% G1 Ort±SD	CV G1 Ort±SD	% G2 Ort±SD	CV G2 Ort±SD	%S Ort±SD
I	8	72,62±1,37	4,87±1,07	4,05±0,87	5,75±1,36	23,07±1,61
IIa	8	58,55±2,68	10,78±10,05	5,55±1,53	7,66±0,94	35,90±3,78
IIb	8	62,38±1,82	6,70±1,13	6,73±0,83	5,42±0,93	30,88±1,85
IIc	8	59,36±3,46	10,08±3,13	18,72±2,58	8,93±2,41	21,90±4,91
IId	8	75,72±1,43	4,86±0,65	2,89±1,16	5,35±1,55	21,38±1,49
IIe	8	63,06±3,93	5,48±0,86	8,16±1,50	6,25±1,61	28,77±2,92
IIf	8	74,86±1,58	5,70±1,24	3,71±0,60	5,73±0,60	21,43±1,73
IIg	8	71,01±2,03	4,55±0,56	4,80±2,05	4,46±0,29	24,18±1,28
IIh	8	68,95±2,16	5,02±1,11	3,61±1,60	5,53±1,20	27,42±1,79
IIIa	8	67,68±2,65	6,27±0,74	3,95±3,57	7,15±0,67	28,35±1,28
IIIb	8	68,32±5,03	6,42±1,46	3,42±1,85	6,46±1,99	28,27±3,78
IIIc	8	69,77±2,04	6,30±1,51	10,92±1,57	7,35±2,02	19,30±0,91
IIId	8	77,42±0,73	5,75±1,83	3,12±1,00	5,65±0,57	19,47±1,22
IIIe	8	80,00±1,12	5,65±1,22	2,70±1,54	5,82±1,01	17,27±2,62
IIIf	8	75,25±0,91	6,58±1,62	3,17±1,49	6,45±2,15	21,57±2,29
IIIg	8	70,75±1,28	5,03±0,60	1,70±1,56	4,98±0,69	27,52±2,84
IIIh	8	74,07±1,44	6,13±1,00	3,15±2,21	4,93±0,77	22,75±1,93
<b>Toplam</b>	<b>136</b>					

**Tablo-3:** Kortikal dokuların akım sitometrik analiz sonuçları

Grup	Sayı	% G1 Ort±SD	CV G1 Ort±SD	% G2 Ort±SD	CV G2 Ort±SD	%S Ort±SD
I	8	77,42±2,54	8,10±1,85	1,22±1,31	7,57±2,74	21,35±3,08
IIa	8	77,61±3,30	9,17±2,76	1,07±2,04	7,57±1,04	21,31±4,09
IIb	8	75,05±1,43	6,06±1,10	1,85±0,81	7,86±0,91	23,10±0,98
IIc	8	79,10±4,97	13,35±5,15	0,43±0,56	6,43±1,54	19,15±2,27
IId	8	86,12±4,43	10,08±3,59	2,11±4,12	9,18±4,14	11,76±6,60
IIe	8	76,85±2,88	8,96±1,64	5,00±2,62	8,02±1,81	18,15±1,58
IIf	8	92,67±1,95	10,48±1,07	2,35±1,90	9,21±3,46	4,97±2,28
IIg	8	86,54±2,10	5,45±0,60	2,73±1,69	5,13±0,96	10,73±1,00
IIh	8	80,88±3,29	4,84±0,41	0,77±0,84	5,91±1,03	17,58±2,99
IIIa	8	80,47±0,77	6,22±2,09	1,02±0,80	6,61±1,88	18,50±0,75
IIIb	8	76,20±1,61	8,23±3,45	1,65±0,38	5,13±1,25	22,15±1,78
IIIc	8	82,62±1,09	7,31±1,18	3,10±2,03	6,52±1,00	14,27±2,20
IIId	8	84,85±4,33	10,17±3,46	3,25±2,51	7,15±1,60	11,90±3,21
IIIe	8	73,45±3,72	6,37±1,11	1,17±0,87	5,60±1,24	25,40±4,22
IIIf	8	87,57±0,81	10,35±3,06	1,07±0,70	5,88±1,05	11,30±1,36
IIIg	8	87,17±4,28	5,63±0,66	0,45±0,34	5,50±1,09	12,35±4,03
IIIh	8	79,07±2,42	7,15±1,52	2,97±0,61	7,25±1,03	17,97±2,12
<b>Toplam</b>	<b>136</b>					

**Tablo-4:** Periosteal dokuların akım sitometrik analiz sonuçları

Grup	Sayı	% G1 Ort±SD	CV G1 Ort±SD	% G2 Ort±SD	CV G2 Ort±SD	%S Ort±SD
I	8	85,00±1,16	13,07±1,29	2,62±1,42	7,07±2,32	12,40±1,13
IIa	8	76,78±1,94	6,75±1,73	1,88±1,22	5,92±1,28	21,33±2,01
IIb	8	84,41±2,62	7,02±1,21	1,21±0,63	8,21±1,30	14,37±2,77
IIc	8	79,02±3,45	7,87±1,55	9,18±2,43	7,97±1,33	11,76±2,69
IId	8	86,63±2,17	9,60±2,56	2,10±0,38	6,78±2,53	11,27±2,36
IIe	8	82,66±1,11	6,77±1,33	3,96±1,85	5,73±0,97	13,35±1,48
IIf	8	94,42±1,70	10,17±1,99	2,07±1,03	8,27±1,89	3,50±2,38
IIg	8	92,98±1,06	5,48±0,84	1,63±0,49	5,26±0,59	5,37±1,21
IIh	8	80,15±3,27	4,46±0,32	1,16±1,47	5,88±1,28	18,67±3,31
IIIa	8	89,32±2,06	7,02±2,06	0,80±0,32	7,87±0,94	9,87±1,87
IIIb	8	86,75±2,30	7,28±1,15	1,57±0,26	7,21±1,59	11,70±2,52
IIIc	8	83,20±0,85	7,15±1,07	5,12±0,53	7,42±1,44	11,67±0,39
IIId	8	89,42±1,81	10,17±2,38	0,97±0,81	8,55±1,20	9,62±2,02
IIIe	8	91,62±1,48	5,51±0,86	2,07±0,51	4,98±1,31	6,35±1,07
IIIf	8	89,15±2,37	8,57±2,44	1,82±1,17	6,38±2,25	9,02±1,54
IIIg	8	92,57±0,48	6,53±0,72	1,62±0,47	6,65±2,04	5,80±0,56
IIIh	8	89,02±0,96	7,38±0,75	1,92±0,88	6,33±0,69	9,02±0,54
<b>Toplam</b>	<b>136</b>					

**Tablo-5:** Eksternal yumuşak dokuların akım sitometrik analiz sonuçları

Grup	Sayı	% G1	CV G1	% G2	CV G2	%S
		Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
I	8	94,37±0,81	9,07±0,96	1,72±1,15	8,52±0,87	4,05±1,77
IIa	8	84,77±4,34	8,60±2,59	0,42±0,54	8,05±1,15	14,80±4,66
IIb	8	92,32±1,78	6,72±1,76	0,92±1,52	6,38±0,92	6,74±1,86
IIc	8	90,67±1,63	8,88±2,24	3,72±1,12	8,31±1,26	5,58±0,91
IId	8	88,93±4,18	7,02±1,17	0,78±1,05	5,10±1,67	10,28±3,65
IIE	8	90,63±1,56	7,00±1,24	0,25±0,30	7,96±1,83	9,11±1,59
IIF	8	88,47±1,36	9,50±0,91	0,08±0,18	5,66±0,97	11,45±1,32
IIg	8	93,11±1,58	6,27±0,61	0,86±0,52	5,40±0,85	6,02±1,58
IIh	8	91,03±1,09	6,67±1,98	1,06±0,66	5,27±1,11	7,90±1,27
IIIa	8	92,21±2,96	7,21±1,41	1,23±1,70	6,45±1,93	6,55±1,86
IIIb	8	85,55±2,14	7,53±1,54	1,12±1,01	5,97±2,17	13,73±2,61
IIIc	8	86,55±2,76	6,98±1,00	3,77±1,04	7,57±1,68	9,60±3,16
IIId	8	90,47±5,05	8,06±1,42	2,37±1,29	7,13±1,91	7,70±4,88
IIIe	8	86,97±2,03	5,81±1,32	1,80±0,93	6,62±1,24	11,16±2,25
IIIf	8	94,97±2,15	9,46±1,77	1,40±0,91	7,66±1,73	3,42±2,70
IIIg	8	94,30±0,45	6,03±0,86	0,30±0,44	5,88±0,90	5,37±0,33
IIIh	8	91,02±3,42	7,93±0,73	0,15±0,16	6,31±1,71	8,85±3,51
<b>Toplam</b>	<b>136</b>					

### AKIM SİTOMETRİK BULGULARIN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Verilerin istatistiksel analizinde; veriler ölçümsel olduğundan, gruplar bağımsız ve parametrik şartları taşımadığından, grupların ikiyeşerli karşılaştırılmasında Mann Whitney-U testi kullanıldı.

Verilerin anlamlılık düzeyi 0,05 olarak alındı. Veriler ortalama ± standart sapma (Ort±SD) olarak ifade edildi.

Meduller dokuların, kortikal dokuların, periosteal dokuların ve eksternal yumuşak dokuların, akım sitometrik analizlerinin istatistiksel değerlendirilmesi Tablo-6,7,8 ve 9'da gösterilmiştir.



**Tablo-6:** Meduller dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

GrupI %G2 Ort±SD	Karşılaştırılan Grup	%G2 Ort±SD	P Değeri
4,05±0,87	IIa	5,55±1,53	0,10
	IIb	6,73±0,83	0,00
	IIc	18,72±2,58	0,00
	IId	2,89±1,16	0,06
	IIe	8,16±1,50	0,00
	IIf	3,71±0,60	0,38
	IIg	4,80±2,05	0,03
	IIh	3,61±1,60	0,64
	IIIa	3,95±3,57	1,00
	IIIb	3,42±1,85	0,44
	IIIc	10,92±1,57	0,00
	IIId	3,12±1,00	0,10
	IIIe	2,70±1,54	0,03
	IIIf	3,17±1,49	0,44
	IIIg	1,70±1,56	0,01
	IIIh	3,15±2,21	0,87

**Tablo-7:** Kortikal dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

GrupI %G2 Ort±SD	Karşılaştırılan Grup	%G2 Ort±SD	P Değeri
1,22±1,31	IIa	1,07±2,04	0,57
	IIb	1,85±0,81	0,44
	IIc	0,43±0,56	0,44
	IId	2,11±4,12	0,87
	IIe	5,00±2,62	0,00
	IIf	2,35±1,90	0,44
	IIg	2,73±1,69	0,06
	IIh	0,77±0,84	0,57
	IIIa	1,02±0,80	0,72
	IIIb	1,65±0,38	1,00
	IIIc	3,10±2,03	0,03
	IIId	3,25±2,51	0,10
	IIIe	1,17±0,87	0,72
	IIIf	1,07±0,70	1,00
	IIIg	0,45±0,34	0,72
	IIIh	2,97±0,61	0,00

