



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA OMEGA-3 POLİANSATÜRE YAĞ ASİTLERİ
VE D VİTAMİNİNİN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Yasin YALÇIN

KAYSERİ-2017



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA OMEGA-3 POLİANSATÜRE YAĞ ASİTLERİ
VE D VİTAMİNİNİN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Yasin YALÇIN

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Halil KAFADAR

Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2016-6577 numaralı proje kodu ile desteklenmiştir.

KAYSERİ-2017

TEŞEKKÜR

Oldukça uzun, yorucu, çok emek ve sabır isteyen süreçte her zaman yanımda bulunarak bana sonsuz destek olan sevgili eşime ve aileme, deneyimlerini, bilgilerini benimle paylaşan ve yetişmemde büyük katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Mahmut Argün'e, Prof. Dr. Cemil Yıldırım Türk'e, Prof. Dr. Mahmut Mutlu'ya, Prof. Dr. Mehmet Halıcı'ya, Doç. Dr. Mithat Öner'e, Prof. Dr. Ahmet Güney'e, Doç. Dr. İbrahim Karaman'a ve bu tez çalışmasında desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. İbrahim Halil Kafadar'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca patolojik değerlendirmede yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Hülya Akgün'e, radyolojik değerlendirmede Yard. Doç. Dr. Serap Doğan'a, istatistiki değerlendirmede Dr. Ahmet Timur'a ve son 6 yılımın büyük kısmını beraber geçirdiğim başta asistan arkadaşlarım olmak üzere tüm Ortopedi ve Travmatoloji Bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Yasin YALÇIN

Mart 2017, KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
RESİMLER LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik Yapısı ve Organizasyonu.....	3
2.2. Kemik matriksi	5
2.2.1. Organik bölüm	5
2.2.2. İnorganik Bölüm.....	5
2.3. Kemik Histogenezi (Kemik Oluşumu).....	5
2.3.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu	6
2.4. Kemikğin Hasarlanmaya Yanıtı (Kırık İyileşmesi).....	8
2.5. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler	14
2.5.1. Yerel Faktörler.....	14
2.5.2. Genel Faktörler	15
2.5.3. Kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen faktörler	17
2.5.4. Kırık iyileşmesini olumlu yönde etkileyen faktörler	17
2.6. D Vitamini.....	18
2.6.1. D vitamini metabolizması.....	18
2.6.2. D vitamininin işlevleri	19
2.6.3. D Vitaminin Kemik Metabolizmasındaki Etkileri.....	20
2.6.4. D vitamininin kırık iyileşmesi üzerine etkileri	21

2.7. Esansiyel Yağ Asitleri	21
2.7.1. Omega-3 poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin kaynağı	22
2.7.2. Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin metabolizması.....	22
2.7.3.Omega-3 PUFA'nin uygulanması:	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı	26
3.2. Gruplar.....	26
3.3. Hazırlık ve Operasyon.....	27
3.3.1. Postoperatif Takip.....	27
3.3.2. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmesi	30
3.4. Radyolojik Değerlendirme	30
3.5. Histopatolojik Değerlendirme	31
3.6. Biyomekanik Değerlendirme	32
3.7. Biyokimyasal Değerlendirme.....	33
3.8. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. Radyoloji Sonuçlarının Karşılaştırılması	34
4.2. Histopatoloji Sonuçlarının Karşılaştırılması	40
4.3. Biyomekanik Sonuçların Karşılaştırılması.....	45
4.4. Biyokimyasal Sonuçların Karşılaştırılması	47
4.4.1. Alkalen Fosfataz	47
4.4.2. Kalsiyum.....	47
4.4.3. Fosfor.....	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR	59
KAYNAKLAR	60
TEZ ONAY SAYFASI.....	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	Radyoloji skorlama sistemi	30
Tablo 2.	Histolojik verileri değerlendirmek için Huo ve ark. (85)'nin kullandığı skorlama sistemi	31
Tablo 3.	Grupların radyolojik skorları.....	35
Tablo 4.	Radyolojik skorların grup ortalamaları	35
Tablo 5.	I.grubun histopatolojik skorları	40
Tablo 6.	II. grubun histopatolojik skorları.....	40
Tablo 7.	III. grubun histopatolojik skorları	41
Tablo 8.	IV. grubun histopatolojik skorları	41
Tablo 9.	Gruplar arasında histopatolojik skorların ortalaması	42
Tablo 10.	Grup I ve II' de saptanan biyomekanik sonuçlar ve ortalama değerleri	45
Tablo 11.	Grup III ve IV' de saptanan biyomekanik sonuçlar ve ortalama değerleri ..	46
Tablo 12.	Gruplar arasında biyomekanik skorların ortalaması	46
Tablo 13.	Grupların ortalama ALP değerleri.....	47
Tablo 14.	Grupların ortalama kalsiyum değerleri.	48
Tablo 15.	Grupların ortalama fosfor değerleri.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Öğütülerek çok inceltilmiş kuru kemiğin mikroskopik fotoğrafı. Hava ile dolu, karanlık görünen laküna ve kanalcıklar, birbirleri arasındaki ilişkileri ve kan damarlarından alınan besin madde akışını gösteriyor.	3
Şekil 2.	A: Kortikal kemiği ve süngerimsi kemiğin trabeküler kafes yapısını gösteren kalın kemik kesiti. B: Tipik, gelişigüzel kollajen lif dağılımı sergileyen süngerimsi kemik kesiti	4
Şekil 3.	İntramembranöz kemikleşme. Osteoblastlar hücreleri hapseden kıyı şeridi gibi bir matriks yaparak kollajen sentezler.....	6
Şekil 4.	Hiyalin kırık model üzerinde bir uzun kemiğin meydana gelişi	7
Şekil 5.	Kırık matriks (pembe) kısa bir süre önce şekillenmiş kemik dokusu ile örtülüdür (kırmızı). Yeni kemiğin oluşturduğu boşlukları kemik iliği ve yağ hücreleri doldurur.	8
Şekil 6.	Kırık iyileşmesi süreci.....	9
Şekil 7.	Kemik onarım evreleri	10
Şekil 8.	Kırık Hematomu.....	10
Şekil 9.	Periosttan ve endosteumdan hücre çoğalması ile yeni bir kemik dokusunun oluşumu sayesinde kırık bir kemiğin onarılması	13
Şekil 10.	Vitamin D yolağı.....	19
Şekil 11.	Vitamin D fonksiyonları.....	19
Şekil 12.	Yağ asitlerinin biyosentezi	22
Şekil 13.	Grup I' in osteotomi hattının sakrifikasyon sonrası mikroskopik görünümü	43
Şekil 14.	Grup II' nin osteotomi hattının sakrifikasyon sonrası mikroskopik görünümü	43
Şekil 15.	Grup III' ün osteotomi hattının sakrifikasyon sonrası mikroskopik görünümü	44
Şekil 16.	Grup IV' ün osteotomi hattının sakrifikasyon sonrası mikroskopik görünümü	44

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1.	Cilt insizyonu yapılması.....	28
Resim 2.	Femur distal 1/3 ünün ortaya çıkarılması.....	28
Resim 3.	Testere ile osteotomi işleminin yapılması.....	29
Resim 4.	Kır teli ile tespit sonrası görünüm	29
Resim 5.	Biyomekanik çalışmada kullanılan 3 nokta eğme cihazı	32
Resim 6.	Üç nokta kırma (bending) testinin uygulanışı.....	33
Resim 7.	Grup I deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray AP grafilerin örnekleri	36
Resim 8.	Grup I deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray yan grafilerin örnekleri.....	36
Resim 9.	Grup II deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray AP grafilerin örnekleri	37
Resim 10.	Grup II deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray yan grafilerin örnekleri ...	37
Resim 11.	Grup III deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray AP grafilerin örnekleri...	38
Resim 12.	Grup III deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray yan grafilerin örnekleri ..	38
Resim 13.	Grup IV deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray AP grafilerin örnekleri...	39
Resim 14.	Grup IV deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray yan grafilerin örnekleri..	39

KISALTMALAR

-vb	: ve benzeri
AA	: Araşidonik asit
ALA	: Alfa lineloik asit
ALP	: Alkalen fosfataz
BMP	: Kemik morfojenetik protein
Ca⁺²	: Kalsiyum
CAMP	: Siklik adenzin monofosfat
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EPA	: Eikosapentaenoik asit
EYA	: Esansiyel yağ asidi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
g	: Gram
GLA	: Gama lineloik asit
HE	: Hemotoksilen eozin
IL-1	: İnterlokün 1
KMY	: Kemik mineral yoğunluğu
Kr teli	: Kirschner teli
LTB4	: Lökotrien B4
LTB5	: Lökotrien B5
Mg	: Miligram

ml	: Mililitre
MM	: Milimetre
NF-κb	: Nükleer faktör kapp B
P	: Fosfor
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
PGE-2	: Prostaglandin E2
PGE-3	: Prostaglandin E3
PPARγ	: Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör γ
PTH	: Paratiroid hormonu
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri
RANKL	: Reseptör aktivator nükleer kapp ligandı
SF	: Serum fizyolojik
ss	: Standart Sapma
TNF	: Tümör nekroz faktör
TxA2	: Tromboksan A2
TxA3	: Trobkoksan A3
VDR	: Vitamin D reseptörü
ω3	: Omega 3

**RATLARDA OMEGA-3 POLİANSATÜRE YAĞ ASİTLERİ VE
D VİTAMİNİNİN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

ÖZET

Amaç: D vitamini ile omega-3 poliansatüre yağ asitlerinin deneysel olarak ratlarda kırık iyileşmesi üzerine etkilerini biyokimyasal, histopatolojik, radyolojik ve biyomekanik olarak değerlendirmektir.

Yöntem: Çalışmada 48 adet, erkek, ortalama 400 g ağırlığında Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Denekler rastgele olacak şekilde kontrol grubu (grup I; n=12), vitamin D3 grubu (grup II; n=12), omega-3 poliansatüre yağ asiti grubu (grup III; n=12) ve vitamin D3 + omega 3 poliansatüre yağ asiti grubu (grup IV; n=12) olarak dört gruba ayrıldı. Cerrahi işlemden bir gün sonra kontrol grubu dışındaki gruplar olan; grup II'ye postoperatif 1. günde sadece intramusküler tek doz 50000 IU/kg vitamin D3, grup III'e 300mg/kg omega 3 poliansatüre yağ asiti postoperatif 1. günden itibaren sakrifiye edilene kadar gavaj ile, grup IV'e ise postoperatif 1. günde intramusküler tek doz 50000 IU/kg vitamin D3 ve 300mg/kg omega 3 poliansatüre yağ asiti postoperatif 1. günden itibaren sakrifiye edilene kadar gavaj ile verildi. Preoperatif ve 6. haftanın sonunda biyokimyasal inceleme için 2'şer ml kan alındıktan sonra intrakardiyak potasyum enjeksiyonu ile tüm ratlar sakrifiye edildi ve radyolojik, biyomekanik ve histopatolojik açılardan incelemeler yapıldı.

Bulgular: Radyolojik değerlendirmede en iyi skorlar grup IV'de elde edilmiş olup, grup II ve grup III'de de kontrol grubuna göre kallus yoğunluğunun ve kemikleşmenin artmış olduğu görüldü. İstatistiksel olarak da grup III ve grup IV arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, grup IV ile grup I ve grup II arasında anlamlı farklılık bulundu. Biyomekanik değerlendirmede kontrol grubu ve grup III'de en yüksek skorlar elde edildi. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Histopatolojik değerlendirmede ise en yüksek skorlar grup III ve grup IV'de elde edilmesine rağmen istatistiksel olarak gruplar arasında yine anlamlı bir farklılık bulunmadı. Biyokimyasal değerlendirme sonucunda ise ALP, Ca⁺² açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Sadece P açısından grup II ve III arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.

Sonuç: Omega-3 poliansatüre yağ asitlerinin vitamin D3 ile beraber kullanımının deneysel kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkileri bulunmuştur. İleri dönemlerde klinik çalışmalarla beraber kırık iyileşmesinde omega-3 poliansatüre yağ asitleri ve vitamin D3 kombinasyonu destekleyici bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Omega-3 poliansatüre yağ asitleri, D vitamini, kırık iyileşmesi



COMPARISON OF THE EFFECTS OF OMEGA-3 FATTY ACIDS AND VITAMIN D ON FRACTURE HEALING IN RATS

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study is to evaluate the effects of vitamin D and omega-3 polyunsaturated fatty acids on fracture healing in rats by histopathologically, radiologically, biomechanically and biochemically.

Materials and Methods: In the study 48 male Sprague-Dawley rats were used (mean weight was 400 g). Rats randomized and divided into four groups. Control group (group I; n:12), vitamin D3 group (group II; n:12), omega-3 polyunsaturated fatty acids group (group III; n:12) and vitamin D3 + omega-3 polyunsaturated fatty acids group (group IV; n:12). In group II, we applied single dose of 50000 IU/kg vitamin D3 on postoperative first day. In group III, 300 mg/kg of omega-3 polyunsaturated fatty acids were given to the rats the day after operation until sacrifice by gastric gavage. And in group IV rats received single dose of 50000 IU/kg of vitamin D3 on first day of operation, and also received 300 mg/kg omega-3 polyunsaturated fatty acids by gastric gavage from the first postoperative day until sacrifice. Blood samples were taken 2 ml before the operation, and 2 ml before the sacrifice for biochemical examination. Intracardiac potassium injection was performed for sacrifice. Left femurs of rats used for radiological, biomechanical, and histopathological evaluations.

Results : Best radiological scores obtained in group IV. Group II and group III showed up more callus and bone formation than the control group. There was no statistically significant difference between group III and IV in terms of radiological scores whereas group IV showed statistically significant radiological healing scores than group I and group II. Highest biomechanical evaluation scores obtained in group III and control group but there was no statistically significant difference between each groups. Despite highest histopathological scores obtained in group III and IV, there was also no significant difference between groups. By biochemical evaluation ALP and Ca^{+2} levels showed no significant difference among groups. Only statistically significant difference was found between group II and III in terms of P levels

Conclusion: Combination of omega-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin D3 have positive effects on experimental fracture healing. In the future with additional clinical studies this combination might be used as a supportive treatment option on fracture healing.

Key Words: Omega-3 polyunsaturated fatty acids, vitamin D, fracture healing



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Herhangi bir nedenle kemik bütünlüğü ve devamlılığının kısmen veya tamamen bozulması, ‘kırık’ olarak tarif edilmektedir (1). Kırıklar, tarih boyunca tıbbi bir problem olarak değerlendirilmiştir. Hipokrat’ın tıbbi çalışmalarının çoğunda, yaralanmaların ve özellikle kırıkların tedavisi tariflenmektedir. Kırığın biyolojisi ile ilgili bilgiler büyük oranda 20. yüzyılda artmıştır.