**Tablo-8:** Periosteal dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

GrupI %G2 Ort±SD	Karşılaştırılan Grup	%G2 Ort±SD	P Değeri
2,62±1,42	IIa	1,88±1,22	0,38
	IIb	1,21±0,63	0,13
	IIc	9,18±2,43	0,00
	IId	2,10±0,38	0,50
	IIe	3,96±1,85	0,10
	IIf	2,07±1,03	0,32
	IIg	1,63±0,49	0,10
	IIh	1,16±1,47	0,06
	IIIa	0,80±0,32	0,02
	IIIb	1,57±0,26	0,16
	IIIc	5,12±0,53	0,00
	IIId	0,97±0,81	0,03
	IIIe	2,07±0,51	0,72
	IIIf	1,82±1,17	0,10
	IIIg	1,62±0,47	0,23
	IIIh	1,92±0,88	0,00

**Tablo-9:** Eksternal yumuşak dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

GrupI %G2 Ort±SD	Karşılaştırılan Grup	%G2 Ort±SD	P Değeri
2,62±1,42	IIa	0,42±0,54	0,01
	IIb	0,92±1,52	0,08
	IIc	3,72±1,12	0,00
	IId	0,78±1,05	0,03
	IIe	0,25±0,30	0,00
	IIf	0,08±0,18	0,00
	IIg	0,86±0,52	0,23
	IIh	1,06±0,66	0,38
	IIIa	1,23±1,70	0,23
	IIIb	1,12±1,01	0,10
	IIIc	3,77±1,04	0,01
	IIId	2,37±1,29	0,32
	IIIe	1,80±0,93	0,72
	IIIf	1,40±0,91	0,72
	IIIg	0,30±0,44	0,01
	IIIh	0,15±0,16	0,00

Grup II ve Grup III'ün meduller dokularının, kortikal dokularının, periosteal dokularının ve eksternal yumuşak dokularının, %G<sub>2</sub> oranının istatistiksel değerlendirilmesi Tablo-10,11,12 ve 13'de gösterilmiştir.

**Tablo-10:** Meduller dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel analizi

Grup	Grup	Grup II %G2 Ort±SD	Grup III %G2 Ort±SD	P Değeri
IIa	IIIa	5,55±1,53	3,95±3,57	0,57
IIb	IIIb	6,73±0,83	3,42±1,85	0,00
IIc	IIIc	18,72±2,58	10,92±1,57	0,00
IId	IIId	2,89±1,16	3,12±1,00	0,72
IIe	IIIe	8,16±1,50	2,70±1,54	0,00
IIf	IIIf	3,71±0,60	3,17±1,49	0,32
IIg	IIIg	4,80±2,05	1,70±1,56	0,00
IIh	IIIh	3,61±1,60	3,15±2,21	0,87

**Tablo-11:** Kortikal dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel analizi

Grup	Grup	Grup II %G2 Ort±SD	Grup III %G2 Ort±SD	P Değeri
IIa	IIIa	1,07±2,04	1,02±0,80	0,44
IIb	IIIb	1,85±0,81	1,65±0,38	0,87
IIc	IIIc	0,43±0,56	3,10±2,03	0,03
IId	IIId	2,11±4,12	3,25±2,51	0,10
IIe	IIIe	5,00±2,62	1,17±0,87	0,00
IIf	IIIf	2,35±1,90	1,07±0,70	0,05
IIg	IIIg	2,73±1,69	0,45±0,34	0,00
IIh	IIIh	0,77±0,84	2,97±0,61	0,00

**Tablo-12:** Periosteal dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel analizi

Grup	Grup	Grup II %G2 Ort±SD	Grup III %G2 Ort±SD	P Değeri
IIa	IIIa	1,88±1,22	0,80±0,32	0,06
IIb	IIIb	1,21±0,63	1,57±0,26	0,08
IIc	IIIc	9,18±2,43	5,12±0,53	0,00
IId	IIId	2,10±0,38	0,97±0,81	0,01
IIe	IIIe	3,96±1,85	2,07±0,51	0,02
IIf	IIIf	2,07±1,03	1,82±1,17	0,87
IIg	IIIg	1,63±0,49	1,62±0,47	1,00
IIh	IIIh	1,16±1,47	1,92±0,88	0,10

**Tablo-13:** Eksternal yumuşak dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının istatistiksel analizi

Grup	Grup	Grup II %G2 Ort±SD	Grup III %G2 Ort±SD	P Değeri
IIa	IIIa	0,42±0,54	1,23±1,70	0,57
IIb	IIIb	0,92±1,52	1,12±1,01	0,57
IIc	IIIc	3,72±1,12	3,77±1,04	0,87
IId	IIId	0,78±1,05	2,37±1,29	0,02
IIe	IIIe	0,25±0,30	1,80±0,93	0,00
IIf	IIIf	0,08±0,18	1,40±0,91	0,00
IIg	IIIg	0,86±0,52	0,30±0,44	0,05
IIh	IIIh	1,06±0,66	0,15±0,16	0,00

### BİYOKİMYASAL BULGULAR

Grup I, grup II ve grup III'ün kalsiyum (Ca), fosfor (P), alkalin fosfataz (AP), nitrit (NO<sub>2</sub>), nitrat (NO<sub>3</sub>) ve nitrit+nitrat (NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>) değerleri bulunarak ortalamaları, standart sapmaları hesaplanıp, istatistiksel değerlendirmesi Tablo-14,15 ve16'da gösterilmiştir.

**Tablo-14:** Tüm grupların biyokimyasal sonuçları

Grup	Sayı	Ca Ort±SD	P Ort±SD	AP Ort±SD	NO <sub>2</sub> Ort±SD	NO <sub>3</sub> Ort±SD	NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> Ort±SD
I	8	9,76±0,23	5,37±0,23	184,87±5,61	2,87±0,08	17,45±3,08	20,32±0,00
IIa	8	9,92±0,30	6,77±0,21	254,00±6,34	9,27±1,04	23,87±4,09	33,14±0,00
IIb	8	7,97±0,16	12,72±0,23	155,87±4,42	2,02±0,91	54,40±0,98	56,42±0,00
IIc	8	9,58±0,14	4,41±0,24	173,87±4,91	8,37±1,54	10,66±2,27	19,03±0,00
IId	8	9,41±0,18	5,56±0,34	449,50±6,76	2,02±4,14	48,05±6,60	50,07±0,00
IIe	8	11,16±0,15	5,15±0,27	395,87±7,27	8,97±1,81	70,03±1,58	78,99±0,00
IIf	8	9,90±0,18	5,51±0,29	76,12±4,38	6,25±3,46	12,08±2,28	18,33±0,00
IIg	8	8,86±0,25	6,72±0,23	286,50±4,59	4,44±0,96	51,98±1,00	56,42±0,00
IIh	8	9,28±0,21	6,98±0,30	379,25±5,49	8,37±1,03	26,18±2,99	34,55±0,00
IIIa	8	9,20±0,18	4,01±0,26	258,25±4,16	10,48±1,88	41,01±0,75	51,49±0,00
IIIb	8	8,80±0,21	6,28±0,18	414,87±3,97	21,07±1,25	60,05±1,78	81,12±0,00
IIIc	8	9,11±0,24	4,15±0,28	671,12±5,54	23,18±1,00	31,13±2,20	54,31±0,00
IIId	8	7,33±0,22	4,31±0,30	368,50±5,68	7,76±1,60	35,96±3,21	43,72±0,00
IIIe	8	6,65±0,26	3,48±0,22	405,25±4,65	5,65±1,24	34,55±4,22	40,20±0,00
IIIf	8	11,16±0,19	4,13±0,22	131,12±4,32	9,27±1,05	35,16±1,36	44,43±0,00
IIIg	8	10,91±0,20	3,48±0,22	252,12±4,22	4,44±1,09	16,00±4,03	20,44±0,00
IIIh	8	11,50±0,20	4,41±0,30	298,87±4,06	20,46±1,03	14,80±2,12	35,26±0,00

**Tablo-15:** Tüm grupların biyokimyasal sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Grup I Ort±SD	Grup	Ca Ort±SD	P Değeri	P Ort±SD	P Değeri	AP Ort±SD	P Değeri
Ca=9,76±0,23	IIa	9,92±0,30	0,27	6,77±0,21	0,00	254,00±6,34	0,00
P=5,37±0,23	IIb	7,97±0,16	0,00	12,72±0,23	0,00	155,87±4,42	0,00
AP=184,87±5,61	IIc	9,58±0,14	0,13	4,41±0,24	0,00	173,87±4,91	0,00
	IId	9,41±0,18	0,00	5,56±0,34	0,23	449,50±6,76	0,00
	IIe	11,16±0,15	0,00	5,15±0,27	0,10	395,87±7,27	0,00
	IIf	9,90±0,18	0,27	5,51±0,29	0,32	76,12±4,38	0,00
	IIg	8,86±0,25	0,00	6,72±0,23	0,00	286,50±4,59	0,00
	IIh	9,28±0,21	0,00	6,98±0,30	0,00	379,25±5,49	0,00
	IIIa	9,20±0,18	0,00	4,01±0,26	0,00	258,25±4,16	0,00
	IIIb	8,80±0,21	0,00	6,28±0,18	0,00	414,87±3,97	0,00
	IIIc	9,11±0,24	0,00	4,15±0,28	0,00	671,12±5,54	0,00
	IIId	7,33±0,22	0,00	4,31±0,30	0,00	368,50±5,68	0,00
	IIIe	6,65±0,26	0,72	3,48±0,22	0,00	405,25±4,65	0,00
	IIIf	11,16±0,19	0,00	4,13±0,22	0,00	131,12±4,32	0,00
	IIIg	10,91±0,20	0,00	3,48±0,22	0,00	252,12±4,22	0,00
	IIIh	11,50±0,20	0,00	4,41±0,30	0,00	298,87±4,06	0,00

**Tablo-16:** Tüm grupların biyokimyasal sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Grup I Ort±SD	Grup	NO <sub>2</sub> Ort±SD	P Değeri	NO <sub>3</sub> Ort±SD	P Değeri
NO <sub>2</sub> =2,87±0,08	IIa	9,27±1,04	0,00	23,87±4,09	0,00
NO <sub>3</sub> =17,45±3,08	IIb	2,02±0,91	0,00	54,40±0,98	0,00
	IIc	8,37±1,54	0,00	10,66±2,27	0,00
	IId	2,02±4,14	0,00	48,05±6,60	0,00
	IIe	8,97±1,81	0,00	70,03±1,58	0,00
	IIf	6,25±3,46	0,00	12,08±2,28	0,00
	IIg	4,44±0,96	0,00	51,98±1,00	0,00
	IIh	8,37±1,03	0,00	26,18±2,99	0,00
	IIIa	10,48±1,88	0,00	41,01±0,75	0,00
	IIIb	21,07±1,25	0,00	60,05±1,78	0,00
	IIIc	23,18±1,00	0,00	31,13±2,20	0,00
	IIId	7,76±1,60	0,00	35,96±3,21	0,00
	IIIe	5,65±1,24	0,00	34,55±4,22	0,00
	IIIf	9,27±1,05	0,00	35,16±1,36	0,00
	IIIg	4,44±1,09	0,00	16,00±4,03	0,00
	IIIh	20,46±1,03	0,00	14,80±2,12	0,00

Grup II ve Grup III'ün Ca, P, AP değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi sırasıyla Tablo-17,18 ve 19'da gösterilmiştir.

**Tablo-17: Ca değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi**

Grup	Grup	GrupII Ca Ort±SD	GrupIII Ca Ort±SD	P Değeri
IIa	IIIa	9,92±0,30	9,20±0,18	0,00
IIb	IIIb	7,97±0,16	8,80±0,21	0,00
IIc	IIIc	9,58±0,14	9,11±0,24	0,00
IId	IIId	9,41±0,18	7,33±0,22	0,00
IIe	IIIe	11,16±0,15	6,65±0,26	0,00
IIf	IIIf	9,90±0,18	11,16±0,19	0,00
IIg	IIIg	8,86±0,25	10,91±0,20	0,00
IIh	IIIh	9,28±0,21	11,50±0,20	0,00

**Tablo-18: P değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi**

Grup	Grup	GrupII P Ort±SD	GrupIII P Ort±SD	P Değeri
IIa	IIIa	6,77±0,21	4,01±0,26	0,00
IIb	IIIb	12,72±0,23	6,28±0,18	0,00
IIc	IIIc	4,41±0,24	4,15±0,28	0,08
IId	IIId	5,56±0,34	4,31±0,30	0,00
IIe	IIIe	5,15±0,27	3,48±0,22	0,00
IIf	IIIf	5,51±0,29	4,13±0,22	0,00
IIg	IIIg	6,72±0,23	3,48±0,22	0,00
IIh	IIIh	6,98±0,30	4,41±0,30	0,00

**Tablo-19: AP değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi**

Grup	Grup	GrupII AP Ort±SD	GrupIII AP Ort±SD	P Değeri
IIa	IIIa	254,00±6,34	258,25±4,16	0,19
IIb	IIIb	155,87±4,42	414,87±3,97	0,00
IIc	IIIc	173,87±4,91	671,12±5,54	0,00
IId	IIId	449,50±6,76	368,50±5,68	0,00
IIe	IIIe	395,87±7,27	405,25±4,65	0,01
IIf	IIIf	76,12±4,38	131,12±4,32	0,00
IIg	IIIg	286,50±4,59	252,12±4,22	0,00
IIh	IIIh	379,25±5,49	298,87±4,06	0,00

Grup II ve Grup III'ün NO<sub>2</sub> , NO<sub>3</sub> ve NO<sub>2</sub> +NO<sub>3</sub> değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi sırasıyla Tablo-20,21 ve 22'de gösterilmiştir.

**Tablo-20:** NO<sub>2</sub> değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Grup	Grup	GrupII NO <sub>2</sub> Ort±SD	GrupIII NO <sub>2</sub> Ort±SD	P Değeri
Ila	IIIa	9,27±1,04	10,48±1,88	0,00
Ilb	IIIb	2,02±0,91	21,07±1,25	0,00
Ilc	IIIc	8,37±1,54	23,18±1,00	0,00
Ild	IIId	2,02±4,14	7,76±1,60	0,00
Ile	IIIe	8,97±1,81	5,65±1,24	0,00
Ilf	IIIf	6,25±3,46	9,27±1,05	0,00
Ilg	IIIg	4,44±0,96	4,44±1,09	1,00
Ilh	IIIh	8,37±1,03	20,46±1,03	0,00

**Tablo-21:** NO<sub>3</sub> değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Grup	Grup	GrupII NO <sub>3</sub> Ort±SD	GrupIII NO <sub>3</sub> Ort±SD	P Değeri
Ila	IIIa	23,87±4,09	41,01±0,75	0,00
Ilb	IIIb	54,40±0,98	60,05±1,78	0,00
Ilc	IIIc	10,66±2,27	31,13±2,20	0,00
Ild	IIId	48,05±6,60	35,96±3,21	0,00
Ile	IIIe	70,03±1,58	34,55±4,22	0,00
Ilf	IIIf	12,08±2,28	35,16±1,36	0,00
Ilg	IIIg	51,98±1,00	16,00±4,03	0,00
Ilh	IIIh	26,18±2,99	14,80±2,12	0,00

**Tablo-22:** NO<sub>2</sub> +NO<sub>3</sub> değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Grup	Grup	GrupII NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> Ort±SD	GrupIII NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> Ort±SD	P Değeri
Ila	IIIa	33,14 ± 0,00	51,49 ± 0,00	0,00
Ilb	IIIb	56,42 ± 0,00	81,12 ± 0,00	0,00
Ilc	IIIc	19,03 ± 0,00	54,31 ± 0,00	0,00
Ild	IIId	50,07 ± 0,00	43,72 ± 0,00	0,00
Ile	IIIe	78,99 ± 0,00	40,20 ± 0,00	0,00
Ilf	IIIf	18,33 ± 0,00	44,43 ± 0,00	0,00
Ilg	IIIg	56,42 ± 0,00	20,44 ± 0,00	0,00
Ilh	IIIh	34,55 ± 0,00	35,26 ± 0,00	0,00

## MİKROSKOBİK BULGULAR

Grup I, grup II ve grup III'ün Masson's Trichrome (M-T) ile boyanan preparatlardan elde edilen kırık iyileşmesi ile ilgili ışık mikroskobu bulguları mikrograflarıyla birlikte, Resim -1 ile Resim -17 arasında gösterilmiştir.



**Resim-1:** Grup I'de histokimyasal reaksiyon ile kemik iliği (İ), mavi renkte boyanan kemik spikülü (K.S) görülmektedir (M-TX40).

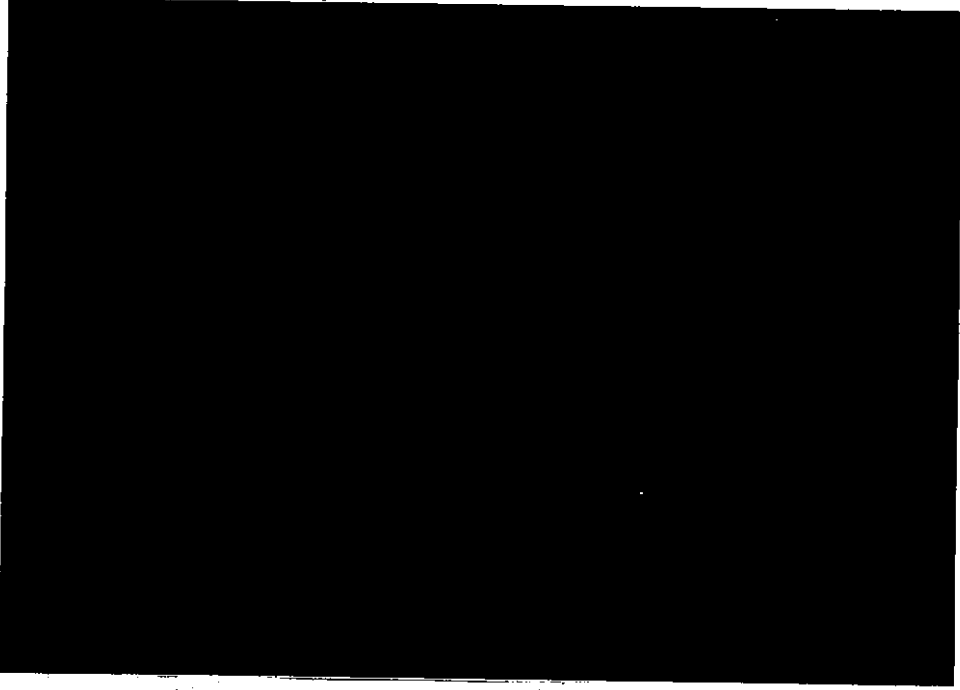




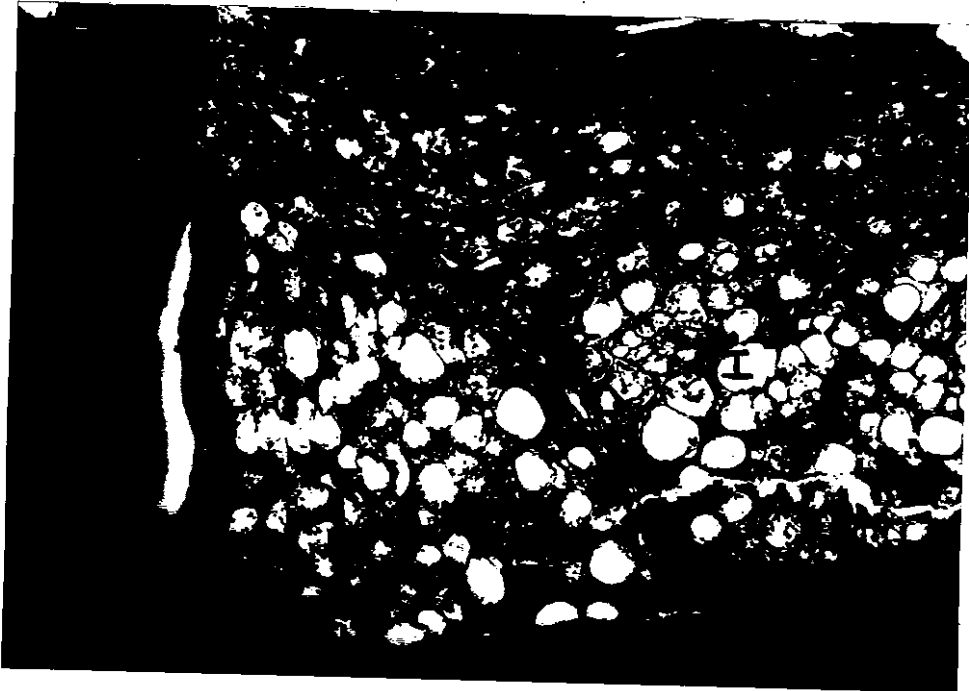
**Resim-2:** Grup II'de kırktan sonra 1. günde kanama alanı (K.A), kemik spikülü (K.S) ve ilik (İ) görülmektedir (M-TX40).



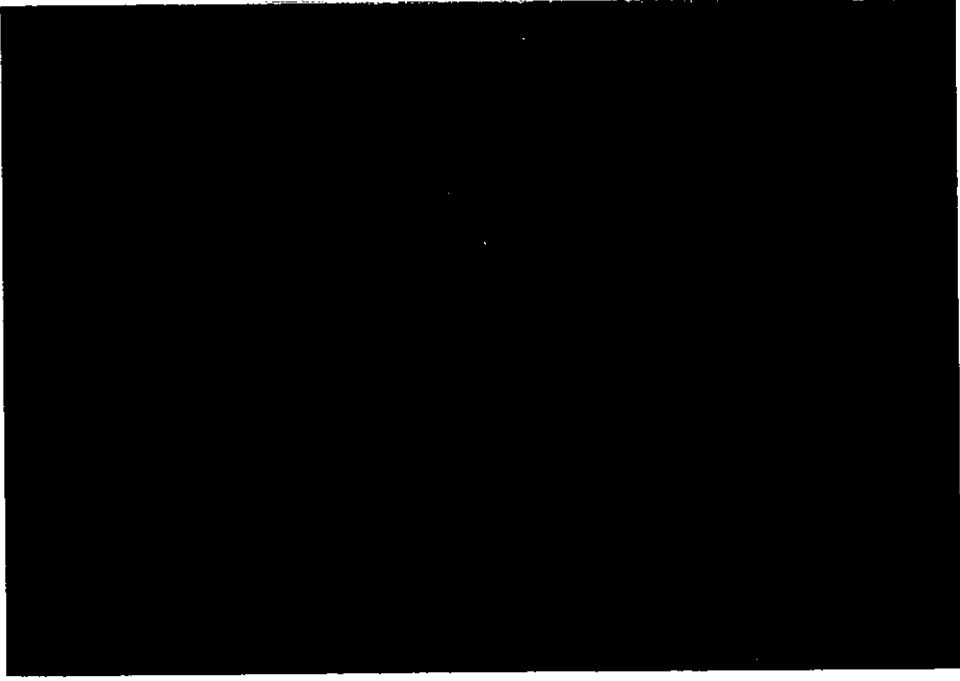
**Resim-3:** Grup III'de kırktan sonra 1. günde kanama alanı (K.A), kemik spikülü (K.S) ve ilik (İ) görülmektedir (M-TX100).