Kırıklar, Ortopedi ve Travmatoloji pratiğinde sık karşılaşılan yaralanmalardan biri olup bu kırıkların azımsanmayacak bir kısmına da majör cerrahi girişimler uygulanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) istatistikleri incelendiğinde; yılda ortalama 33 milyon kas iskelet sistemi yaralanması gözlenmekte ve bu yaralanmaların da 6,2 milyonunda çeşitli kırıklar görülmektedir. Kazalarla oluşan yaralanmalar, ABD’de 1-34 yaş arası ölümlerin en sık sebebidir ve 34 yaş üstü ölümlerin ise en sık on nedeni arasındadır. 65 yaş üstü erişkinlerde yaralanmaların birçoğunun nedeni ise düşmelerdir. Düşmeler; yaşlı hasta grubunda, hastaneye başvuru sebepleri arasında en sık karşılaşılanlardan biridir ve kırıkların % 87’si bu sebeple oluşur (2). Günümüzde artan trafik ve iş kazalarının yanı sıra, yaşlı nüfusun artması nedeniyle kırıkların sık görülmesi, kırık iyileşmesini önemli bir sağlık problemi haline getirmiştir. Bu konudaki çalışmalar kırık iyileşmesini hızlandırmak üzerine yoğunlaşmaktadır. Ortopedi kliniklerinde kırık tedavisindeki başlıca hedefler; hastanın bir an evvel gerekli cerrahi ya da konservatif müdahalesinin yapılarak ağrısız hale getirilmesi ve mümkün olan en hızlı şekilde kırık iyileşmesine yardımcı olunarak hastanın mobilizasyonun sağlanmasıdır.

Her geçen gün hastaların kırık iyileşmesiyle ilgili beklentileri artmakta ve buna paralel olarak da kırıkların medikal ve cerrahi tedavisine yönelik geniş ve çok uluslu çeşitli endüstriler gelişmektedir. Bu maksatla günümüzde cerrahi tedavinin yanında kırık iyileşmesini hızlandırmak amacıyla çeşitli etken maddeler üzerinde deneysel ve klinik çalışmalar süregelmektedir.

Literatürde D vitamininin kırık iyileşmesi üzerine etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. D vitamini, normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırdığı, eksikliğinde ise Ca^{+2} düzeyini düşürerek kemik kalsifikasyonunu zayıflattığı, kalsiyumun kemikten kana geçişi yanında kemik hücrelerinde sitrat üretimini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme evresinde de rol oynamaktadır. Sonuç olarak; D vitamini normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırırken, yüksek olan toksik dozlarda olumsuz etki göstermektedir (3).

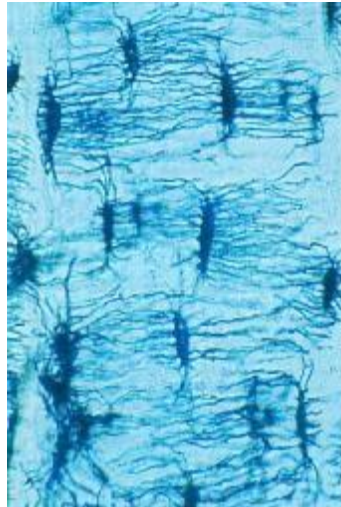
Yine literatürde, omega-3 poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin fareler (4), ratlar (5,6) ve insanlar (7,8) üzerindeki deneylerinde, balık yağı ile omega-3 PUFA'den zenginleştirilmiş diyetin kemik üzerinde kemik mineral yoğunluğu (KMY)'nu arttırdığı, kalsiyum absorpsiyonu ve dengesini sağladığı, kemik yapımını artırıp, yıkım parametrelerini azalttığı gösterilmiştir. Yine başka çalışmalarda deneklere verilen omega-3 PUFA'ndeki yüksek omega-3/omega-6 yağ asiti oranının fareler (9,10), ratlar (11,12) ve insanlar (13) üzerinde kemik doku üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Omega-3 PUFA'nin kırık bölgesindeki kanamayı ve mikro dolaşımı arttırarak kırık iyileşmesinde etkili olan mediatörlerin kırık sahasındaki yoğunluğunu arttırabileceğini ve böylelikle kırık iyileşmesini hızlandırabileceği düşünülmüştür.

Literatürde omega-3 PUFA'nin kırık iyileşmesi üzerine etkisine yönelik bir deneysel çalışma olmadığı da görülmektedir. Bu fikirden yola çıkılarak düzenlenen bu deneysel çalışmada özellikle omega-3 PUFA'nin tek başına ve vitamin D3 ile beraber verildiğinde ratlarda kırık iyileşmesi üzerine olan etkilerinin radyolojik, biyokimyasal, biyomekanik ve histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Yapısı ve Organizasyonu

Organizmadaki diğerk bağ dokularında olduğu gibi kemik dokusu da hücreler, lifler ve temel maddeden oluşmuş ancak yapısındaki kalsiyumdan ötürü sertleşmiş bir destek dokusudur (14). Kemik son derece iyi organize olmuş bir dokudur. Sahip olduğu moleküler, hücreyel yapı ve dokusal düzeni dökme demire yakın gerilme gücü sağlar. Bu özelliğinin yanında üç kat hafiftir ve vücut şeklini destekler. Kemik homojen değildir, matriksi organik ve inorganik yapılardan oluşan hücreler arası madde, hücreler ve kanaliküllerden oluşur (15). Kemikler iskelet sisteminin en önemli yapıtaşdır, kaslarla beraber vücut hareketini sağlarlar ve sertliğinden dolayı hayati önemi olan organların korumasını da üstlenmiştir (14) (Şekil 1).



Şekil 1. Öğütülerek çok inceltilmiş kuru kemiğın mikroskobik fotoğrafı. Hava ile dolu, karanlık görünen laküna ve kanalcıklar, birbirleri arasındaki ilişkileri ve kan damarlarından alınan besin madde akışını gösteriyor.

Kemik dokusu beslenme, metabolik, endokrin ve mekanik koşullara çok duyarlı bir doku olması nedeniyle aktif doku olma özelliğini taşır. Kompakt ve spongiyöz olmak üzere iki ayrı formu olan kemik dokusu organik ve inorganik komponentlerden yapılmıştır.

Kompakt kemik, sıkı dizilimi olan boşluk içermeyen bir dokudur, spongiyöz kemik dokusunun ise gevşek, labirent veya bol boşluklu tarzda bir görünümü vardır (Şekil 2). Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Kemik dokusu kıkırdak dokusunun aksine bol damarlıdır ancak matriksinin sert olması diffüzyona elverişli değildir, dolayısıyla dokunun beslenmesi kanaliküllerle olmaktadır. Bu kanaliküllerin içinde kemik hücreleri yerleşiktir (14).



Şekil 2. A: Kortikal kemiği ve süngerimsi kemiğin trabeküler kafes yapısını gösteren kalın kemik kesiti. B: Tipik, gelişigüzel kollajen lif dağılımı sergileyen süngerimsi kemik kesiti

Kemik dokusu hücreler arası kalsifiye materyal olan kemik matriksi ve dört tür hücreden; mezenkimal kaynaklı mitoz yeteneği olan osteoprogenitör hücreler, matriks içinde laküna adı verilen boşluklarda bulunan osteositler, matriksin organik kısımlarının sentezini yapan osteoblastlar ile kemiğin absorpsiyonu ve yeniden modellenmesinden sorumlu olan çok çekirdekli osteoklastlardan oluşmuştur (15).

Bütün kemiklerin iç ve dış yüzeyleri, kemik yapan ve tamir eden hücreleri içeren, iç yüzeylerde endosteum, dış yüzeylerde periost'un oluşturduğu doku tabakaları ile örtülüdür (16).

2.2.Kemik matriksi

Kemik matriksi organik ve inorganik olmak üzere 2 bölümden oluşur.

2.2.1. Organik bölüm

Bu yapının büyük bölümü kollajen liflerden (%90 Tip 1), protein, lipid ve glikozaminoglikanlardan oluşan temel maddeden (ground substance) yapılmıştır. Gelişmiş bir kemik dokuda lifler paralel ve belirli aralıklarla aralarında porlar bırakacak şekilde yerleşmiş olup aralarında hidroksiapatit kristalleri yerleşiktir (14). Hidroksiapatit kristallerinin yüzeyindeki iyonlar su ile karışıktır ve kristalin etrafında su ve iyon tabakası oluşturur. Hidratasyon kabuğu denilen bu tabaka kristaller ile vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştırır (16).

2.2.2. İnorganik Bölüm

İnorganik maddelerin başında kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum gibi maddeler gelir. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte içiçe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$) kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %65'ini oluşturmaktadırlar (14).

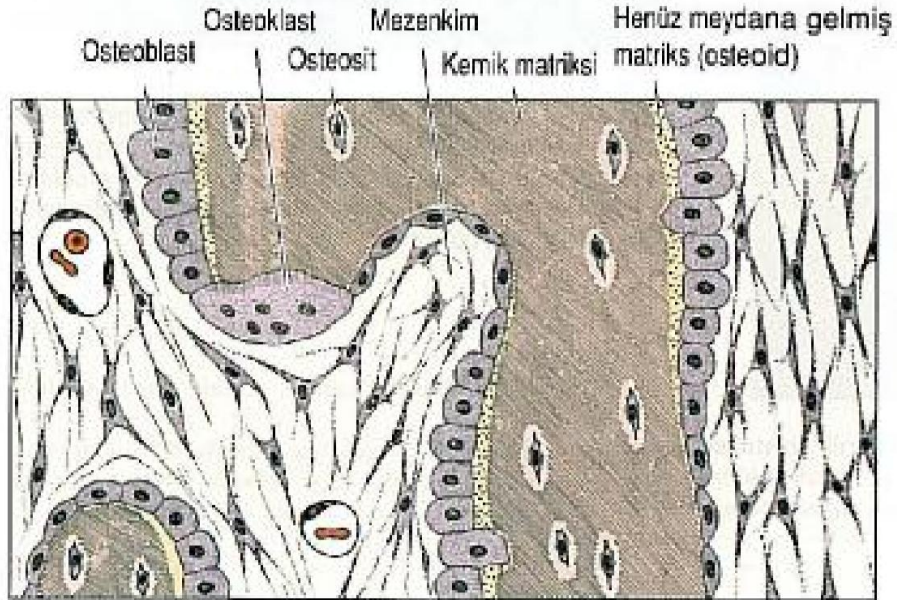
Minerallerin kollajen liflerle ilişkisi, kemik dokusunun sertliği ve direncinden sorumludur. Kemiğin kalsiyumu ortadan kaldırıldığında, şeklini korur, ancak tendon kadar esnek bir hale gelir. Çoğu kollajenden oluşan matriksin organik kısımları çıkarıldığında, kemik yine orijinal şeklini korur, ama kırılabilir hale gelir, dokunulduğunda kırılır ve ufalanır (16).

2.3. Kemik Histogenezi (Kemik Oluşumu)

İntramembranöz ve endokondral olmak üzere iki tür kemikleşme vardır. Bunlardan intramembranöz kemikleşme bağ dokusu, endokondral kemikleşme ise kıkırdak dokunun katılımıyla oluşmaktadır. Kemikleşme hangi türde olursa olsun ilk oluşan kemik dokusu primer kemik yani olgunlaşmamış kemiktir. Oluşan bu primer kemik kalıcı olmayıp yerini esas yani olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır (14).

2.3.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu

Kemiğin bu şekildeki oluşumu bağ dokusu tarafından gerçekleştirilir. Organizmada kafatasını oluşturan frontal, pariyetal, temporal kemikler ile çene bu tür kemikleşmeyle oluşmaktadır. Bu kemiklere membran kemikleri de denmektedir. Kemiğin gelişmesi şu şekilde olmaktadır: Önce mezenkim hücreleri damarlar etrafında toplanırlar ve çoğalırlar, aradaki boşluklar sertleşmemiş matriks ve içindeki kollajen liflerce doldurulmuştur. Mezenkim hücreleri osteoblastlara dönüşebilen hücrelerdir. Bu hücreler hücrelerarası madde ve lif sentezini de yaparak osteositlere farklılaşırlar. Bu bölgeye kemikleşme merkezi adı verilir (Şekil 3).

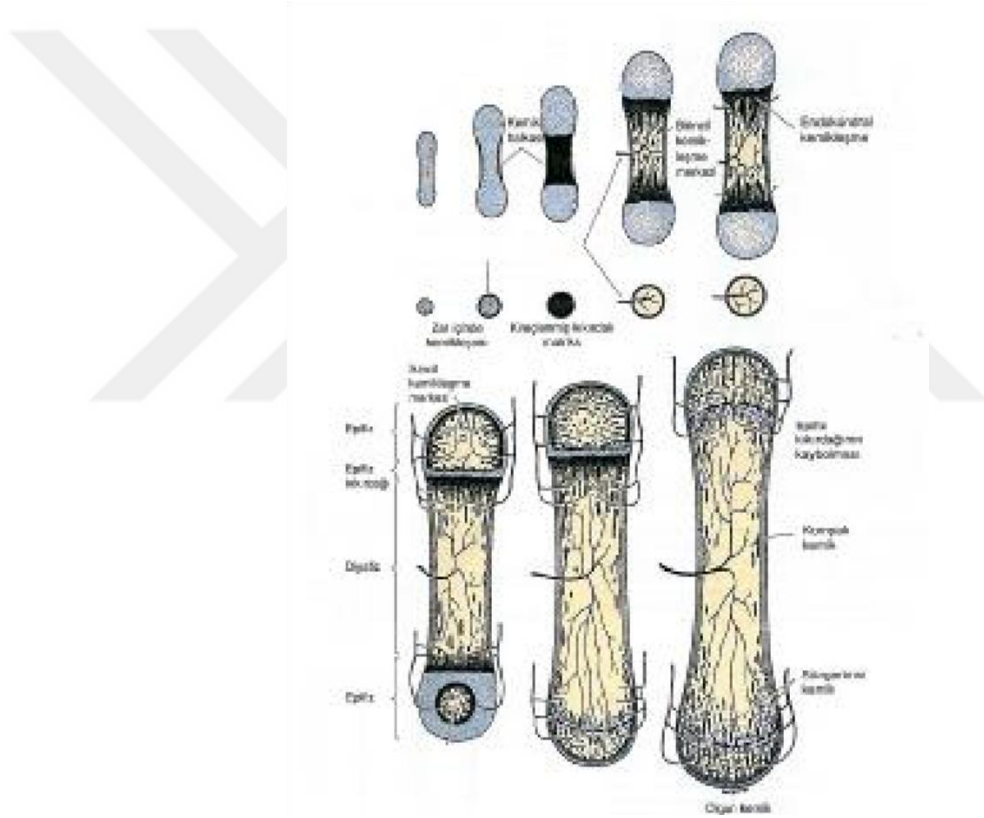


Şekil 3. İntramembranöz kemikleşme. Osteoblastlar hücreleri hapseden kıyı şeridi gibi bir matriks yaparak kollajen sentezler.

Oluşan kemik spongiyöz (trabeküler) yapıdadır ve lamel içermez. Araya henüz kalsiyum bileşikler de çökmemiştir ve osteoid doku adını alır. Damar çevresindeki osteoblastların osteositlere dönüşerek boşalttıkları yerlere arkadan yeni hücrelerin gelmesiyle olayda devamlılık sağlamaktadır. Trabeküller büyür, çoğalır ve anastomozlaşarak spongiyöz kemik dokusu şekillenmiş olur. Bu tür kemikleşmede periosteum ve endosteum kemikleşmeye katılmayan bağ dokusu tarafından yapılmaktadır. Trabeküllerarası boşluklardaki bağ dokusu da kemik iliğinin miyeloid veya hemapoetik dokusuna dönüşmektedir (14).

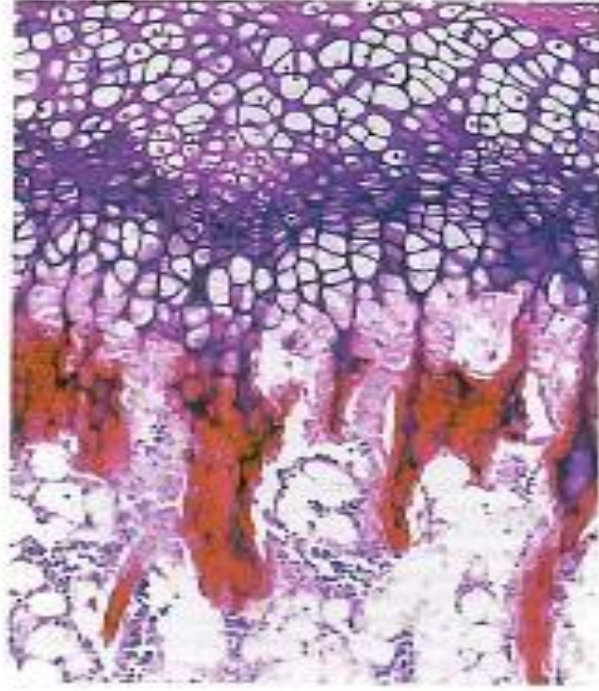
2.3.2. Enkondral Kemikleşme

Bu tür kemikleşmede kıkırdak hücreleri önemli rol almaktadırlar. Özellikle uzun kemiklerin şekillenmesi bu yolla olur. Bu tür kemikleşme esas olarak kıkırdak hücrelerinin özellikle uzun kemiklerin diyafiz bölgesinde birtakım değişimleri şeklinde olmaktadır. Diyafizdeki kemikleşme primer kemikleşmedir ve bölge tamamen kemikleşinceye kadar devam eder. Bunu epifiz bölgesindeki kemikleşme izler ve sekonder kemikleşme merkezi adını alır. Epifizdeki eklem kıkırdağı ise kemikleşmeye katılmaz (Şekil 4).



Şekil 4. Hiyalin kıkırdak model üzerinde bir uzun kemiğin meydana gelişini

Sonuç olarak perikondral kemikleşme perikondriyumun osteojenik aktivitesiyle, enkondral kemikleşme ise kondrositlerin yani hiyalin kıkırdak hücrelerin çoğalması ve diğer birtakım değişikliklerle meydana gelmektedir (Şekil 5). Kemik bir yandan devamlı olarak yapılırken bir yandan da osteoklastlarca yıkıma uğratılmakta ve bu iki olayın uyumlu çalışmasıyla kemik normal formunu korumaktadır (17).



Şekil 5. Kıkırdak matriks (pembe) kısa bir süre önce şekillenmiş kemik dokusu ile örtülüdür (kırmızı). Yeni kemiğin oluşturduğu boşlukları kemik iliği ve yağ hücreleri doldurur.

2.4. Kemiğin Hasarlanmaya Yanıtı (Kırık İyileşmesi)

Dıştan veya içten gelen zorlamalarla strese maruz kalan kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasıyla kırık meydana gelir. Fizyolojik reaksiyonlar, bozulan kemik bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yöneliktir. Kemik, skar dokusu oluşturmaz ve yeniden yapılanmayla iyileşir. Kırık iyileşmesi, kırık olduğu andan itibaren başlar, düzenli kemik doku ile kırık uçları birleşinceye kadar devam eder (18). Kırık iyileşmesi, temelde bir bağ dokusu iyileşmesi şeklindedir, yumuşak dokudan farklılığı, osteoblast ve osteoklastların aktiviteleri ile özelleşmiş kalsifiye kemik dokusu oluşumudur.

Yaralanan dokunun yerini fibröz skar dokusunun aldığı yumuşak doku iyileşmesinin tersine, kemik dokusundaki iyileşme yeni kemik dokusu oluşumu ile sonlanır. Eğer kemik dokusunun iyileşmesi sonucunda fibröz doku oluşmuşsa, bu olay kırığın iyileşmemiş olduğunu gösterir. Kırık iyileşmesi olayı makroskopik olarak 19. yüzyıl sonlarına doğru, mikroskopik olarak ise 20. yüzyıl ortalarına doğru aydınlatılmaya başlanmıştır. Ancak günümüzde gelinen son noktada dahi tam olarak açıklık kazanmamış bölümler mevcuttur (15).

Birincil kırık iyileşmesi, rijit internal fiksasyon sonra görülen bir olaydır. Belirli bir dış kallus oluşmadan sadece iç kallusla devam eden kontakt iyileşmesidir. İkincil kırık iyileşmesi, kırık kapalı yöntemle, ameliyatsız tedavi edilirse meydana gelir.

İkincil kırık iyileşmesi uygun bir şekilde evrelere bölünebilir.

De Palma'ya göre kırık iyileşmesi dört fazda incelenir (18) (Şekil 6).

1- Birincil hücresel kallusun oluşum fazı *a-Hematom fazı b-Birincil hücresel kallusun oluşumu*

2- Hücresel kallusun damarlanma fazı

3- Hücresel kallusun kemikleşme fazı

4- Kemiğin yeniden şekillenme fazı



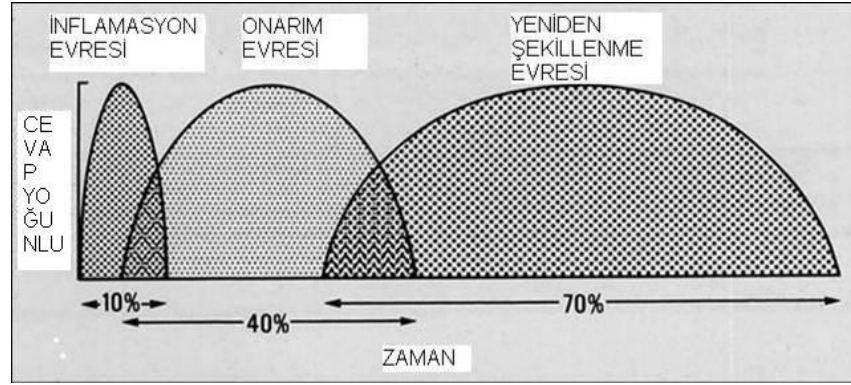
Şekil 6. Kırık iyileşmesi süreci

Cruess ve Dumont' a göre ise ikincil kırık iyileşmesinin 3 evresi vardır (19) (Şekil 7):

1- Yangı (Enflamasyon) evresi,

2- Onarım (Reperasyon) evresi,

3- Yeniden şekillenme (Remodeling) evresi.



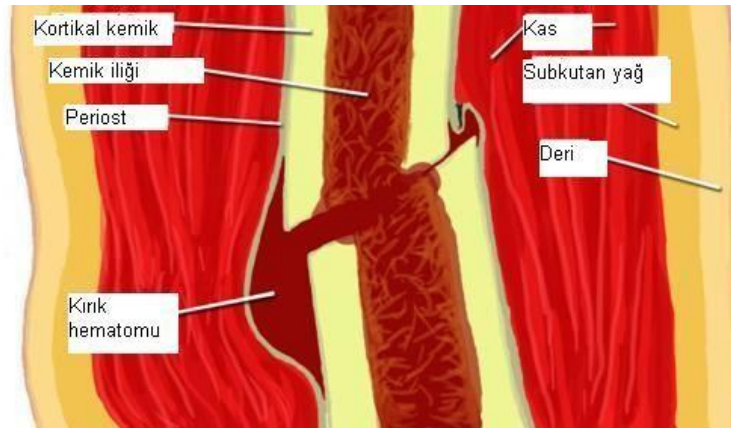
Şekil 7. Kemik onarım evreleri

Bu evreler birbiri ile ilişkilidir ve geçici olarak birbiri ile içiçe girebilir (20)

1-Yangı (Enflamasyon) Evresi (1-4 gün)

Bir kemik kırığı matrikste hasara, hücrelerde ölüme, periosteum ve endosteumda yırtıklara ve kırık kemik uçlarında yer değişimine neden olur. Tüm doku travmalarında, dolayısıyla kırıklarda, ilk verilen yanıt *enflamasyon* yani *yangı*'dır.

Travmanın şiddetine bağlı olarak, kırık uçları komşuluğundaki periost ve çevre yumuşak dokular yırtılarak, damarlar yaralanır. Kırık uçlarını karşılıklı çaprazlayan kan ve lenf damarlarının yaralanmasıyla bu uçlar arasındaki kemik iliğinde ve etrafında kan ve lenf sıvısı toplanır. Bu sıvı birikerek periostu kaldırır (Şekil 8). Kanamanın durmasını ve pıhtılaşmayı sağlamak için trombosit ve trombotik faktörlerin toplanmasıyla moleküler aracılar yaralanma bölgesine salınır. Kanamanın pıhtılaşması ile kırık uçları arasında, periost altında ve periost yırtılmışsa bunun etrafında hematom oluşur.



Şekil 8. Kırık Hematomu

Hematom sağlam yumuşak dokular tarafından sarılır. Kırık hematomunun ikincil kırık iyileşmesinde önemli bir rolü vardır. Hematomun basıncı kırık uçlarının bir arada tutulmasına yardım eder. Açık kırıklarda kırık hematomunun dışarıya boşalması ile kırık iyileşmesi gecikir veya hiç olmaz. Deneysel olarak hematom organize olduktan sonra çıkarıldığında osteojenik uyarının büyük bir kısmının yok olduğu öne sürülmüştür.

Olasılıkla, kırık hematomu onarım hücrelerinin gücünü kolaylaştıracak fibrinden bir yapı iskeleti sağlamaktadır (21). Ayrıca kırık hematomu ortamındaki trombositler ve hücrelerden büyüme faktörü ve diğer proteinler salınır. Bunlar, kırık onarımında yeri olan hücre göçünde, periosteal hücre çoğalmasında ve onarım dokusu matriksinin sentezinde aracılırlar (15). Bu matriks daha sonra mineralize olarak örgümsü kemiği oluşturur (21). Kırık olduktan sonra geçici bir arteriyoler daralmayı arteriyol, kılcal damar ve venüllerin genişlemesi izler. Bunun nedeniyse dokudaki mast hücrelerinin kırık bölgesine histamin salgılamasıdır. Ayrıca kılcal damar zar geçirgenliği artar. Vazodilatasyon ve plazma eksudasyonuna bağlı olarak, kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur. Polimorf çekirdekli lökositler, monosit ve lenfositleri içeren akut yangı hücreleri, ödemli bölgeye doğru göç eder.

2- Onarım (Reperasyon) Evresi (2-40 gün)

Onarım evresi kırık iyileşmesinde en önemli kısımdır. İlk basamağı hematomun organize olmasıdır. Lokal aracılı mekanizmalarla hassaslaşan öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farkanmaya ve düzenlenmeye başlar. Kırık hattındaki hücresel aktivitenin başlaması için gerekli uyarım karmaşıktır. Kimyasal, elektriksel ve mekanik faktörler söz konusudur. Tamir için gerekli hücre çoğalmasının oluşumu, muhtemelen travma bölgesindeki elektriksel akımla başlamaktadır. Bu akım kırık alanında en yüksektir ve daha sonraki 2-3 hafta içinde yavaş yavaş azalır.

Onarım evresi, kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7-12 gün sürer. Onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler mezenkimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip (pluripotent) hücrelerdir. Çoğunlukla kırık bölgesindeki granülasyon dokusunun içinden, ayrıca periosteumun osteojenik tabakası ve daha az olarak da endosteumdan köken alırlar. Bu hücreler farkanmaya

başladığında, ilk değişikliğe uğrayan hücreler, kılcal damarlarla hematoma içine giren *fibroblastlar*'dır. Üçüncü günde kırık uçlarında yoğun mezenkimal hücre mevcudiyeti vardır. Bu hücreler kırık parçaları arasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluşturur. Periosteal ve endosteal osteojenik hücrelerle, fibrin matriksteki fibroblastların çoğalıp farklılaşmasıyla, bu granülasyon dokusu oluşur.

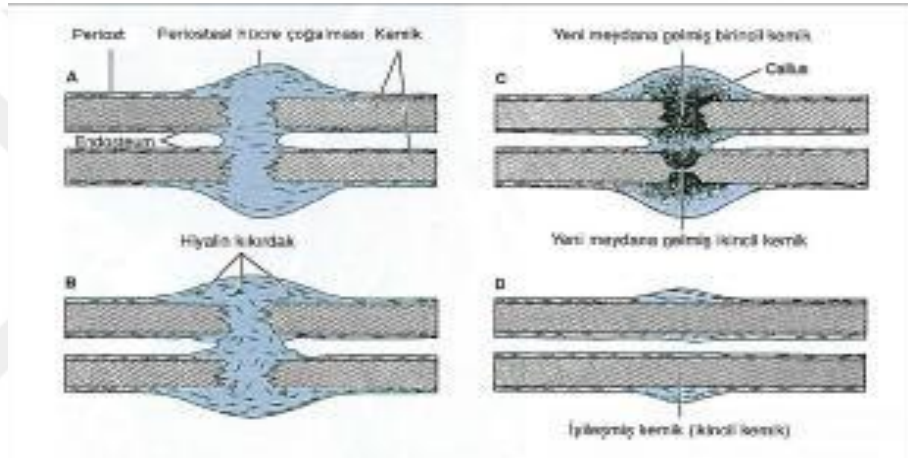
Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoid salgırlar. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içerdiği kollajen kapsamıyla yakın ilişkilidir. Kallusun boyutu kırığın hareket derecesiyle doğru orantılıdır. İleri yaşlarda bu hücrelerin farklılaşma kapasiteleri azalır. Periosteumun hasar görmesi ya da ortamdaki uzaklaştırılması kırık iyileşmesini yavaşlatır (17). Kırık bölgesinde mezenkimal hücre çoğalması ilk 16 saatte saptanmıştır. Bu çoğalma, kırık sonrası 32 saatte en üst düzeye çıkar. Oluşmaya başlayan kan damarları 2-3 günde ışık mikroskopik düzeyde görünür hale gelirler ve 1. haftada belirginleşirler.