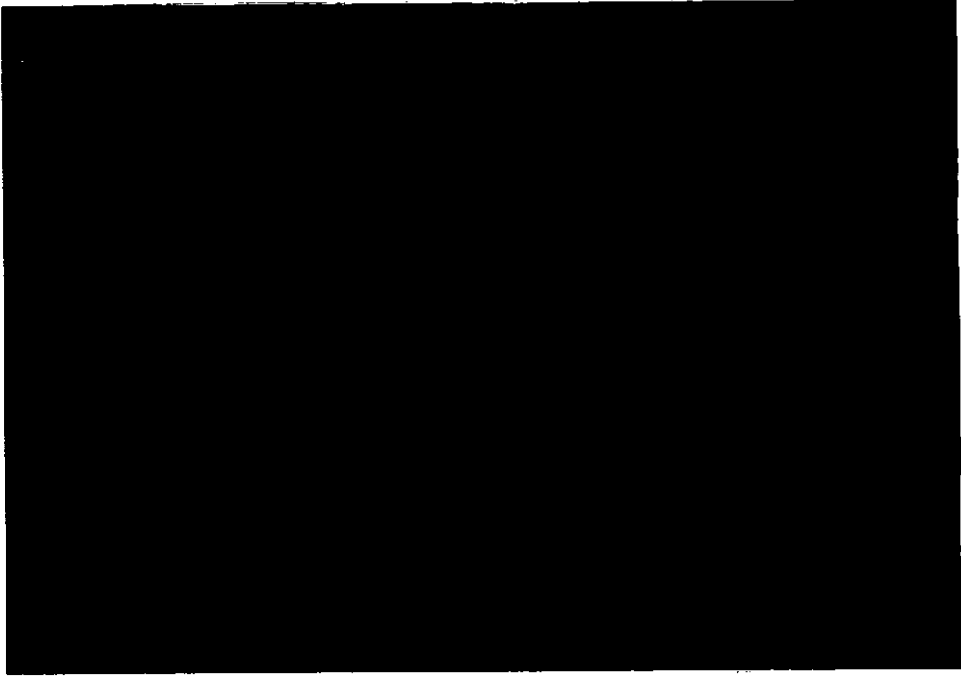
**Resim-4:** Grup II'de kırıktan sonra 3. günde kanama alanı (K.A), kemik spikülü (K.S) ve fibrin (F) görülmektedir (M-TX100).



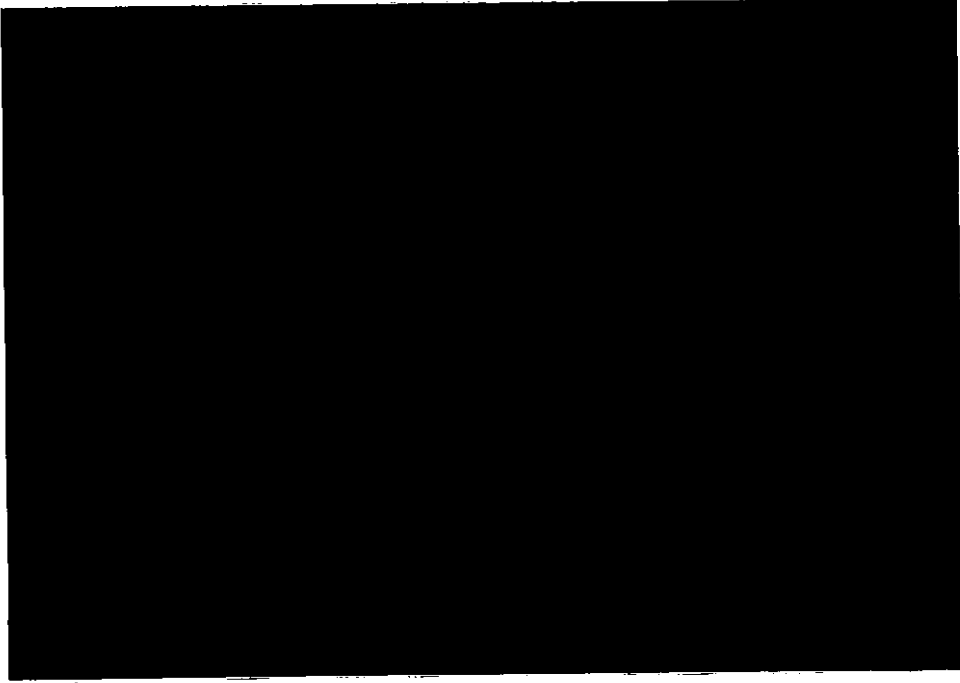
**Resim-5:** Grup III'de kırıktan sonra 3. günde kanama alanı (K.A), kemik spikülü (K.S) ve ilik (İ) görülmektedir (M-TX100).



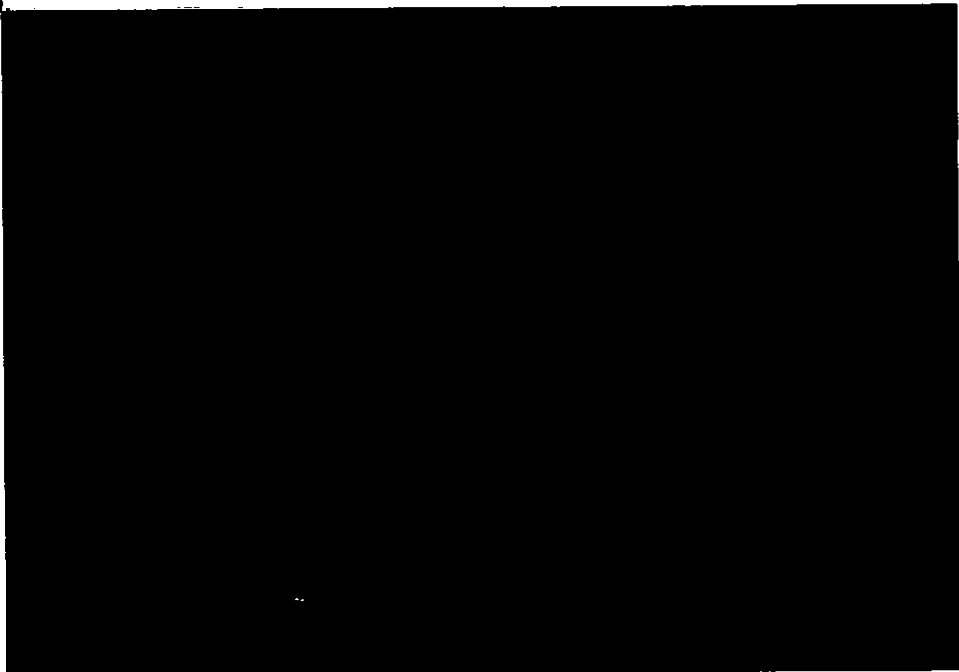
**Resim-6:** Grup II'de kırktan sonra 5. günde periost reaksiyonu alanında ( $\leftrightarrow$ ) kollagen oluşumunun başladığı (KOL) görülmektedir. Kemik spikülü (K.S) ,Çizgili Kas (Ç.K) (M-TX100).



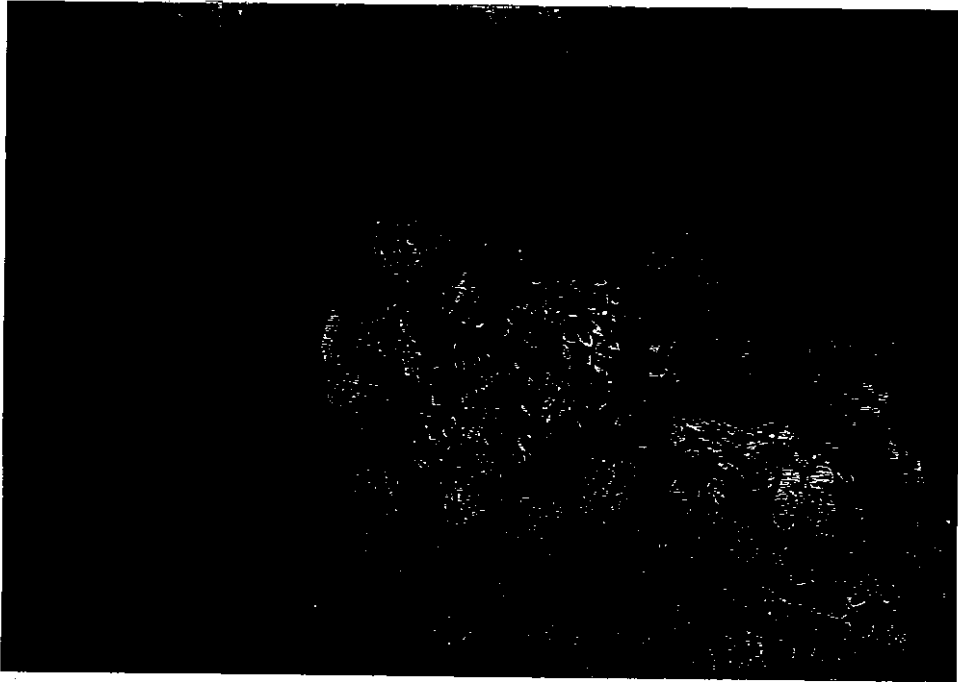
**Resim-7:** Grup III'de kırktan sonra 5. günde kemik spikülü (K.S), ilik (İ) ve çizgili kas dokusunun (Ç.K) ilişkisi görülmektedir. Periost reaksiyonu yoktur (M-TX40).