Kırık iyileşmesinin ilk dönemlerinde periosteal damarlar, geç dönemdeyse besleyici (nutrisyen) damarlar, kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Fakat kılcal damar gelişimi osteojenik hücre çoğalması kadar hızlı olmadığından, beslenmenin daha iyi olduğu kemiğe yakın seviyedeki hücreler, osteoblastlara dönüşür.

Kemiğe yakın olmayan, yakalığın orta kısmındaki hücreler dolaşım yönünden fakirdir. Bu bölgedeki kılcal damarların gelişim hızı, hücre çoğalmasının hızına uyum gösteremediğinden, hücreler kondroblast ve kondrosite farklılaşarak kırık dokuyu oluşturur. Osteoblast haline gelen kanlanmanın yeterli olduğu bölgelerdeki hücrelerse trabekülleri oluşturur. Böylece en dış tabakada kırık dokunun üstünü örten periosteumun derin tabakasından çoğalan osteojenik hücreler, orta tabakada kırık doku, daha derinde ise kemik trabekülleri bulunur. Zamanla her iki kırık parçası da ucunda oluşan yakalığın tarzındaki kitle birleşerek, kırığa bütünlük sağlayan dış kallusu oluşturur. Dış kallusun devam eden gelişimi esas olarak kemik hücrelerinin çoğalmasına ve kırık dokudaki (orta tabakada) interstisyel büyümeye bağlıdır. Aynı şekilde ilik boşluğunda da aynı olaylar birbirini takip eder.

Endosteum ve iliğin osteojenik hücresinden gelişen trabeküllerle, iliğin köprülenmesi oluşur ve iç kallus meydana gelir. İlk 7- 12 günün sonrasında yumuşak kallus kitlesi

(prokallus), fibröz doku ve kıkırdaktan oluşmuştur ve kıkırdak sahasını çevreler (22). Kırık kemik uçları, iç ve dış kallus gelişimiyle çok sağlam bir yapıya kavuşur. Sert kallus oluşumu, yetişkinlerde çocuktan ve kompakt kemikte trabeküler kemikten daha yavaş meydana gelir. Yaralanmadan sonra kallus oluşması ve mineralizasyonu 4-16 hafta arasında zaman gerektirir. Kallus oluşumuyla beraber kaynamanın olduğu söylenebilir (Şekil 9). Bununla beraber, kaynama henüz son noktasına ulaşmış değildir, onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz ve etkisiz kısımlarının geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzanması ile yeniden şekillenme evresi (remodeling) başlar.



Şekil 9. Periosttan ve endosteumdan hücre çoğalması ile yeni bir kemik dokusunun oluşumu sayesinde kırık bir kemiğin onarılması

3- Kemiğin Yeniden Şekillenme (Remodeling) Evresi (25-100 gün)

Kemiğin şekillenmesi en uzun evre olup, aylar yıllar sürebilir. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür. Onarım evresinin ortasında başlayıp, normalde insanlarda 4-16 hafta sürerken, yıllar boyunca da devam edebilir.

Yeniden şekillenme evresinde 4 olay gerçekleşir:

- 1- Kalsifiye kıkırdak, osteoid dokuyla değişerek bir çeşit birincil trabeküler doku oluşur.
- 2- Lameller kemik bu dokunun yerini alır.

3- Kompakt kemik uçlarındaki kallus, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur.

4- İlik kanalı dereceli olarak yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından geri emilir ve boşluklar yeniden düzenlenir.

1892’de Wolf iskelet sistemi yapısının, bu sistemin mekanik ihtiyacına uygunluk gösterdiğini, daha sonra kendi adıyla anılan kanun ile tanımlanmıştır. Wolf, işlev yani stres arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu kanuna göre kemiğin işlevsel durumundaki değişiklik, dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bu kanun günümüzde de kemiğin yeniden şekillenmesinde temel bir kural olarak kabul edilmektedir.

Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü ise negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin hakim olduğu konveks yüzde geri emilim ve osteoblastik aktivitenin hakim olduğu konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır. Yani, “kırıgın konkav tarafında kemikleşme, konveks tarafında geri emilim” olur. Bu evreden sonraki kemiğin tıraşlanıp yeniden eski haline döndüğü *şekillenme evresi* 1-2 yıl sürer ve yalnız çocuklar ve adolesanlarda görülür.

2.5. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yerel ve genel faktörler olarak iki grup halinde veya kırık iyileşmesini olumlu veya olumsuz etkileyen faktörler şeklinde incelenebilirler.

2.5.1. Yerel Faktörler

1. Travmanın derece ve etkisi (23, 24)
2. Kırık uçlarının birbirine göre konumu (24)
3. Eklem içi kırıklar (22-25)
4. Kırık yerinin dolaşımı (26-28)
5. Kırılan kemiğin türü (25)

6. Kırık çizgisinin özelliği (23)
7. Cilt ve yumuşak doku yaralanması (22, 23)
8. Yerel bir enfeksiyon varlığı (22)
9. Yerel patolojik koşullar (25, 29)
10. Kırığın açık kırık olup kırık hematomunun dışarı akması (22-24, 29-31)
11. Elektrik akımı (24, 28)
12. Kırık bölgesinde denervasyon olması (23,25)
13. Yeterli tespit yapılmaması veya tespit süresinin kısa tutulması (22-24, 26, 30)

2.5.2. Genel Faktörler

1. Yaş: Azalan yaşla orantılı olarak mezenşimal hücre farklılaşması, yeni kemik dokusu gelişmesi ve kırığın yeniden şekillenmesi hızlanır (22, 23, 30).

2. Genel durum: Diyabet, anemi, tüberküloz, raşitizm gibi hastalıklar ve beslenme bozuklukları kırık iyileşmesini geciktirir. İltihabi olaylar (tüberküloz, kronik hastalıklar), hiperemi nedeniyle Ca^{+2} tuzlarının çözünmesini etkiler. Artan lökositlerin proteolitik enzimleri, matriksin bozulmasına neden olur ve osteoid oluşumunu engeller (24).

3. Hormonlar: Paratiroid hormonu (PTH)'nun, osteoklast sayısını artırıcı, kemiğin yeniden şekillenmesini uyarıcı ve osteositleri uyararak osteolizi hızlandırıcı etkileri vardır. Osteoblastların üzerine dolaylı etkisi olsa da net sonuç kemik kaybı ve kırık iyileşmesinin yavaşlamasıdır (29, 22, 26, 32). Kalsitonin PTH'nun antagonistidir. Hem kompakt hem de trabeküler kemik yapımını artırır. Kalsitonin dozu ve yeni kemik oluşumu arasında doğru orantı vardır. Fakat iyileşmeyi olumlu yönde etkileme mekanizması henüz açıklanamamıştır. İnsülin ve büyüme hormonu gibi anabolizan hormonlar kırık iyileşmesini hızlandırmaktadır. Büyüme hormonu ve diğer anabolizan hormonlar, proteine bağlı Ca^{+2} artışını etkileyerek kırık iyileşmesine yardımcı olur. Büyüme hormonu, kallus hacminde artışa sebep olur. Tiroid hormonu da PTH gibi kemiğin yeniden şekillenmesine yardım eder. Kırık iyileşmesine yardım ettiği ileri

sürülmüştür (22, 25). Kortizon kırık iyileşmesini yavaşlatır. Mezenşimal hücrelerden osteoblast gelişimi ve matriks oluşumu için gerekli yapı taşlarının sentezini yavaşlattığından, kırık iyileşmesini geciktirir. Kortizon, aynı zamanda kallus oluşumunu azaltır. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) üzerine antagonist etki yaparak kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler (25).

4. Vitaminler: A vitamini normal dozda mezanşimal hücre farklılaşmasını uyararak kırık iyileşmesine yardım eder. Eksikliğinde osteoblast düzenlenmesinde ve osteoklast aktivitesinde bozulma olur ve kemik oluşumu engellenir (27, 28, 33). A vitamini fazlalığında ise hücre çoğalmasının olmamasıyla birlikte kırıkta kolonlarında erozyon meydana gelir. Osteoklastlara dönüşüm fazla uyarılır ve kırık iyileşmesi gecikir (25). C vitamini, dolaylı yoldan kemik iyileşmesini olumlu etkiler (34). D vitamini, normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırır. D vitamini eksikliğinde Ca^{+2} düzeyi düşer ve kemik kalsifikasyonu zayıflar. Kalsiyumun kemikten kana geçişi yanında, kemik hücrelerinde sitrat üretimini artırır. Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme evresinde rol oynar. Sonuç olarak; D vitamini normal dozda kırık iyileşmesini hızlandırırken, toksik dozda olumsuz etki eder (25). B6 vitamini eksikliği ve K vitamini antagonistleri kırık iyileşmesine olumsuz etki ederler (25, 32, 33).

5. İlaçlar: Kondroitin sülfat, hiyalüronidaz ve dikumarol kırık iyileşmesine yardım eder. Deneysel çalışmalarda L-Dopa ve klonidinin büyüme hormonunu arttırarak kırık iyileşmesini olumlu etkilendiği gösterilmiştir (22, 25). İndometazin yüksek dozlarda kırık iyileşmesini durdurduğu bilinmektedir (15, 16). Lazer tedavisinin deneysel kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir (24-25).

6. Hiperbarik oksijen: Günde iki saat kadar 2–3 atmosfer basıncında uygulanan oksijen uygulanmasının kırık iyileşmesine yardım ettiği gözlenirken, 6 saat/gün dozda uygulamaların kırık iyileşmesini geciktirdiği izlenmiştir (25).

7. Kırık bölgesi egzersiz ve stresleri: İyi redükte ve tespit edilmiş kırık kemiklere erkenden fonksiyon ve kontrollü yük verilir veya yürütülürse kemik gelişimi uyarılarak iyi sonuç alınmaktadır (22, 23, 25, 26, 29). Bunun nedeni prostoglandin E2 (PGE–2) miktarının artması ve bu bölge dolaşımına olumlu bir etkisi olmasıdır.

8. Elektriksel uyarım ve ultrason: Gecikmiş kaynama ve kaynamama tedavisinde elektromanyetik uyarı 1970'li yılların başından beri kullanılmakta ve %64 ile %85 arasında değişen başarı oranları bildirilmektedir, ancak hala taze kırıkların tedavisinde etkili olduğu ispatlanamamıştır (35).

2.5.3. Kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen faktörler

Yüksek enerjili travmalar ve geniş yumuşak doku hasarı bulunması, kırık uçların birbirinden ayrılması, araya yumuşak dokuların girmesi, besleyici damarların hasar görmesi, cerrahi redüksiyon yapılmışsa aşırı disseksiyon ve yumuşak doku hasarının varlığı, kırığın transvers, parçalı veya segmenter olması (spiral ve oblik kırıklar daha çabuk kaynar), açık kırık olması (hematomun boşalması, kontaminasyon ve enfeksiyon olasılığı ve aşırı yumuşak doku hasarı nedeniyle), redüksiyonun başarısızlığı, iyi ve yeterli süre tespit yapılmaması, kırık yerinde enfeksiyon olması, hastanın ileri yaşta olması, eklem içi kırık olması (sinovyal sıvının kırık iyileşmesini bozucu etkisi nedeniyle), kemikte önceden var olan patolojik bir durum olması, spongioza ihtiva etmeyen veya kortikal kemik içeriği yüksek kırık olması, beslenme ve sağlıklı metabolizmayı etkileyen her türlü sistemik hastalık (diabet, maligniteler, sistemik enfeksiyonlar, anemiler vb), kemoterapi, radyoterapi, sigara bağımlılığı (nikotin) ve kortikosteroidler kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilerler (24).

2.5.4. Kırık iyileşmesini olumlu yönde etkileyen faktörler

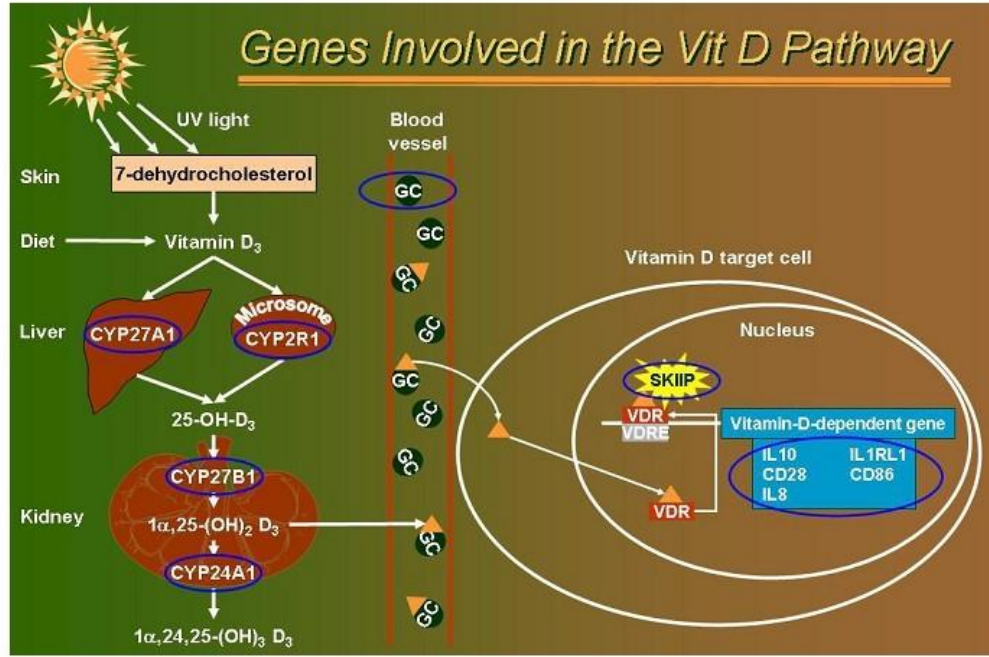
Olumsuz etkileyen faktörlerin tam tersi durumların kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilemesinin yanı sıra; elektrik akımları, manyetik alan, ultrason, hiperbarik oksijen uygulamaları, düşük kuvvette lazer uygulaması, anabolik steroidler, D vitamini, kalsitonin, PTH, prostoglandinler, kemik morfogenetik protein (BMP), büyüme hormonu, büyüme faktörleri, kafa travması, ameliyatla uygulanan kemik grefti ve demineralize kemik matriksi ile gen tedavisi iyileşmeyi olumlu yönde etkileyen faktörlerdir (24).

2.6. D Vitamini

2.6.1. D vitamini metabolizması

İnsanlarda vitamin D'nin iki şekli bulunur. Bunlar vitamin D2 (ergokalsiferol) ve vitamin D3'dür (kolekalsiferol). Vitamin D3 deride güneş ışınları ile 7-dehidrokolesterol'den elde edilir. 290-315 dalga boyundaki ultraviyole B güneş ışınları ile 7-dehidrokolesterol önce previtamin D3'e dönüştürülür. Daha sonra izomerizasyon ile previtamin D3'den vitamin D3 oluşur. Vitamin D3 dışarıdan diyetle özellikle yağlı balıklarla da alınır. Özellikle ringa balığı ve uskumru vitamin D3 açısından zengindir. Vitamin D2 ise bitkilerin güneş ışınları ile karşılaşması sonucu oluşur (36).

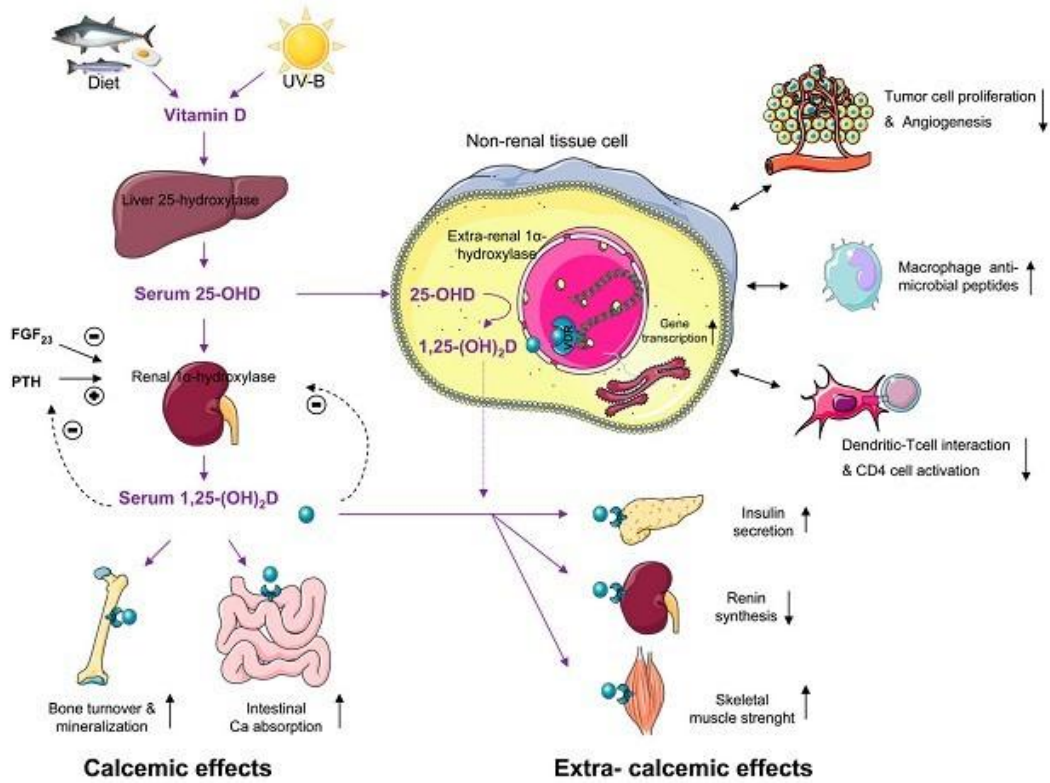
Güneş ışınları ile oluşan vitamin D3 gereksiniminin % 90-95'ini karşılar. Deriden sentez edilen ve besinlerle alınan D3 ve D2 vitaminleri karaciğerde 25-hidroksi vitamin D3 [25(OH)D₃] ve 25-hidroksi vitamin D2'ye [25(OH)D₂] dönüştürülür. 25(OH)D (kalsitriol) hem 25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂'yi tanımlamak için kullanılır. Karaciğerde sentez edilen 25(OH)D vitamini D vitamini bağlayan proteine (DBP) bağlanarak böbrek dokusuna taşınır. DBP-25(OH)D vitamin kompleksi renal tübül hücrelerine girer ve burada serbest kalan 25(OH)D vitamini mitokondride sitokrom P450 enzim sistemi birlikteliğinde 1- α -hidroksilaz enzimi ile aktif D vitamini olan 1-25(OH)₂D'ye dönüştürülür. Eğer 1-25(OH)₂D yeterli ise 25(OH)D'nin bir kısmı 24-25(OH)D'ye dönüştürülür. Bu daha az aktiftir ve katabolize edilir. D vitamini bağlayan protein 25(OH)D, 1-25(OH)₂D ve 24-25(OH)D metabolitlerine yüksek afinite ile bağlanır ve aminoasit yapısı olarak albümine benzerdir (36,37) (Şekil 10). Kalıtsal veya sekonder vitamin D metabolizma bozukluklarına bağlı vitamin D eksikliği görülse de D vitamini yetersiz sentezi ve besinlerle yetersiz alımı ülkemizde en sık görülen nedendir (38).



Şekil 10. Vitamin D yolağı

2.6.2. D vitamininin işlevleri

Şekil 11’de vitamin D’nin fonksiyonları kısaca özetlenmektedir (39).



Şekil 11. Vitamin D fonksiyonları

2.6.3. D Vitaminin Kemik Metabolizmasındaki Etkileri

Kemik metabolizması üzerine D vitaminin üç temel etkisi vardır:

1. D vitamini bağırsak kalsiyum emilimini artırır. Bağırsak epitelyum hücrelerinde VDR'ye bağlanan D vitamini kalsiyum bağlayan proteinin sentezini arttırarak kalsiyumun aktif transportunu arttırır. Aktif transport yanında kalsiyum bağırsaklarda hücre kenarlarında difüzyon yoluyla emilir. Aktif transportun eşik değeri varken difüzyon sisteminin eşik değeri yoktur ve diyetle alınan kalsiyum miktarına bağlıdır. D vitamini varlığında diyetteki kalsiyumun % 30-40'ı emilirken D vitamini yetersizliğinde kalsiyumun % 10-15'i emilir. D vitamini bağırsaklardan fosfor emilimini de arttırır (38,40).

2. D vitamini kemik dokusu üzerine etki ederek kalsiyum mobilizasyonunu arttırır. Bunun için PTH ile birlikte hareket eder. Aktif D vitamini kemik dokusunda osteoblastlardaki VDR'ye bağlanarak osteoblastlarda NF-κb (RANKL) proteinin sentezini arttırır. Daha sonra osteoblastlar üzerindeki nükleer faktör-kappa beta ligandın reseptör aktivatörü (RANKL) proteini preosteoklastlardaki RANKL reseptörüne bağlanarak preosteoklastların olgun osteoklastlara dönüşmesini sağlar. Olgun osteoklastlar çeşitli hidrolitik enzimler salgılayarak kemik matriksinden kalsiyum mobilizasyonunu ve bunun yanında diğer minerallerin de dolaşıma salınmasını sağlarlar (41-43).

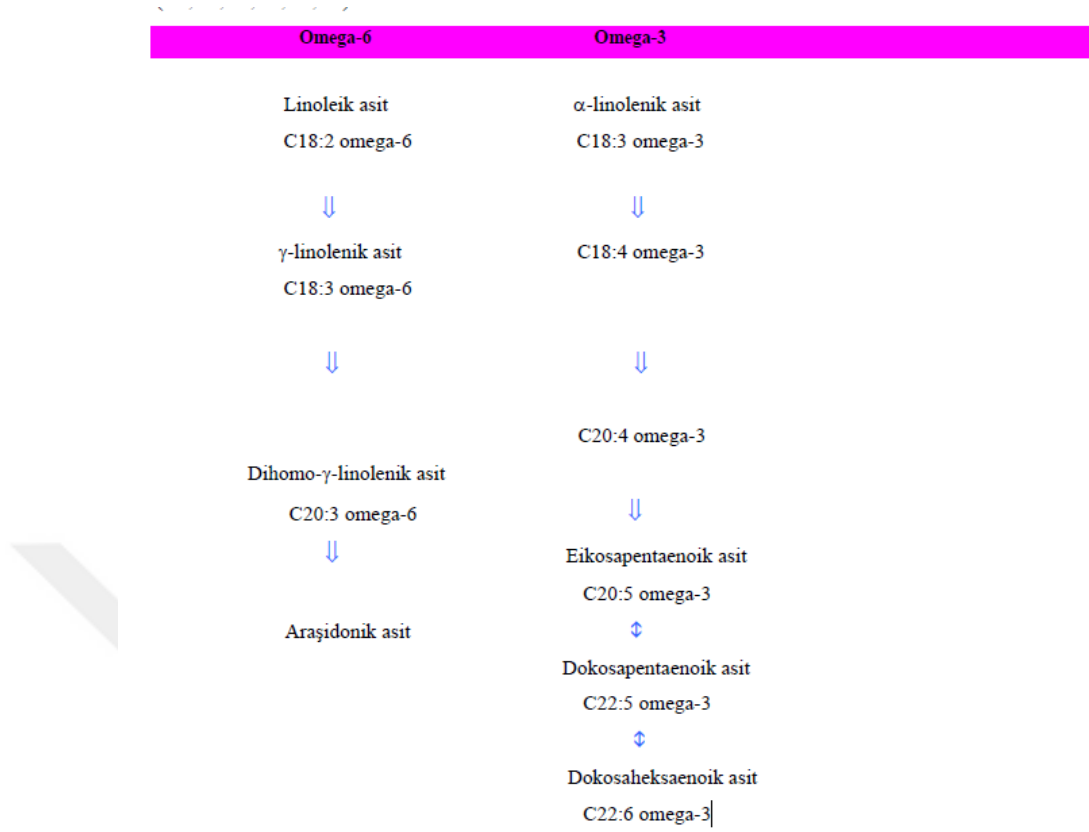
3. D vitamini böbreklerden de kalsiyum emilimini arttırır. Distal tübül hücrelerinden filtre edilen kalsiyumun % 1'i emilir. D vitamini PTH ile birlikte distal tübül hücrelerine etki ederek etkisini gösterir. Kalsiyum düşüklüğünde ilk aşamada D vitamini bağırsaklarda kalsiyum ve fosfor emilimini arttırır, eğer bu yeterli olmaz ise PTH kemik kalsiyumunu mobilize etmek için D vitamini sentezini arttırır. PTH ve hipofosfatemi böbreklerde 1,25(OH)₂D sentezini arttıran önemli faktörlerdir. PTH renal proksimal ve distal tübül hücrelerinde kalsiyum emilimini arttırırken fosfor atılımını arttırır. Hipofosfatemi PTH'dan bağımsız olarak böbreklerde 1,25(OH)₂D sentezini arttırır (44-46).

2.6.4. D vitamininin kırık iyileşmesi üzerine etkileri

Düşük 25(OH)D vitamin düzeyleri sekonder hiperparatiroidizme yol açarak osteoklastlar üzerinden kemik rezorbsiyonuna neden olduğundan yetişkinlerdeki osteopeni ve osteoporozu hızlandırıp kötüleştirebilirler (47). D vitamini; PTH seviyelerini fizyolojik sağlıklı düzeylerde tutarak osteoblastik aktiviteyi artırıp kemik mineralizasyonunu destekler ve bunun sonucunda da düşme ve kırık oluşma riskini belirgin olarak azaltır (48). Otuz binden fazla katılımcının olduğu bir meta analiz çalışmasında; yaklaşık 800 IU/gün D vitamininin günlük diyetle ilavesi non-vertebral kırık riskini %14, kalça kırık riskini ise %30 azaltarak kırık riskinde önemli bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (49, 50).

2.7. Esansiyel Yağ Asitleri

Yağ asitleri C atomlarının sayısı, çift bağların sayısı ve molekülün metil ucundan hesaplanan ilk çift bağın pozisyonu ile tanımlanır (51). Dolayısıyla, C18:2 omega-6 tanımı, 18C atomu ve 2 çift bağ içeren zincir uzunluğunu gösteren, ilk çift bağın metil ucundan itibaren altıncı C atomunda olduğu linoleik aside karşılık gelmektedir. Linoleik asitten türeyen omega-6 yağ asitlerinin en önemlileri γ -linolenik asit ve araşidonik asittir (AA). α -linolenik asit omega-3 PUFA olan eikosapentaenoik asidin (EPA) ve dokosaheksaenoik asidin (DHA) ana maddesidir (Şekil 12). Bu çoklu doymamış yağ asitleri membranı oluşturan yapılar ve biyokimyasal süreçlerin modülatörü olarak önemli fonksiyonları yerine getirirler. AA ve EPA, biyolojik olarak yüksek oranda aktif eikosanoidlerin sentezinin prekürsörü olarak inflamatuvar reaksiyonları, immünolojik direnci, kardiyovasküler hastalıkları, yağ metabolizması bozukluklarını, trombotik süreçleri ve neoplastik hastalıkları etkilerler (52-57).



Şekil 12. Yağ asitlerinin biyosentezi

2.7.1. Omega-3 poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin kaynağı

Bitkilerin kloroplastları, linoleik aside (C18:2 omega-6) 3 pozisyonunda bir çift bağın eklenmesiyle α -linolenik asit (C18:3 omega-3) oluşturan bir enzim sistemine sahiptir. EPA ve DHA gibi uzun zincirli omega-3 yağ asitleri algler ve planktonlar ile bunlarla beslenen balıklarda oluşur. Derin deniz balıkları (ringa, somon gibi) ve bunlardan üretilen balık yağları insanlar için başlıca omega-3 yağ asidi kaynağını oluşturur; çünkü insan organizması α -linolenik asitten desatürasyon ve zincir elongasyonu yoluyla ancak az miktarda EPA sentez edebilecek yetenektedir. EPA VE DHA gibi omega-3 PUFA derin deniz balıklarında ağırlıklarının % 0,2-2,4 arası oranında bulunur (58, 59).