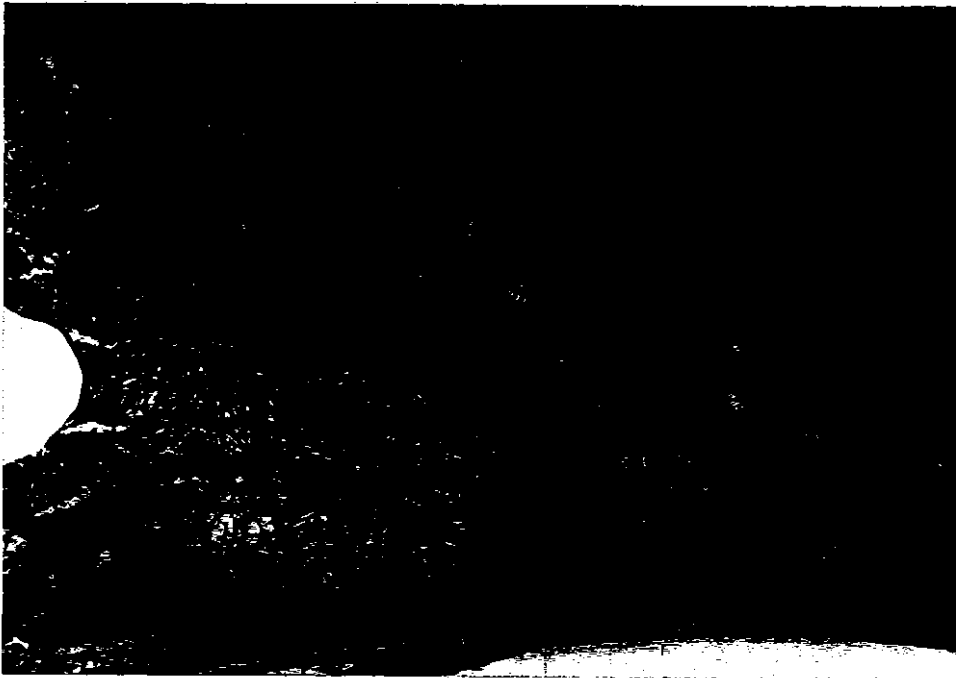
**Resim-8:** GrupII'de kırktan sonra 7. günde periost (P) reaksiyon alanında kemikleşmeye zemin teşkil eden kollagen birikimi (KOL) mavi renkte görülmektedir (M-TX100).



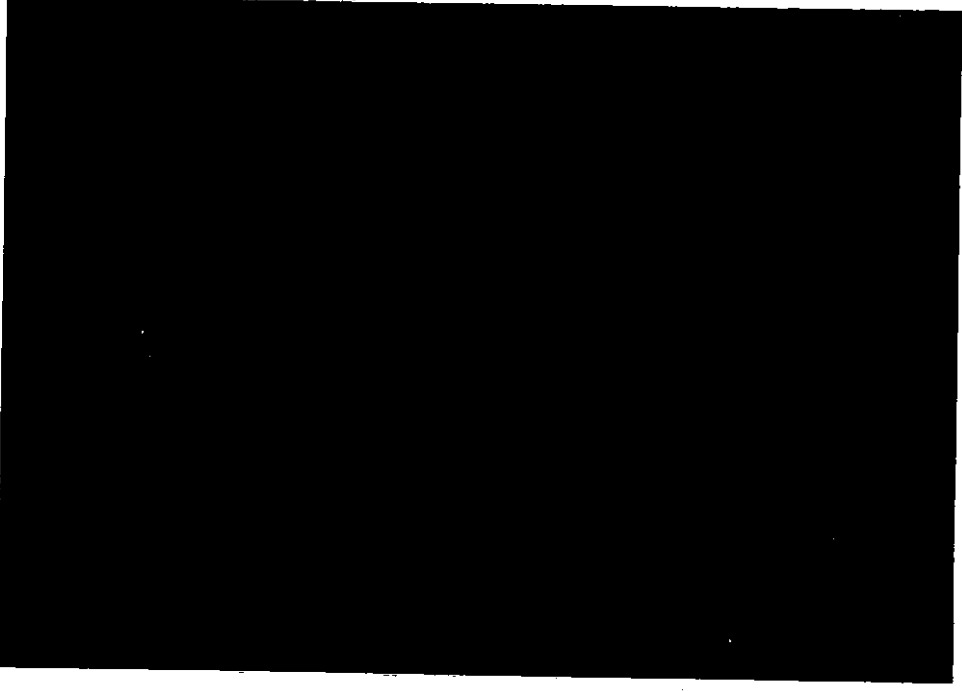
**Resim-9:** GrupIII'de kırktan sonra 7. günde periost (P) reaksiyon alanında kemikleşme olmadığı görülmektedir (M-TX100).



**Resim-10:** Grup II'de kırıktan sonra 10. günde birbirleriyle birleşen kollagen ana çatısı (KOL) mavi renkte dikkat çekmektedir (M-TX100).



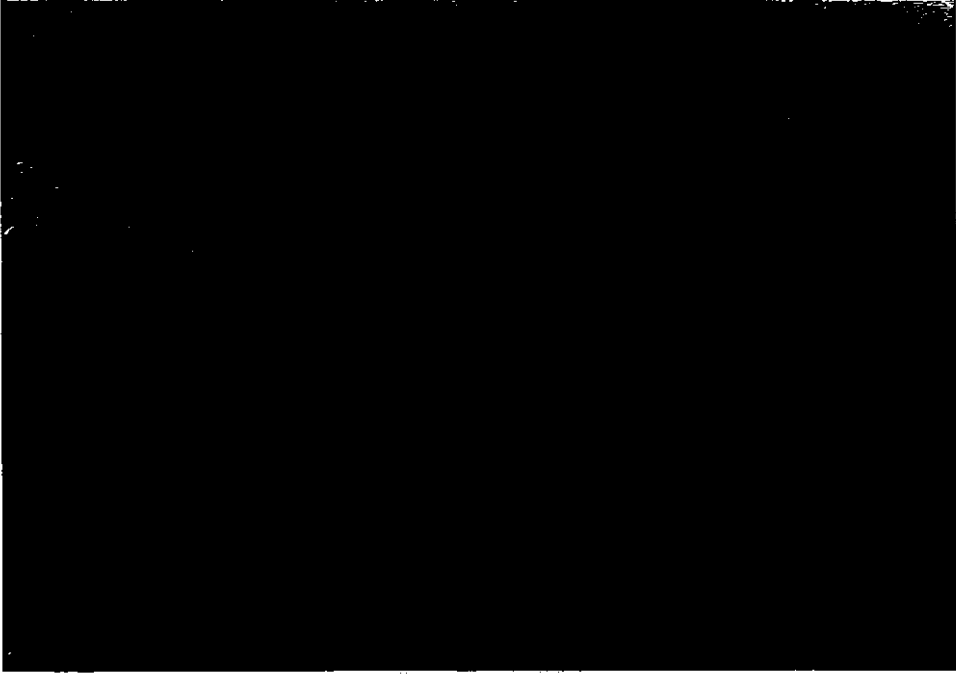
**Resim-11:** Grup III'de kırıktan sonra 10. günde kemik spikülü (K.S) ile devam eden periost (P) reaksiyonu alanında yalnızca bağ dokusu (B) elemanları görülmektedir (M-TX100).



**Resim-12** Grup II'de kırıktan sonra 14. günde kemikleşme alanında kollagen birikimi (KOL) mavi renkte geniş alanlar işgal etmektedir (M-TX100).



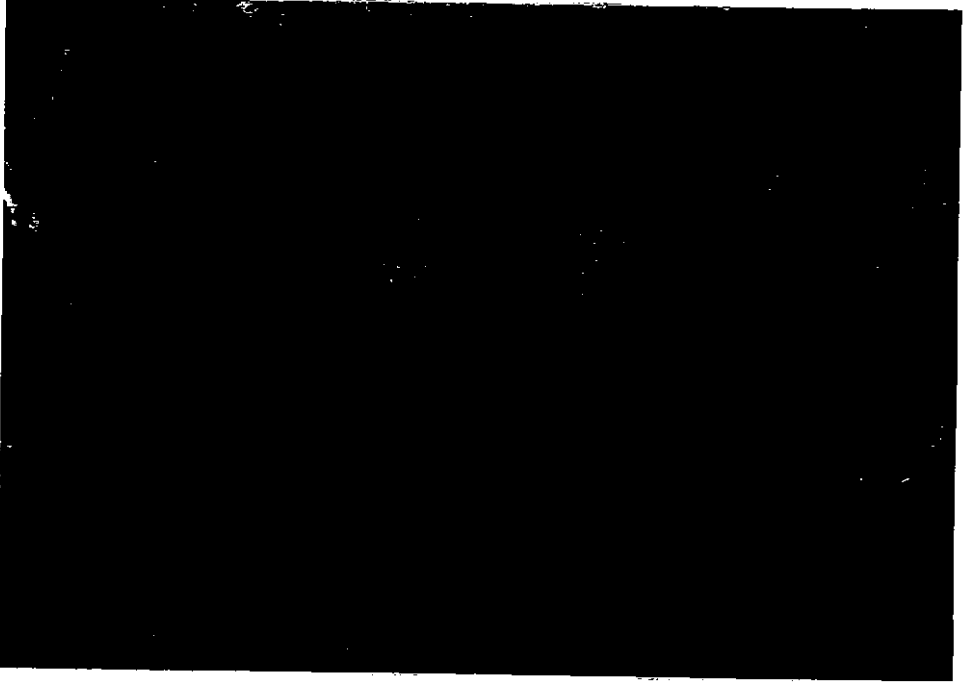
**Resim-13:** Grup III'de kırıktan sonra 14. günde kemik spikülü (K.S) ile devam eden bağ dokusu (B) elemanlarından oluşan periost (P) reaksiyonu görülmekte, kemikleşme görülmemektedir (M-TX100).



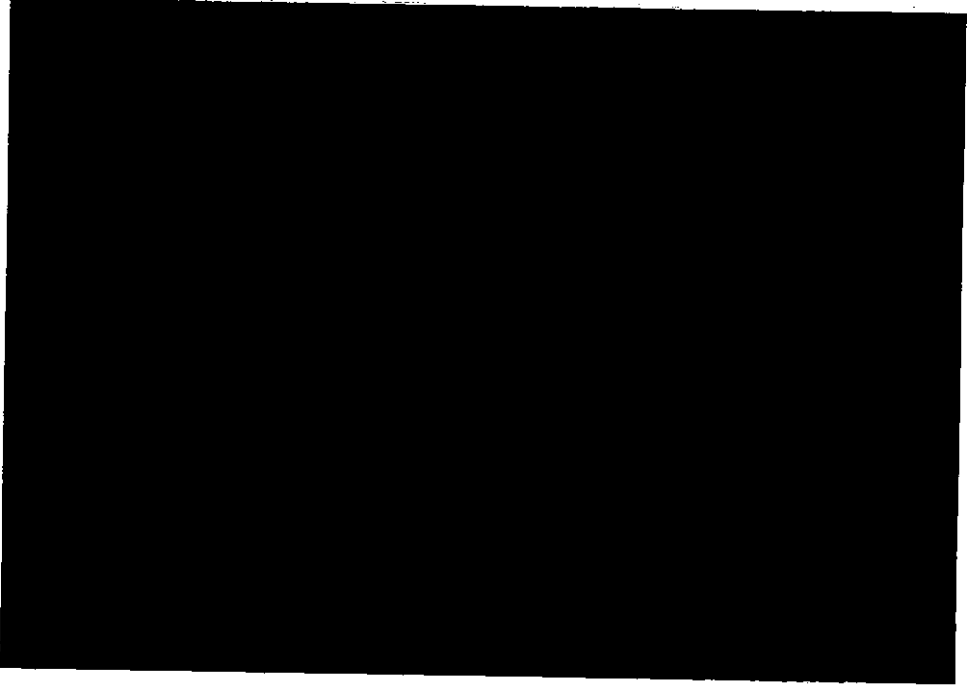
**Resim-14:** Grup II'de kırktan sonra 21. günde mavi renkli kemik spiküllerine (K.S) zemin oluşturan kollagen doku (KOL) görülmektedir (M-TX100).