2.7.2. Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin metabolizması

Fazla miktarda omega-3 PUFA'nin oral, enteral ve parenteral alımıyla, birçok hücre popülasyonunun, örneğin eritrositlerin, granülositlerin, trombositlerin, endotel hücrelerinin, monositlerin ve lenfositlerin membran yapısındaki omega-3 PUFA'nin omega-6 PUFA'ine oranının omega-3 PUFA lehine değiştiği gösterilmiştir (60-64). Omega-3 PUFA'nin yapı içinde yer aldığı, aynı zamanda beyin ve akciğer dokusunun

lipid spektrumunda, karaciğer hücrelerinde, dalakta, barsak mukozasında ve kas sisteminde de gösterilebilmiştir (65-67). Eikosanoidlerin önemli prekürsörleri olan AA ve EPA, hücre membranlarındaki fosfolipidlerden fosfolipaz-A2 enzimi aracılığıyla salınmaktadır. AA ve EPA arasındaki tek fark bir çift bağ olduğu için, her iki yağ asidi de aynı enzim sistemleri tarafından metabolizasyon açısından yarışma halindedir ve kendilerine özgü özellikler yoluyla birbirlerinin yerine geçebilirler (68). Bu yağ asitleri, söz konusu hücrenin enzim modeline bağlı olarak siklooksigenaz enzimi tarafından prostoglandinlerin, prostosiklinlerin ve tromboksanların oluşturulduğu endoperoksitlere dönüştürülür. Lipooksigenaz enzimi ilk aşama olarak hidroperoksitleri meydana getirir, bunlar da sonuç olarak lökotrienleri oluşturur (69).

EPA'dan oluşan türevler yapı ve biyolojik aktivite açısından AA türevlerinden farklıdır. Araşidonik asit tromboksan A2 (TxA2), (PGE2) ve lökotrien B4 (LTB4) gibi eikosanoidlerin üretilmesini sağlar ki bunların güçlü inflamatuvar etkileri vardır. PGE2 süperoksit oluşumuna yardım eder, kompleman kaskadı için gerekli ürünlerin sentezini inhibe eder, hipersensitif cevabı geciktirir ve tümör büyümesini artırır. TxA2 trombosit agregasyonunu ve düz kas kontraksiyonunu artırır. LTB4 ise güçlü bir kimyasal uyarıcıdır. Özetle n-6 PUFA inflamasyonu uyarıcı ajanların üretimini artırır ve vazokonstriksiyon yaparken aynı zamanda immün sistemin bakterilerle mücadele ve eliminasyon kapasitesini de inhibe eder (70, 71). EPA'nın prekürsör olarak kullanımıyla prostoglandin E-3 (PGE3), tromboksan A3 (TXA3) ve lökotrien B5 (LTB5) üretimi artar. Bu grup eikosanoidler, AA ürünlerinden %90 daha az biyolojik aktiviteye sahiptirler. Bu nedenle artma eğilimindeki trombojenik ve inflamatuvar cevabı baskırlar. Sentezleri konakta vazodilatasyon yapar. Eikosanoid sentezinin erken döneminde omega-3 ve omega-6 PUFA'nin birlikte kullanımı AA'ten PGE2 ve LTB4 üretimini engeller (62). Omega-3 PUFA alınımındaki artma sitokin üretimi ve fonksiyonlarını etkiler. Diyetle omega-3 PUFA alınması tümör nekrozis faktör (TNF) ve interlökin-1 (IL-1) üretimini azaltır (72).

Bunların yanında, omega-3 PUFA bazı nükleer transkripsiyon faktörlerini modüle ederek (peroksizm proliferasyon aktivatör proteinleri, nükleer faktör kappa B, sterol regülatör element 1, poliansatüre yağ asitleri regülatör element) gen ekspresyonunu etkiler. Bu etkiler genel anlamda inflamatuvar yanıtta azalmaya, hücresele antioksidan

defans mekanizmasında güçlenmeye ve yağın hücre içinde depolanması yerine oksidasyonunun artmasına neden olur.

2.7.3.Omega-3 PUFA'nin uygulanması:

Eksojen yolla alınan omega-3 PUFA metabolik kinetiği açısından oral ve parenteral uygulama arasındaki farklar halen tartışılmaktadır. Akut hastalıklarda önemli bir gereksinim omega-3 PUFA'nin hızlı verilmesi ve hücre membranına katılmasıdır. Oral yolla alınan omega-3 PUFA'nin ancak birkaç hafta süreli bir diyetten sonra hücre membranlarına dahil olurken, parenteral uygulama omega-3 PUFA'nin birkaç gün içinde hücre membranlarına dahil olmasıyla ve metabolize edilmesiyle sonuçlanır (73).

2.7.4. Omega-3 PUFA'nin kemik doku üzerine etkileri

Son çalışmalarda omega-3 PUFA'nin inflamasyonun düzenlenmesinde potansiyel rol aldığı ve bunu çeşitli hücrel yollarla yaparak kemik remodelizasyonuna etki ettiği bulunmuş. Bu yollardan biri de gen transkripsiyonudur. Omega-3 PUFA tarafından aktive edilen ve kemik homeostazında olumsuz etkisi bulunan transkripsiyon faktörü PPAR γ (peroksizom proliferasyon aktivatörü reseptör gamma)'dır (74). AA tedavisi PPAR γ ekspresyonunu arttırarak osteoblast proliferasyonunu inhibe eder (75). Omega-3 PUFA yüksek affinite ile PPAR γ 'ya bağlanarak osteoblastogenezini uyarır. Omega-3 PUFA aynı zamanda nitrik oksit (NO) artışıyla proinflamatuvar sitokinlerin azalmasına (76), IGF-1 ve PTH artmasına yol açarak osteoblastik diferansiyasyonu uyarır. Omega-3 PUFA'nin osteoklastlara etkisi bilinmemekle beraber omega-3 PUFA'nin osteoklast matürasyonunu azalttığı düşünülmektedir (77).

Yine yapılan başka çalışmalarda omega-3 PUFA'nin yanı sıra omega-6 PUFA olan gama linolenik asidi (GLA), uygun miktarlarda tüketildiğinde kemik sağlığından yarar sağlayabileceğini kanıtlamıştır (78). Buna ek olarak, n-6 / n-3 PUFA oranındaki bir azalmanın, hayvanlarda ve insanlarda artmış kemik gücü ile sonuçlanabileceği gösterilmiştir (78).

Yine ayçiçek yağı ile zenginleştirilmiş diyetin (yüksek omega-6/omega-3 oranı) KMY'nu azalttığı; balık yağı ile zenginleştirilmiş diyetin (yüksek omega-3/omega-6 oranı) ise KMY'nu koruduğunu saptamıştır. Balık yağının bu pozitif etkisinin kemik

dokudaki inflamatuvar mediatörlerin azalmasıyla ilişkili olduğunu bulunmuştur (79). Aynı şekilde overyektomili farelerde balık yağı takviyeli diyetin yüksek femoral KMY ve düşük TNF- α düzeylerine neden olduğunu bulmuştur (80).

Normalde memeliler omega-6 PUFA'nden omega-3 PUFA sentezleyemez. Fakat ilginçtir ki Kang ve ark. bir fare modelinde (fat-1 transgenic) omega-6'dan omega-3 yağ asitleri elde etmişlerdir (81). Bu modelde overyektomi sonrası kemik kaybı görülmemiş ve TNF- α , IL-1 beta düzeyleri de devamlı düşük bulunmuştur. Kemik kaybının görülmemesini omega-3 PUFA' nin KMY'na pozitif yönde etkisiyle açıklamışlardır (82).

Diyetinde omega-6 PUFA'den zengin mısır yağı ile beslenen ve 6 ay takip edilen farelerde trabeküler kemik kaybının yanında TNF- α , IL-1 beta ve IL-6' yı eksprese eden mRNA'nın düzeylerinde yükselme görülmüştür. Aynı çalışmada ayçiçek yağı yerine linoloik asitten zengin borage yağı kullanıldığında balık yağına benzer bir etki ile KMY'nu arttırdığı bulunmuştur (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu'na verilen tez projesinin onayının ardından EÜTF Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'ne destek amacıyla başvuruldu. Projenin TTU-2016-6577 numaralı proje kodu ile BAP desteğinin alınmasının ardından bu çalışma Ortopedi ve Tavmatoloji Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı, Radyodiagnostik Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi imkanları kullanılarak Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ında yürütüldü.

3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından önerilen laboratuvar hayvanı kullanım kılavuzunda belirtilen şartlarda bakımı yapılan ve Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırmaları Laboratuvarı'ndan temin edilen 48 adet, oniki aylık (398-510 g), erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Deney süresince aydınlık/karanlık (10-14 saat) ışık döngüsünde normal oda sıcaklığı ve neminde tutulan ratlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Ratlar her grupta oniki denek olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

3.2. Gruplar

Grup I: Bu gruptaki ratlar (n=12) kontrol grubunu oluşturacak şekilde düzenlendi.

Grup II: Bu gruptaki ratlara (n=12) postoperatif 1. günde sadece intramusküler tek doz 50000 IU/kg vitamin D3 (Devit-3® ampul (DEVA), 300000 IU/ml) uygulandı.

Grup III: Bu gruptaki ratlara (n=12) omega-3 PUFA (Omega-3 “950, Solgar®) postoperatif 1. günden itibaren 300 mg/kg olacak şekilde sakrifiye edilene kadar gavaj ile verildi.

Grup IV: Bu gruptaki ratlar (n=12) ise postoperatif 1. günde tek doz intramusküler vitamin D3 (Devit-3® ampul (DEVA), 300000 IU/ml) 50000 IU/kg uygulandı ve omega-3 PUFA (Omega-3 “950, Solgar®) postoperatif 1. günden itibaren 300 mg/kg olacak şekilde sakrifiye edilene kadar gavaj ile verildi.

3.3. Hazırlık ve Operasyon

Denekler rastgele her grupta 12 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Deneklerin anestezisi 90 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar®, Eczacıbaşı) ve ksilazin klorür (Rompun®, Bayer) ile sağlandı. Deneklerin sol alt ekstremiteleri kasığa kadar traş edildi ve operasyon masasına alındı. Operasyon sahası polivinil pirolidon-iyot (Batticon®, Adeka) ile dezenfekte edilerek operasyon sahası açıkta kalacak şekilde steril kompreslerle örtüldü. Tüm ratlarda diz ve distal femur orta hat insizyonu ile (Resim 1) cilt, ciltaltı dokular ve kas yapılar geçilerek artrotomi yapıldı. Eklem aralığı ve femurun orta/distal 1/3 lük kısmı ortaya konuldu (Resim 2). Periost sıyrılarak mini elektrikli testere (Medtronic, Triton, Microsagittal saw) yardımıyla sol femur middiafizer bölgeden osteotomize edildi (Resim 3). Osteotomi sonrası fiksasyon amaçlı 1,5 mm'lik Kirschner (Kr) telleri diz ekleminden retrograd gönderilerek tespit edildi (Resim 4). Tespit sonrası Kr tellerinin proksimal ve distal femur içerisinde kalmasına özen gösterildi. Tespit sonrası osteotomi hattı ve insizyon sahası serum fizyolojik (SF) ile yıkandı. Yıkama sonrası kas doku ve cilt 3/0 keskin iğneli Ethicon® marka vicryl suture ile usulüne uygun olarak kapatıldı. Ratlar anestezisi sonrası derlenme süresi boyunca ayrı ortamlarda tutuldu ve derlenme sonrası kafeslerine her bir kafeste iki denek olacak şekilde konuldu.

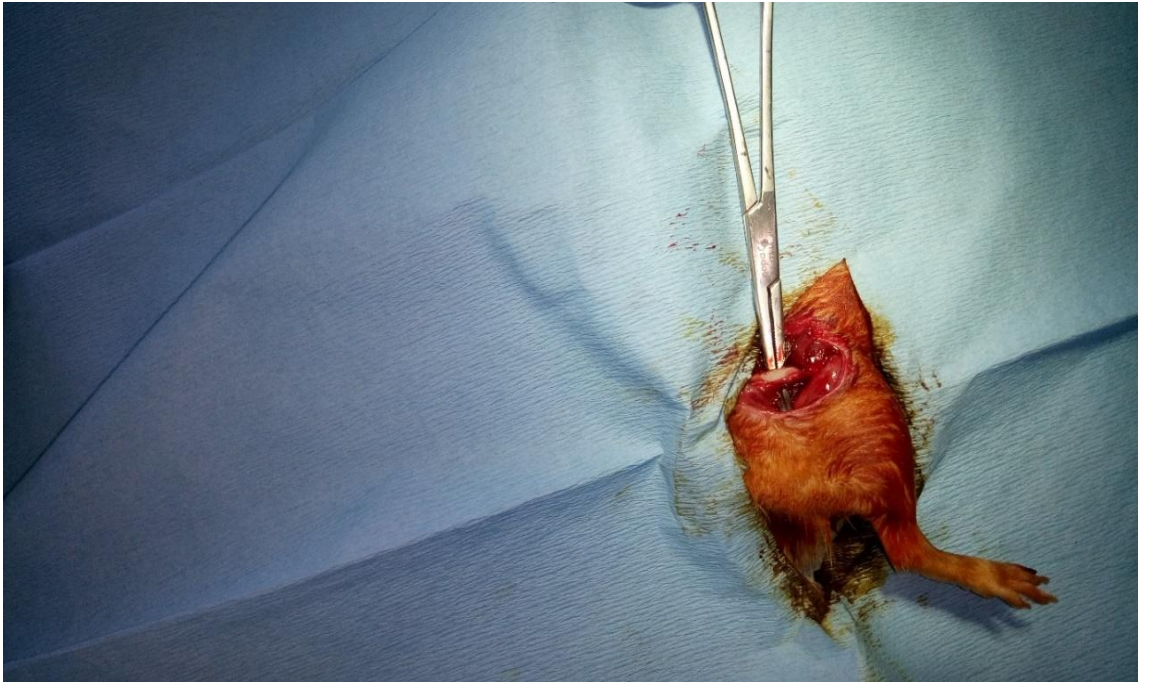
3.3.1. Postoperatif Takip

Postoperatif dönemde kontrol grubuna (Grup I) herhangi bir ajan verilmeden 6. haftanın sonunda sakrifiye edilene kadar takip edildi. 2. gruptaki ratlara (Grup II) postoperatif 1. günde tek doz 50000 IU/kg intramusküler vitamin D3 (Devit-3® ampul (DEVA), 300000 IU/ml) uygulandı. 3. gruptaki (Grup III) ratlara 950 mg omega-3 PUFA içeren ve içeriğinde 504 mg EPA + 378 mg DHA bulunan Omega-3 “950, Solgar® kapsül 300 mg/kg/gün olacak şekilde insülin enjektörüne çekilerek postoperatif 1. günden itibaren