**Resim-15:** Grup III'de kırktan sonra 21. günde kemik spikülü (K.S) ile devam eden periost (P) reaksiyonunda bağ dokusu (B) ve kıkırdak (K) metaplazi alanı görülmekte, kemik dokusu görülmemektedir (M-TX200).



**Resim-16:** Grup II'de kırktan sonra 28. günde birbirleriyle ağzlaşan kemik spiküllerinde (K.S) mavi renkli kollagen doku (KOL) ve üzerinde mor renkli (Ok) kalsifikasyon alanları görülmektedir (M-TX100).



**Resim-17:** Grup III'de kırktan sonra 28. günde kemik spikülü (K.S), periost (P) reaksiyonu görülmekte, reaksiyon alanında belirgin kırkdak (K) oluşumu dikkat çekmektedir (M-TX40).



## TARTIŞMA

Bir kırığın tamiri, farklılaşmamış osteokondral progenitör hücrelerin olgun osteoblastlara ve kondrositlere dönüşümüne ihtiyaç duyan kemik dokunun sentezini gerektirir. Klinik olarak başarılı bir kırık tamiri, kemiğin hasarlı uçları arasındaki boşluğu dolduran ve kemiğe uygulanan yüke dayanmak için gerekli kuvvete sahip, yeni kemik matriksinin oluşumuna ihtiyaç duyar. Bu süreç, zedelenmenin lokal ve sistemik etkilerine cevap veren osteokondral progenitör hücrelerin mobilizasyon, replikasyon ve farklılaşmasını gerektirir (26).

Tamir süreci için, hücresel cevabın önemi iyi bir şekilde gösterilmiştir. Fakat progenitör hücrelerin kaynakları hala tartışmalıdır. 1800'lerin ortasında Dupuytren(45), kırık kallusunun, periosttan ve kemik iliğinden köken aldığını ileri sürmüştür. Her ne kadar osteokondral progenitör hücreler (OPH)'in kemik ile ilişkili olduğu tahmin edilmekteyse de; kemik, progenitör hücrelerin sınırlı bir kaynağı olabilir. OPH'lerin kemik dışı dokularda da bulunduğunu destekleyen deliller mevcuttur. Bir yumuşak doku travması sonrasında, quadriceps femoris adalesi gibi bölgelerde heterotopik ossifikasyonun oluşumu, muskuler dokuda da progenitör hücrelerin varlığını destekler. Bazı yazarlar, perivasküler mezenkimal hücrelerin ve hatta dolaşımdaki mezenkimal hücrelerin, kırık tamiri için önemli olduğu teorisini ileri sürmüşlerdir. Günümüzde, kırık kallusunda osteoblastlara veya kondrositlere farklılaşmak için tahsis edilen progenitör hücrelerin kaynağı, tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, periosteal hücreler ve ilik hücreleri tamir sürecine katkıda bulunmaktadır.

Kırık iyileşmesinde matür kemiğin yeniden oluşması için osteoblastların, köken aldıkları mezenkimal dokudan proliferasyonu ve farklılaşması gerekir. Bu da ancak mitoz varlığında gerçekleşir. Bir hücre siklusunda mitozu  $G_2/M$  fazı gösterir. Akım sitometri tekniğinde DNA analizi yapılarak  $G_0/G_1, G_2, M$  ve  $S$  fazları tayin edilebilir.  $G_2/M$  fazı, DNA miktarının iki katına çıkıp mitozun gerçekleştiği fazdır. Akım Sitometri, dakikada 10.000-1.000.000 hücreyi birçok özellik açısından tarayarak, verileri analiz eden bir sistemdir. Ancak, hücre örneklerinin hazırlanması en önemli aşamalardan birisidir.

Hücrelerin tek tek dağılabildikleri bir süspansiyon halinde olmaları şarttır. Kullanılacak örnek, taze veya parafinde bloklanmış dokular olabilir. Taze dokuların akım sitometrik analizde avantajı, düşük CV (Coefficient of variation) değeri olan çalışmalar elde edilmesidir. Akım sitometrik analiz yapılacak hücre süspansiyonlarında yeterli oranda hücre bulunması gereklidir. Bu tip çalışmalarda, 10.000-30.000 hücre arası yeterli bulunmaktadır. Akım sitometrik analizlerde, CV değerlerinin %10'u aşması çalışmanın güvenilirliğini bozan bir göstergedir(43,44). Çalışmamızda, taze dokular kullanılmıştır; her örnekten en az 10.000 hücre sayılmıştır ve CV değerlerimiz, %10 değerinin altındadır (4,46-8,93).

Uzun süreden beri, kırık iyileşmesi ile ilgili deneysel çalışmalarda popüler model olarak ratlar kullanılmaktadır. Rat'ın, femur, radius, ulna ve tibiası kırık modeli olarak kullanılabilir. Kapalı kırıkların tedavisinde fiksasyon olmadan immobilizasyonla da tedavi rapor edilmiştir. Birçok biyolojik, mekanik, biyomekanik ve moleküler biyolojik çalışmalar bu modellerde yapılmıştır. Çünkü rat, fareden daha büyük bir modeldir. Mekanik testler kolaydır. Hayvan başına daha çok spesmen alınabilir. Büyük grup çalışmaları için iyi sonuç alınabilen ve ucuz elde edilebilen hayvanlardır(46). Bu amaçla çalışmamızda Sprague-Dawley cinsi ratlar kullanılmıştır.

Hazırlanan histopatolojik spesmenlerin boyanmasında, bağ dokusu elemanlarını daha iyi göstermesinden dolayı, klasik Hematoxylin-Eosin (H.E) boyası yerine Masson's Trichrome (M.T) boyama yöntemi kullanılmıştır. H.E.'de, kas ve kollagen benzer boyandığından dolayı ayırımları zor olmaktadır (47).

Birçok araştırmacı, serbest bir radikal olan NO'in, kemik metabolizmasında dengeleyici bir molekül olarak rol oynadığı ve kemik metabolizmasının otokrin-parakrin düzenleyicisi olarak hareket ettiği görüşündedir (3-6).

Moleküler ve hücrel mekanizmalar tam olarak açığa kavuşmamasına rağmen, ortak noktalar ve mekanizmalar içeren yara ve kırık iyileşmesinde, NO'in erken enflamatuar dönemde rol oynadığı saptanmıştır (48). Yara iyileşmesinde de, PNL'ler yarada arginin metabolizmasını başlatırlar. L-Arginin' den NOS aracılığıyla üretilen NO, enflamatuar fazın (ilk üç gün) bazı olaylarına mediatörlük yapar. Kırık iyileşmesinde, yaralanmadan hemen sonra başlayan enflamasyon aşamasında, trombositlerden, ölü ve hasarlı hücrelerden salınan mediatörler, vazodilatasyona ve plazma eksudasyonuna neden

olur. Bu şekilde, kırık bölgesinde akut ödem oluşur. Bölgeye ilk göç eden enflamatuar hücrelerden olan PNL'leri, makrofaj ve lenfositler takip eder. Bu hücreler, ayrıca damar oluşumunu da uyaran sitokinleri salgılar. Birçok kemik hücresinde, sitokin stimülasyonuna cevap olarak i.NOS üretimi uyarılabilir (16,17). Değişik hücre tipleri, sitokin stimülasyonundan sonra NO üretimi için değişik yetenektedir (15). Fizyolojik düzeyde NO'in, damar tonusunu düzenlediği, mikrovasküler sistemi yaralanmaya karşı koruduğu düşünülmekte ve endojen NOS aktivitesinin invivo damar oluşumu için kritik olduğu ileri sürülmektedir (48). Bir başka çalışmada ise, kırık bölgesinde NO kaynaklı bir damarsal cevabın olduğu, bunun erken iyileşme döneminde en üst düzeye çıktığı ve bu etkinin damarlar içinde NO üretilmesine bağlı lokal bir etki olduğu sonucuna varılmıştır (49). Yüksek NO konsantrasyonu, kemik rezorpsiyonunu inhibe ederken, düşük konsantrasyonu ise osteoklast fonksiyonu için gereklidir (16).

Kemik oluşumu ve osteoblast fonksiyonunda, NO'in etkileri, kemik rezorpsiyonundaki kadar açık değildir. Her ne kadar osteoblast proliferasyonu veya genel olarak osteoblastta NO'in direkt etkisi gösterilmese de, birçok otör, osteoblast proliferasyonu ve metabolizmasında NO'in rolü olduğu görüşündedir (3). NO'in basal üretiminin, osteoblast gelişiminde ve sitokin üretiminde otokrin stimülatör etki gösterdiği bilinmektedir (25). Ancak, yüksek miktardaki NO konsantrasyonu, osteoblast gelişimi ve farklılaşmasında potent inhibitör etkiye sahiptir (22). Literatürde, NO metabolitleri olan NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub>'ün ratlardaki değerleriyle ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Bu yüzden öncelikli olarak deneyde kullandığımız ratların bazal NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub> değerleri tespit edildi (Tablo-14). Kırık oluşturulan, ancak L-Arginin verilmeyen Grup II'nin NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub> değerleri, Grup I ile karşılaştırıldığında; 1,3,7,10,21 ve 28. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. Yani kırık iyileşmesinin fizyolojik sürecinde, bazal NO miktarı, 3. ve 10. günde pik yapmak üzere artıyordu. Grup III'de ise, Grup I ile karşılaştırıldığında 1,3,5,7,10,14 ve 28. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. 1. günden itibaren belirgin şekilde artan NO, 3. günde pik yaptıktan sonra azalarak 21. günde bazal seviyesine indi. Grup II ile Grup III, karşılaştırıldığında ise 1,3 ve 5. günlerde Grup III lehine olan NO seviyesi, 7,10 ve 21. günlerde Grup II lehine istatistiksel olarak anlamlı tespit edildi. 28. günde ise iki grup arasında istatistiksel bir fark tespit edilemedi(Tablo-16,20,21,22).NO'in, kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde artmaya başlaması ve ilk 3günde pik seviyelere ulaşması,literatürdeki mevcut bilgilerle uyumlu bulundu.