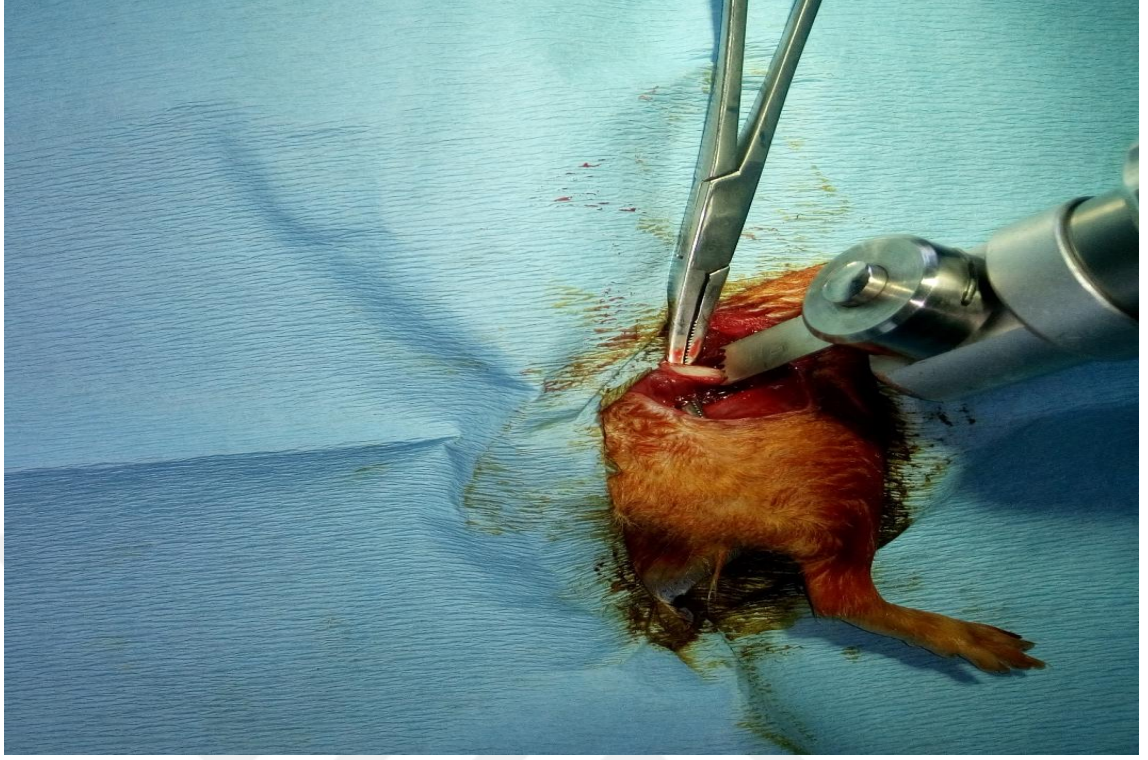
sakrifiye edilene kadar gavaj ile verildi. 4.gruptaki (Grup IV) ratlara ise postoperatif 1. günde intramusküler tek doz 50000 IU/kg vitamin D3 (Devit-3® ampul (DEVA), 300000 IU/ml) ve 300 mg/kg/gün olacak şekilde omega-3 PUFA (Omega-3 “950, Solgar®) postoperatif 1. günden itibaren sakrifiye edilene kadar gavaj ile verildi.



Resim 1. Cilt insizyonu yapılması



Resim 2. Femur distal 1/3 ünün ortaya çıkarılması



Resim 3. Testere ile osteotomi işleminin yapılması



Resim 4. Kır teli ile tespit sonrası görünüm

3.3.2. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmesi

Deneklere ketamin-ksilazin anestezisi uygulandıktan sonra biyokimyasal çalışma için intrakardiak 2 ml kan alındıktan sonra intrakardiak potasyum klorür enjeksiyonu (% 75 KCl, Galen A.Ş. Türkiye) ile tüm ratlar sakrifiye edildi (Resim 5-6). Sakrifikasyon sonrası tüm deneklerin sol femurlarının iki yönlü grafileri çekildikten sonra, deneklerin her bir grubundan sırasıyla altışar (denekler 1-6) adet femur disseke edilerek % 10 formalin içerisinde histopatolojik çalışma için ayrıldı. Geri kalan sırayla (denekler 7-12) altışar femurlar SF emdirilmiş nemli gazlı beze alınarak biyomekanik çalışmaya gönderildi.

3.4. Radyolojik Değerlendirme

Tüm deneklere 6. haftanın sonunda Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ındaki sakrifikasyonun tamamlanmasının ardından numaralandırılarak ön-arka (AP) ve yan düzlemlerde direkt grafi çekilmesi amacıyla EÜTF Radyoloji Bölümü'ne götürüldü. Önceden numaralandırılmış olan deneklerin femurları ilk olarak AP ve daha sonra ise yan pozisyonda yatırılarak lateral grafileri çekildi (Resim 9-16). Görüntüleme işlemi yüksek çözünürlüklü dijital radyografi sistemi (Siemens Multix C, Japonya) ile yapıldı.

Görüntüleme 110 cm uzaklıktan 66 kV, 1.82 msn, 1.20 mAs ve X1 büyütme kullanılarak standardize edildi. Değerlendirme çalışmayı bilmeyen bir radyoloji uzmanı ve bir ortopedi uzmanı tarafından farklı zamanlarda Lane ve Sandhu Skorumlama Sistemi kullanılarak uygulandı (84) (Tablo 1).

Tablo 1. Radyoloji skorumlama sistemi

Radyolojik verileri değerlendirmek için Lane-Sandhu sınıflaması (84)

0 Kallus yok

1 Kallus formasyonu var

2 Kemiksel kaynama başlangıcı

3 Kırık hattının görülmemesi

4 Tam kemiksel kaynama

3.5. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik inceleme için her bir gruptan altışar deneğin k telleri çıkarıldıktan sonra (denekler 1-6) sol femurunda kırık kaynama sahasını içeren kemik doku örnekleri % 10'luk tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonunda tesbit edildi. Kemik doku örnekleri daha sonra %10'luk tamponlu formalinle %20 oranında formik asitle (UN 1779, Merck, Darmstadt, Almanya) karıştırılarak hazırlandı. İçeren asit solüsyonunda 24 saat bekletilerek dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrasında osteotomi sahasını ortalayacak şekilde kemik parçası kesilerek sagittal düzlemde 2'ye ayrıldı. Elde edilen parçalar dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından dört farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. Birer saatlik iki kez parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü.

Parafin bloklardan alınan 4-6 mikron kalınlığında kesitler hemotoksilen eozin (HE), nuclear fast red ve alcian blue ile boyandıktan sonra Nikon Optiphot-2 marka ışık mikroskopunda Hua ve ark. (85)'nin tarif ettiği histolojik skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi (Tablo2).

Tablo 2. Histolojik verileri değerlendirmek için Huo ve ark. (85)'nin kullandığı skorlama sistemi

Derece 1: Fibröz doku

Derece 2: Ağırlıklı fibröz doku, az miktarda kıkırdak

Derece 3: Eşit oranda fibröz ve kıkırdak doku

Derece 4: Ağırlıklı kıkırdak, az miktarda fibröz doku

Derece 5: Kıkırdak doku

Derece 6: Ağırlıklı kıkırdak, az miktarda immatür kemik

Derece 7: Eşit oranda kıkırdak ve immatür kemik doku

Derece 8: Ağırlıklı immatür kemik, az miktarda kıkırdak doku

Derece 9: İmmatür kemik ve kırık iyileşmesi

Derece 10: Matür kemik ile kırık iyileşmesi

3.6. Biyomekanik Değerlendirme

Denekler radyolojik incelemelerinin tamamlanmasının ardından her bir gruptan sonraki altışar tane deneğin sol femurları (denekler 7-12) olacak şekilde rastgele seğildi. Kemik üzerindeki yumuşak dokular temizlendi. Numaralandırılan örnekler SF emdirilmiş ıslak bir sargı bezine sarılarak Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvar'ına ulaştırıldı. Deneklerin sol femurlarında bulunan Kr teli tel keski ile çıkarıldı. Biyomekanik alışma için üç nokta kırma testi uygulandı. (AG-XD 50 kN, Shimadzu, Japonya) (Resim 7). Alt aparat aralığı 20 mm ile sabitlendikten sonra osteotomi alanı üst aparatı ortalayacak şekilde kemik numuneleri yerleştirildi. Cihaz kırma testini dakikada 1 milimetre hız (1 mm/dk) ile basarak gerçekleştirdi (Resim 8). Kallus dokusunda ilk kırılma oluşup, kuvvet basma işleminin düştüğü andan sonra deney sonlandırıldı.



Resim 5. Biyomekanik çalışmada kullanılan 3 nokta eğme cihazı



Resim 6. Üç nokta kırma (bending) testinin uygulanışı

3.7. Biyokimyasal Değerlendirme

Tüm deneklerden cerrahi işlem öncesi ALP, P, Ca^{+2} parametrelerini değerlendirme amaçlı 2 ml kan alınarak biyokimya tüpüne konuldu. Alınan numuneler biyokimya laboratuvarında HITACHI cobas 8000 marka cihaz ile 5000/dk devir ile 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra numunenin plazma kısmı pipet yardımıyla alınarak HITACHI Cobas 8000 marka cihazda çalıştırıldı. Aynı işlem 6 haftanın sonunda sakrifikasyon öncesi alınan 2 ml kan ile tekrarlanarak biyokimyasal çalışma yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada opere edilen ratlardan elde edilen radyolojik değerlendirme sonuçları, biyomekanik değerlendirme sonuçları, histopatolojik değerlendirme sonuçları ve biyokimyasal ölçüm sonuçları için SPSS 17.0 Windows programı (SPSS Inc Chicago, Illinois) kullanılarak grup içi karşılaştırmada Mann Whitney U testi, gruplararası karşılaştırmada Kruskal Wallis testi kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. $p < 0,005$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya grup I, grup II, grup III ve grup IV'te onikişer adet olacak şekilde 48 denek ile başlandı. Bütün deneklerin ameliyatı çok iyi tolere ettiği, yeme ve suya ulaşmada sorun yaşamadıkları görüldü. Sakrifikasyon sonrası çekilen grafilerde bir olgunun (grup I, 6 no'lu denek) Kr telinin görülmemesi üzerine telin pull out olduğu saptandı. Denekte kaynamanın görülmesi nedeniyle çalışmadan çıkarılmadı. Çalışma 48 rat ile tamamlandı.

4.1. Radyoloji Sonuçlarının Karşılaştırılması

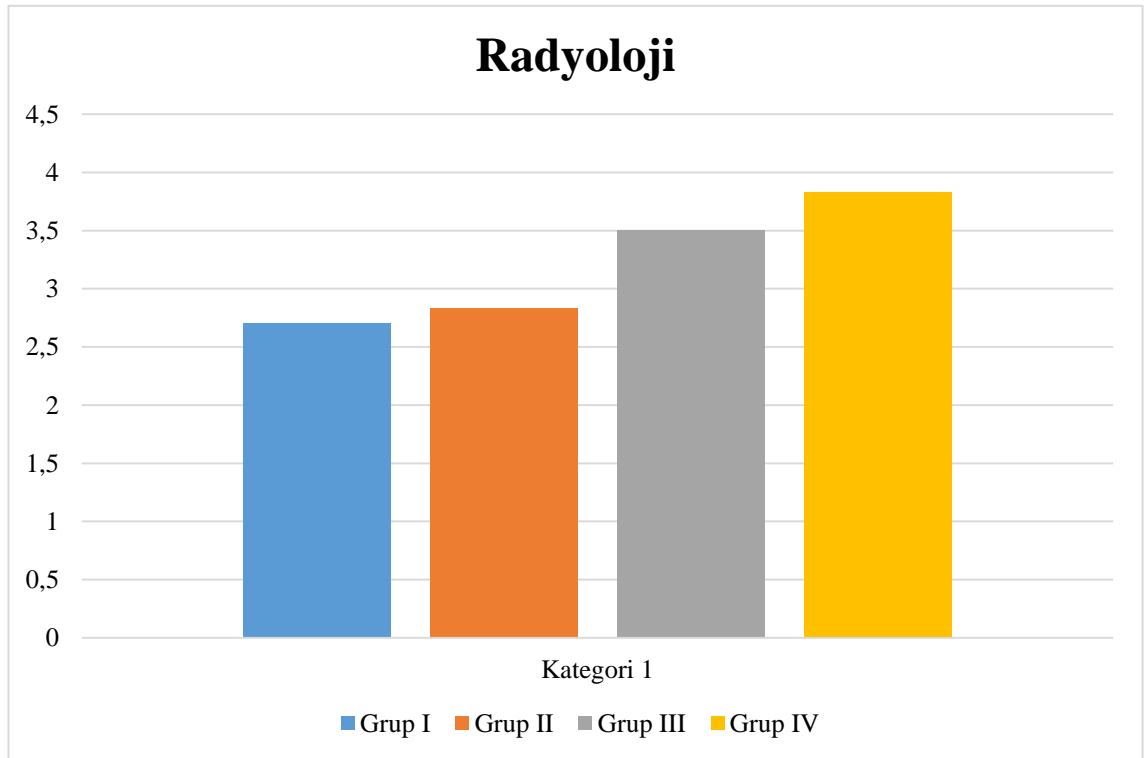
Çalışmada Lane-Sandhu skorlama (84) sistemi kullanılarak oluşturulan dört gruptaki 12'şer ratın X-Ray görüntüleri (Resim 7-14) radyolojik kaynama açısından bir radyolog ve bir ortopedist tarafından skorlandı. (Tablo3).