Lindholm ve arkadaşları (50); kemik iliği hücre aspiratları ile demineralize kemik matriksinin bir kombinasyonunun, otojenöz kemik veya komponentlerden yalnızca biri ile elde edilenden daha hızlı ve stabil bir füzyon sağladığını bulmuştur. Curylo ve arkadaşları (51); tavşanda posterolateral spinal füzyon modelinde, kemik iliğinin otojenöz kemik greftine ilave edildiğinde şekillenen yeni kemiğin kantitesinin daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Grundel ve arkadaşları (52) ise; ilik aspiratı ve bifazik kalsiyum fosfat seramiği kombinasyonunun, tavşan ulnasında gap bulunan olgularda bile etkili kaynama sağladığını göstermişlerdir. Bu çalışmaların olumlu sonuçlarını, ilik aspiratlarındaki osteoprogenitör hücrelerin varlığına bağlamışlardır. Takagi ve Urist (53); sıçanlarda geniş femoral gaplı defektleri tedavi için, kemik morfogenetik proteini ve kemik iliği aspiratı kullanmış ve yüksek kaynama oranları bildirmişlerdir. Paley ve arkadaşları (54); hayvan modellerinde kemik defektlerinin perkutanöz kemik iliği greftlemesi ile yararlı etkilerini göstermişlerdir. Herhangi bir büyüme faktörü veya taşıyıcı olmaksızın bir ortotopik bölgede başarılı kaynamanın sağlanabileceğini de göstermişlerdir. Werntz ve arkadaşları (55); deneysel bir sıçan femoral shaft defekti modeline, kemik iliğinin ilavesi ile kemiğin başarılı bir şekilde kaydığını fakat, tekrarlayan dondurup-eritmelerle hücreleri lizise uğramış ölü iliğin injeksiyonuyla, belirgin kemik tamiri etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

Connolly ve arkadaşları (56); tibial non-union tedavisinde, kırık bölgesine perkutanöz olarak otolog kemik iliği injekte ederek ve alçıda immobilize hastaların %80'inde ve intrameduller fiksasyonlu hastaların %100'ünde kaynamayı tespit etmişlerdir. Kemik iliği injeksiyonunun, tibial non-union tedavisinde otolog kemik greftlemesi kadar etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda, meduller dokuların akım sitometrik analizlerinde; Grup I'de, %G<sub>2</sub> 4,05±0,87 olarak tespit edildi. Grup II'de, 3. günde (6,73±0,83), 5. günde (18,72±2,58), 10.günde (8,16±1,50) ve 21.günde (4,80±2,05) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, Grup II lehine mitotik aktivitede bir artış vardı. Bu mitotik artış, erken kırık iyileşmesi döneminde başlayıp, 5.günde pik seviyesine ulaştıktan sonra, 21.günde normal değerine döndü. Grup III'de ise, sadece 5.günde (10,92±1,57) istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardı. Hatta 10.günde (2,70±1,54) ve 21.günde (3,15±2,21) istatistiksel anlamlılık Grup I'in, yani kontrol grubunun lehine idi. Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında ise, 3,5,10 ve 21.günlerde gruplar arası farklılık, istatistiksel anlamlılık düzeyinde Grup II'nin lehine bulundu (Tablo-6,10). Bu bilgiler doğrultusunda,

literatürle uyumlu olarak, kemik iliği hücrelerindeki bu mitoz oranlarındaki yüksek değerler, kırık iyileşmesinin erken döneminde, kemik iliğinin en aktif doku olduğunu desteklemektedir. Grup III'ün mitoz değerlerindeki inhibisyon, muhtemelen lokal NO konsantrasyonundaki yüksek değerlerin bir sonucudur.

Owen ve Friedenstein (57); izole edilmiş periosteal kökenli hücrelerin, *invivo* reimplantasyonunda osteojenik ve kondrojenik potansiyel taşıdıklarını göstermişlerdir.

Alpar (58); otoradyografik çalışmasında, periostta 1. günde başlayan, 3. günde pik yapan, 5. günde periost reaksiyonunun pikiyle devam eden, trityumlu timidinle işaretlenmiş osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonunu tespit etmiş ve bunun 16. güne kadar azalarak devam ettiğini rapor etmiştir. Çalışmamızda, periosteal dokuların akım sitometrik analizlerinde; Grup I'de, %G<sub>2</sub> 2,62±1,42 olarak tespit edildi. Grup II'de, 5. günde (9,18±2,43) Grup II lehine mitotik aktivite artışı vardı. Grup III'de de 5. günde (5,12±0,53) Grup III lehine anlamlı bir mitoz tespit edildi. Grup III'de, 1,7 ve 28. günlerdeki istatistiksel anlamlılık Grup I lehine idi. Yani kontrol grubunda, bu günlerde daha fazla mitotik aktivite vardı. Grup II ile Grup III , karşılaştırıldığında ise 5,7 ve 10. günlerde Grup II lehine anlamlı istatistiksel artış vardı. Kırık oluşturulduktan sonra erken iyileşme döneminde periostta belirgin bir mitotik aktivite artışı yoktu. Grup II'de, 5,7 ve 10.günlerde Grup III'e göre istatistiksel olarak anlamlı mitotik aktivite artışı tespit edilmesine rağmen, bu oranlar Grup I ile karşılaştırıldığında sadece 5. gündeki mitoz artışı anlamlıydı(Tablo-8,12). Mitozdaki bu artış, histolojik preparatlarda da belirgindi. Kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde, Alpar'ın çalışmasında tespit ettiği kadar periosteal bir mitotik aktivite çalışmamızda tespit edilemedi. Ancak, 5.gündeki periosteal reaksiyondaki pik, çalışmamızda, hem akım sitometrik hem de histopatolojik olarak aynı çizgideydi.

Alpar(58); 4. güne kadar kortekste trityumlu timidinle işaretlenmiş hiçbir hücre tespit edilemediğini, 4. günden sonra korteksin yüzeyel kısmında işaretlenmiş osteoblastlar gözlendiğini ve bunun 20. güne kadar devam ettiğini, korteksin diğer kısımlarında ise hiç aktivite görülmediğini rapor etmiştir. Çalışmamızda, kortikal dokuların akım sitometrik analizlerinde, Grup I'de, %G<sub>2</sub> oranı 1,22±1,31 olarak tespit edildi. Grup I ile Grup II karşılaştırıldığında, Grup II'de sadece 10. günde (5,00±2,62) istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek bir artış tespit edildi. Diğer günlerde anlamlı bir fark yoktu. Grup I ile Grup III karşılaştırıldığında ise, 5. günde (3,10±2,03) ve 28. günde (2,97±0,61) istatistiksel

olarak anlamlı bir artış vardı. Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında 5. ve 28. günlerde Grup III lehine, 10. ve 21. günlerde Grup II lehine istatistiksel anlamlılık vardı(Tablo-7,11). Kortikal dokularda, kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde Alpar'ın çalışmasına paralellik gösterecek şekilde, bir mitotik aktivite tespit edemedik.

Alpar(58) ; eksternal yumuşak dokularda çok az hücrede otoradyografik tanecik tespit etmiş ve bunların osteoblasta farklılaşmadığını rapor etmiştir. Urist (59); endomisyum hücrelerinin, osteoblasta farklılaşması sonucu kırıkların iyileştiğini ifade etmiştir. Çalışmamızda, yumuşak dokuların akım sitometrik analizlerinde, Grup I'de, %G<sub>2</sub> oranı  $2,62 \pm 1,42$  olarak tespit edildi. Grup II'de, 5.günde ( $3,72 \pm 1,12$ ) Grup II lehine anlamlı bir artış vardı. Bu oran, 7,10 ve 14. günlerde Grup I lehine anlamlı bir şekilde azalma gösterdi. Grup III'de ise, yine 5. günde ( $3,77 \pm 1,04$ ) anlamlı bir artış varken, 21 ve 28. günlerde bu oran Grup I lehine azalma gösterdi. Grup II ile Grup III , karşılaştırıldığında ise, 7,10 ve 14.günlerde Grup III lehine bir mitotik aktivite artışı varken, 21 ve 28. günlerde bu oran Grup II lehine oldu(Tablo-9,13). Yumuşak dokuların akım sitometrik incelemesinde, kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde, bir mitotik aktivite artışı tespit edilemezken, geç dönemlerinde de belirgin bir mitozaya rastlamadık.

Grup II ve Grup III'ün yapılan histopatolojik çalışmalarında, Grup II'de, klasik iyileşme süreci aynen tespit edilirken; Grup III'de, 28.günde bile kemikleşmeye rastlanmadı. Her iki grupta da, kırıktan sonraki 1.günde, ışık mikroskopik bulgu olarak kanama alanı dışında bir görüntü yoktu. Grup II'de, 3.günde fibrin oluşumunun görünmesine rağmen, Grup III'de bu bulguya rastlanmadı. Grup II'de, 5.günde geniş bir periost reaksiyonu tespit edildi. Bu periost reaksiyonu alanında kollagen oluşumu başlamıştı. Grup III'de ise, 5.günde periost reaksiyonu henüz yoktu. Grup II'de, 7.günde periost reaksiyonu alanında, kemikleşmeye zemin teşkil eden kollagen birikimi tespit edilirken, Grup III'de ise sadece minimal bir periost alanı vardı. Grup II'de, 10.günde birbirleriyle birleşen kollagen ana çatısı mevcutken, Grup III'de ise periost reaksiyon alanında yalnızca bağdokusu elemanları görülmekteydi. Grup II'de, 14.günde kemikleşme alanında kollagen birikimi geniş alanlar işgal etmekteydi. Grup III'de, periost reaksiyon alanında, halâ bağdokusu elemanları vardı ve kemikleşme yoktu. Grup II'de, 21.günde kemik spiküllerine zemin oluşturan kollagen doku görülürken, Grup III'de ise periost reaksiyon alanında, bağdokusu-kıkırdak metaplazi alanları vardı. Kemik dokusu halen yoktu. Grup II'de, 28.günde birbirleriyle ağzlaşan kemik spiküllerinde, mavi renkli

kollagen doku ve üzerinde mor renkli kalsifikasyon alanları görülmekteydi. Grup III'de, 28.günde belirgin kırık oluşunun olmasına rağmen, kemikleşmeyle ilgili bir bulgu yoktu. Grup III'ün, spesmen alınmadan önce yapılan muayenelerinde, 28.günde bile kırık alanında anormal hareket mevcuttu.

Kırık tamirinde osteokondral progenitör hücrelerin önemi aşikardır. Bu hücrelerin osteoblastlara ve kondrositlere farklılaşması, kırık kallusunda kemiğin ve kartilaj matriksin oluşununun ilk adımıdır. Bu progenitör hücrelerin farklılaşmasının uyarılmasında, birçok sitokin aktif görünmektedir. Normal kırık iyileşmesinde, spesifik etkiler ve etkileşimler henüz aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda, kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde, kemik iliğinin en aktif doku olduğu, periostun ise 5.günden sonra iyileşme sürecine katkıda bulunduğu, akım sitometrik olarak ortaya kondu. Ayrıca, kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde, NO'in çok önemli bir rolü olduğu ve doza bağımlı bifazik etkisinin olduğu görüldü. Baldık ve arkadaşlarının (48) savundukları gibi NO'in iyileşmeyi ve yeni kemik oluşumunu olumlu yönde etkilediğini söylemek çalışmamıza göre her zaman için geçerli olmamaktadır. NO, fizyolojik dozlarının üzerine çıkıldığında kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilemiştir. Çalışmamızda, Grup III'de, 28.günde bile hem kırık bölgesindeki anormal hareket, hem de histopatolojik preparatlardaki bulgular bu görüşü doğrulamaktadır.

Kırıklar, gecikmiş kaynamalar, kaynamamalar, iskelet deformiteleri ve metabolik kemik hastalıklarının tedavilerine ışık tutmak amacıyla, kemik metabolizmasındaki spesifik etkiler ve etkileşimlerin aydınlatılabilmesi için, biyomoleküler düzeyde daha birçok çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

## SONUÇLAR

Normal kırık iyileşmesinde, spesifik etkiler ve etkileşimler henüz aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda :

1-Kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde, en aktif dokunun kemik iliği olduğu,

2-Kemik iliğinde, kırık olmadan bile mitotik aktivitenin mevcut olduğu ve bu aktivitenin kırık oluştuktan hemen sonra hızla arttığı,

3-Periosteal dokudaki mitotik aktivite artışının 5.günde başladığı,

4-Kırık iyileşmesinde, kortikal ve eksternal yumuşak dokularda anlamlı bir mitotik aktivitenin bulunmadığı ,

5-Kemik mikroçevresindeki NO üretiminin, normal kemik fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir rol oynadığı,

6-NO'in, kırık iyileşmesi üzerinde, belkide osteoblast proliferasyonunda, bifazik etkisinin olduğu; Yani basal seviyede stimülatör etki gösterirken, yüksek miktarlarda osteoblast gelişimi ve farklılaşmasında potent inhibitör etkiye sahip olduğu,

7-Akım sitometrik çalışmaların, histopatolojik çalışmalardan daha detaylı ve daha çabuk sonuç vermelerine karşılık, maliyetlerinin oldukça pahalı olduğu tespit edilmiştir.



## ÖZET

Kırık iyileşmesinde NO'in etkileri, ratların tibialarında deneysel kırık modeli oluşturularak, biyokimyasal, akım sitometrik ve histopatolojik olarak çalışıldı. Çalışmada, ortalama ağırlıkları 170gr. (150-200gr.) olan 8 haftalık 152 adet rat kullanıldı. 8 rat kontrol grubu olarak ayrıldı(Grup I). Grup II ve Grup III, herbir alt grupta 9 rat olacak şekilde 8 gruba ayrıldı. Grup II'deki ratlara anestezi altında tibialarında kırık oluşturuldu. Grup III'deki ratların içme sularına kırık oluşturulmadan iki hafta önce 2gr./dl. olacak şekilde L-arginin konuldu. Kırık oluşturulduktan sonra da aynı miktarda L-arginin verilmeye devam edildi. Grup II ve Grup III'ün kırıktan sonraki 1,3,5,7,10,14,21 ve 28. günlerde akım sitometrik, biyokimyasal ve patolojik incelemeleri yapıldı. Grup I'in de akım sitometrik, biyokimyasal ve patolojik incelemeleri yapılarak, gruplararası karşılaştırmalar yapıldı.

Kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde, akım sitometrik olarak, en aktif dokunun kemik iliği olduğu, kemik iliğinde, kırık olmadan bile mitotik aktivitenin mevcut olduğu ve bu aktivitenin kırık oluştuktan hemen sonra hızla arttığı tespit edildi. Periosteal dokudaki mitotik aktivite artışının 5.günde başladığı, kırık iyileşmesinde, kortikal ve eksternal yumuşak dokularda anlamlı bir mitotik aktivitenin bulunmadığı görüldü. Grup III'de, kırıktan sonraki 28.günde bile klinik ve histopatolojik kaynama tespit edilemedi.

Ayrıca, kemik mikroçevresindeki NO üretiminin, normal kemik fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir rol oynadığı ve NO'in, kırık iyileşmesi üzerinde, belkide osteoblast proliferasyonunda, bifazik etkisinin olduğu; yani basal seviyede stimülatör etki gösterirken, yüksek miktarlarda osteoblast gelişimi ve farklılaşmasında potent inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edildi.

## SUMMARY

The effects of NO on fracture healing were studied biochemically, flow cytometrically and histopathologically on tibia of rats by forming experimental fracture model. In this experimental study, 152 rats 8-week-old and weighing 150 to 200g.(average 170g.)were used. Eight rats were separated for control group(Group I). Group II and Group III were divided into 8 subgroups and each subgroup contained 9 rats. Under anesthesia, fractures were formed on tibia of rats. In Group III, L-arginine (2g./dl.) was added to drinking water of rats two weeks before the fracture was formed. After fracture formation the same dose of L-arginine was added. In group II and III, flow cytometric, biochemical and pathological studies were done on 1,3,5,7,10,14,21 and 28.th days after the fractures were formed. Also in Group I, flow cytometric, biochemical and pathological studies were done at the same days and all of the groups were compared.

In early period of fracture healing, the most active tissue was bone marrow and in bone marrow mitotic activity was also present without fracture and increased activity was determined immediately after the fracture. In periosteal tissue increased mitotic activity was started in 5.th days. In cortical and external soft tissue, there were no significant mitotic activity in fracture healing. In the Group III rats, no union was determined clinically and histopathologically after 28.th days of fracture.

Also NO production in bone microenvironment plays an important role in normal bone physiology and physiopathology. We determined that NO has biphasic effect on fracture healing, perhaps on osteoblast proliferation. So it has stimulatory effect in basal levels, and potential inhibitory effect in increased levels on osteoblast growth and differentiation.

## KAYNAKLAR

- 1- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR and Recker R: Bone biology. *J Bone Joint Surg.* 77-A: 1276-1289, 1995.
- 2- Favus MJ: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Second ed., Lippincott-Raven, New York, pp. 1-37, 1993.
- 3- Danziger RS, Zuckerbraun BS and Pensler JM: Role of nitric oxide in the regulation of osteoblast metabolism. *Plast Reconstr Surg.* 100:670-673, 1997.
- 4- Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Haza I, Haza K, Yamamoto K, Ishii Y, Muramatsu I and Sudo M: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol.* 270:840-845, 1996.
- 5- Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Krukowski M, Misko TP, Settle SL, Curvie MG and Nickols GA: Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci. USA* 91: 3569-3573, 1994.
- 6- Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H and Ralston SH: Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res.* 12: 1108-1115, 1997.
- 7- Riley RS, Mahin EJ and Ross W: Clinical application of flow cytometry. First ed., Igaku Shoin Medical Publishers Inc., New York, 1990.
- 8- Ralston SH: Nitric oxide and bone: What a gas!. *Br J Rheumatol* 36: 831-838, 1997.
- 9- McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR and Moncada S: Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. *Biochem J.* 261: 293-296, 1989.

- 21- Moncada S and Higgs A: The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329: 2002-2012, 1993.
- 22- Damoulis PD and Hauschka PV: Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 201:924-931, 1994.
- 23- Van't Hof RJ and Ralston SH: Cytokine induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res.* 12: 1797-1804, 1997.
- 24- Gowen M: Cytokines and bone metabolism. Vol. 1, Boca Razon, FL: CRC Press, 1-407, 1992.
- 25- Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernandez-Luna JL and Gonzales-Macias J: Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 10: 439-446, 1995.
- 26- Bolander ME: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 200: 165-170, 1992.
- 27- Yoo JU and Johnstone B: The role of osteochondral pregenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop.* 355: 73-81, 1998.
- 28- Einhorn TA, Majeska RJ and Rush EB: The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res.* 10: 1272-1281, 1995.
- 29- Quarto R, Thomas D and Liang CT: Bone progenitor cell deficits and age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int.* 56: 123-129, 1995.
- 30- Goshima J, Goldberg VM and Caplan AI: The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop.* 262: 298-311, 1991.
- 31- Nakahara H, Goldberg VM and Caplan AI: Culture expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clin Orthop.* 276: 291-298, 1992.

- 32- Yasko AW, Lane JM and Fellingner U: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg.* 74-A: 659-671, 1992.
- 33- Canalis E, McCarthy TL and Centrella M: Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annu Rev Med.* 42: 17-24, 1991.
- 34- McCarthy TL, Centrella M and Canalis E: Regulatory effects of insulin-like growth factor I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology.* 124: 301-309, 1989.
- 35- McCarthy TL, Centrella M and Canalis E: Cyclic AMP induces insulin-like growth factor I synthesis in osteoblast-enriched cultures. *J Biol Chem.* 265: 15353-15356, 1990.
- 36- Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB and Bolander ME: Transforming growth factor- $\beta$  and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol.* 110: 2195-2207, 1990.
- 37- Asahina I, Sampath TK and Hauschka PV: Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and / or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res.* 222: 38-47, 1996.
- 38- Canalis E, Centrella M and McCarthy TL: Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest.* 81: 1572-1577, 1988.
- 39- Canalis E, McCarthy TL and Centrella M: Effects of platelet -derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol.* 140: 530-537, 1989.
- 40- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD and Mundy GR: Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature.* 319: 516-518, 1986.
- 41- Mont MA, Jones LC, Einhorn TA, Hungerford DS and Reddi AH: Osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop.* 355: 314-335, 1998.

- 42- Kumagai and McGuire MH: Cellular and molecular biology. In Surgery For Bone and Soft-Tissue Tumors, M.A Simon and D. Springfield (Eds). Lippincott-Raven, 1998, pp. 9-20.
- 43- Koss LG: Flow cytometry. In Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases, Koss LG (Ed) Vol 2, 4th ed, Philadelphia. JB Lippincott Company, 1992, pp. 1613-1657.
- 44- Riley RS, Mahin EJ and Ross W: Clinical application of flow cytometry. First ed. Igaku Shoin Medical Pub Inc, New York, 1990.
- 45- Dupuytren C: On the injuries and diseases of bones: Being selections from the collected edition of the clinical lectures of Baron Dupuytren. In Le Gros Clark F (ed and translator). London, Sydenham Society, 1847.
- 46- Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. Clin Orthop. 355:56-65, 1998.
- 47- Elder D and Elenitsas R: Histopathology of the Skin. 8th ed Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Chapter 4:46, 1990.
- 48- Baldık Y, Talu U, Altinel L, Bilge H and Toker GA: Nitrik oksitin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisinin radyolojik incelenmesi: Sıçanlarda deneysel çalışma. Acta Orthop Traumatol Turc. 34:190-197, 2000.
- 49- Corbett SA, McCarthy ID, Batten J, Hukkanen M, Polak JM and Hughes SF: Nitric oxide mediated vasoreactivity during fracture repair. Clin Orthop. 365:247-253, 1999.
- 50- Lindholm TS, Ragni P and Lindholm TC: Response of bone marrow stroma cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits. Clin Orthop. 230:296-302, 1988.
- 51- Curylo LJ, Johnstone B and Petersilge S: Autogenous bone marrow augmentation of spinal fusion in a rabbit posterolateral fusion model. Trans Orthop Res Soc. 22:356, 1997.

- 52- Grundel RE, Chapman MW, Yee T and Moore DC: Autogeneic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. *Clin Orthop*.266:244-258,1991.
- 53- Takagi K and Urist MR: The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects.*Clin Orthop*.171:224-231,1982.
- 54- Paley D,Young MC and Wiley AM: Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects:An experimental study in rabbits. *Clin Orthop*. 208:300-312,1986.
- 55- Werntz JR, Lane JM and Burstein AH: Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res*. 14:85-93,1996.
- 56- Connolly JF, Guse R, Tiedeman J and Dehne R: Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunion. *Clin Orthop*. 266:259-270,1991.
- 57- Owen ME and Friedenstien AJ: Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*.136:42-60,1988.
- 58- Alpar EK: Kırık iyileşmesinde hücre orijini ve diferansiyasyonunun trityumlu timidin otoradyografisi ile deneysel olarak incelenmesi. Doçentlik tezi,Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,Ankara,1975.
- 59- Urist MR and Dawson E: Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogeneic (AAA) bone. *Clin Orthop*. 154:97-113,1981.