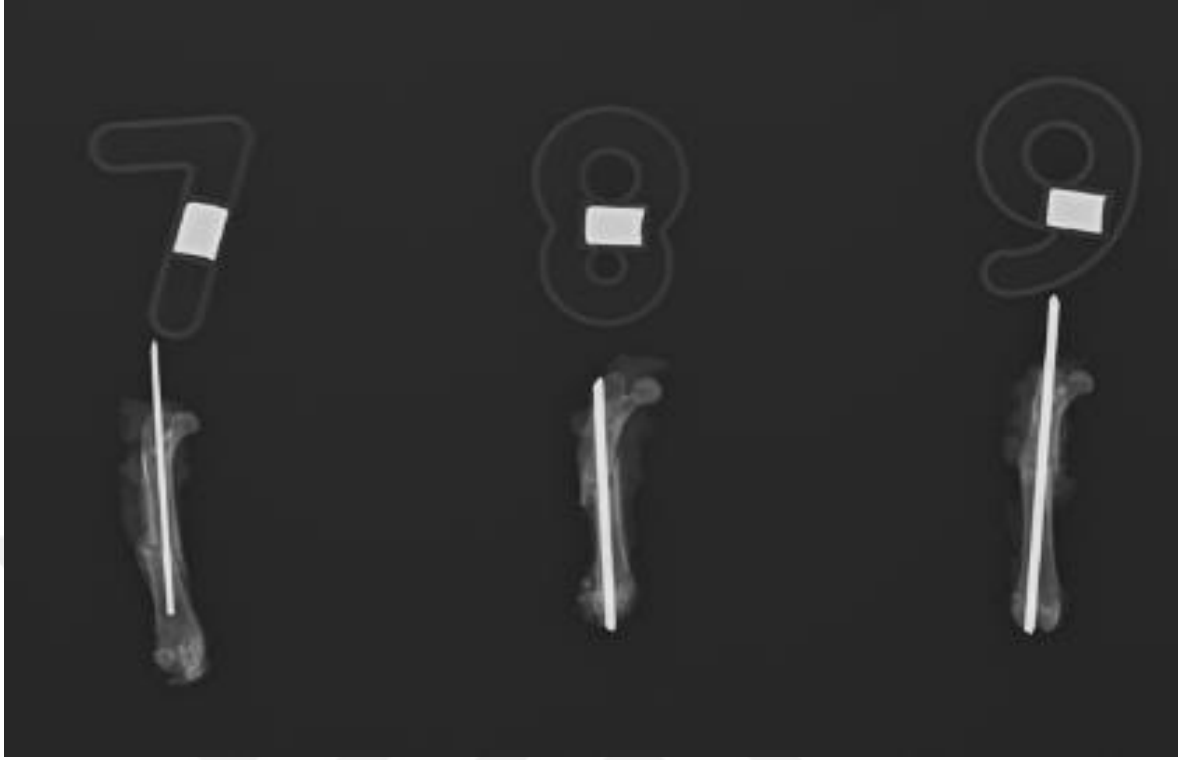
Aynı zamanda deneklerin Lane ve Sandhu skorlamasında aldığı değerler ortalaması; grup I'de 2,67, grup II'de 2,83, grup III'te 3,50 ve grup IV'de 3,83 olarak bulunmuştur (Tablo 4).

Tablo 3. Grupların radyolojik skorları

Denek no	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
1	4	3	3	4
2	3	2	3	4
3	2	3	4	4
4	2	2	3	4
5	1	2	3	4
6	2	3	4	4
7	3	4	4	4
8	2	3	4	4
9	3	3	4	3
10	3	3	3	3
11	3	3	3	4
12	4	3	4	4
Toplam	32	34	42	46

Tablo 4. Radyolojik skorların grup ortalamaları





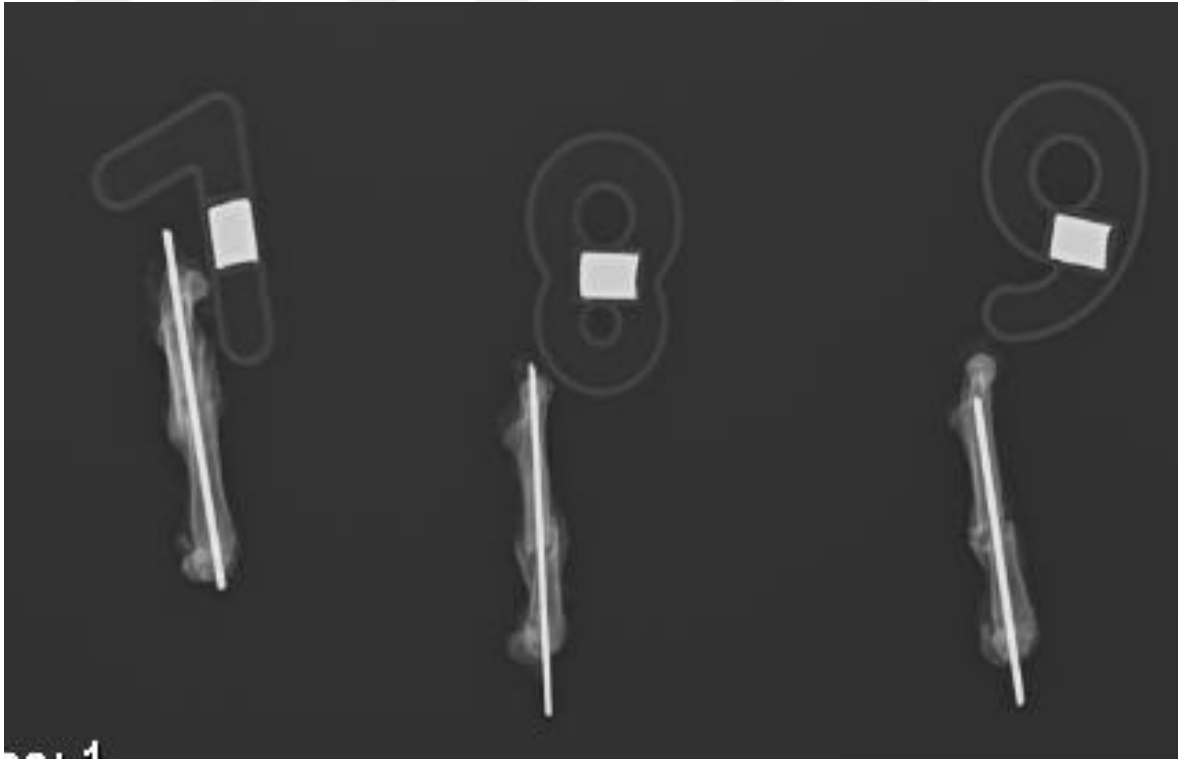
Resim 7. Grup I deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray AP grafigerin örnekleri



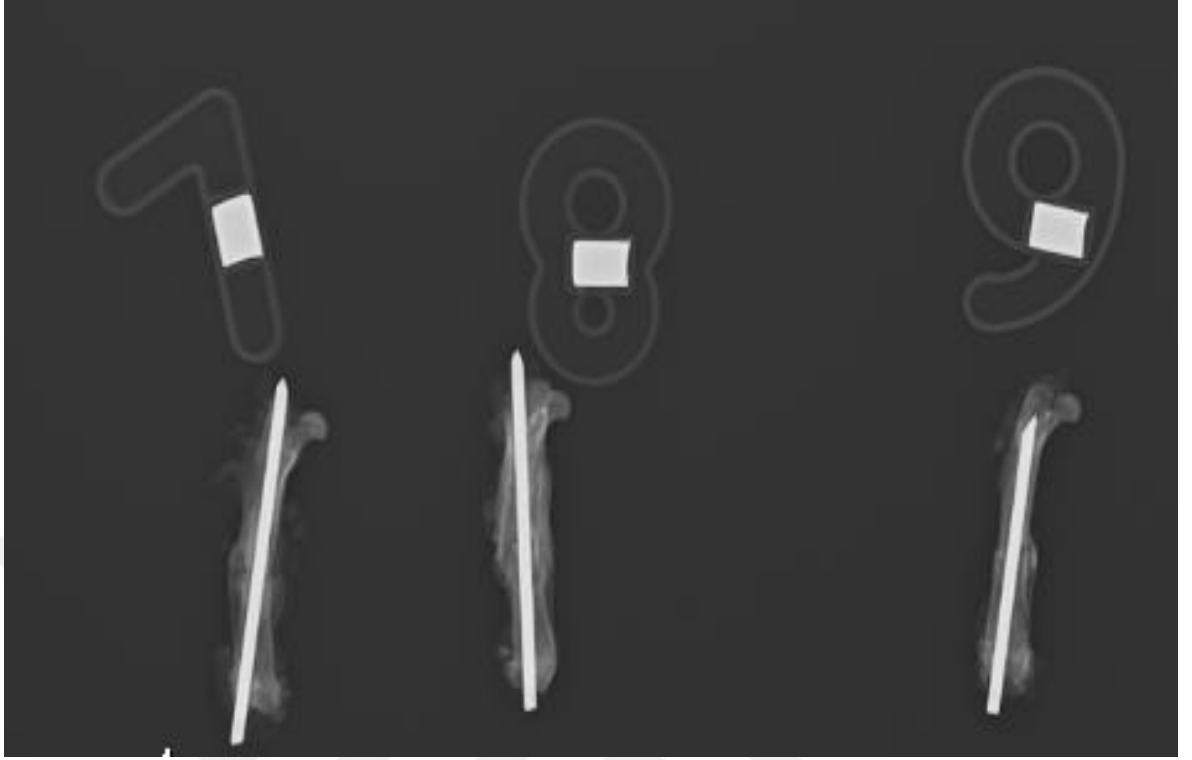
Resim 8. Grup I deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray yan grafigerin örnekleri



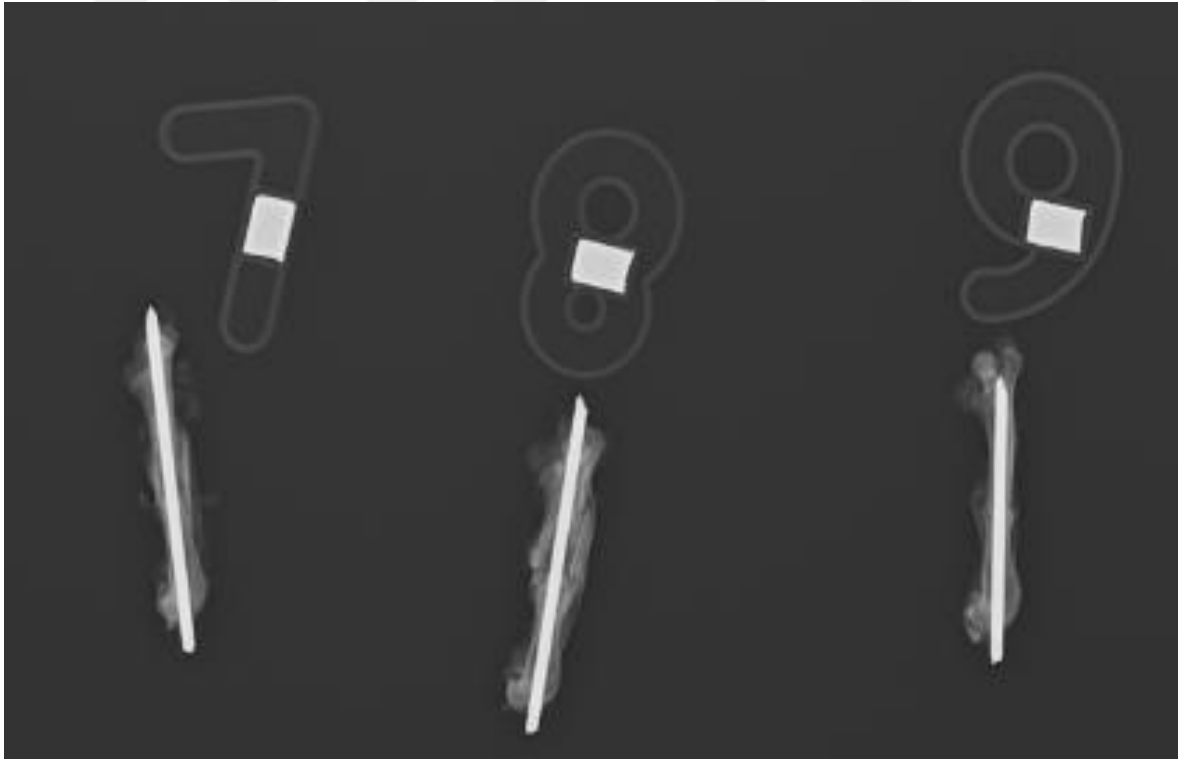
Resim 9. Grup II deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray AP grafiilerin örnekleri



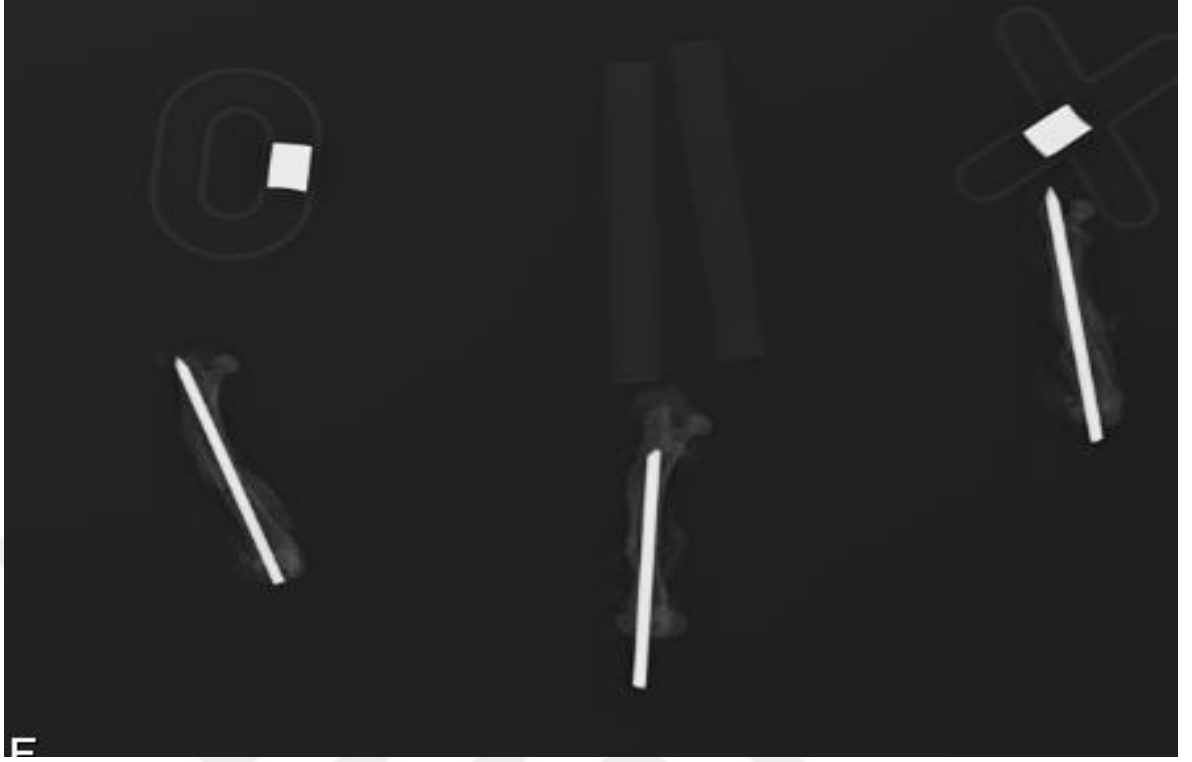
Resim 10. Grup II deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray yan grafiilerin örnekleri



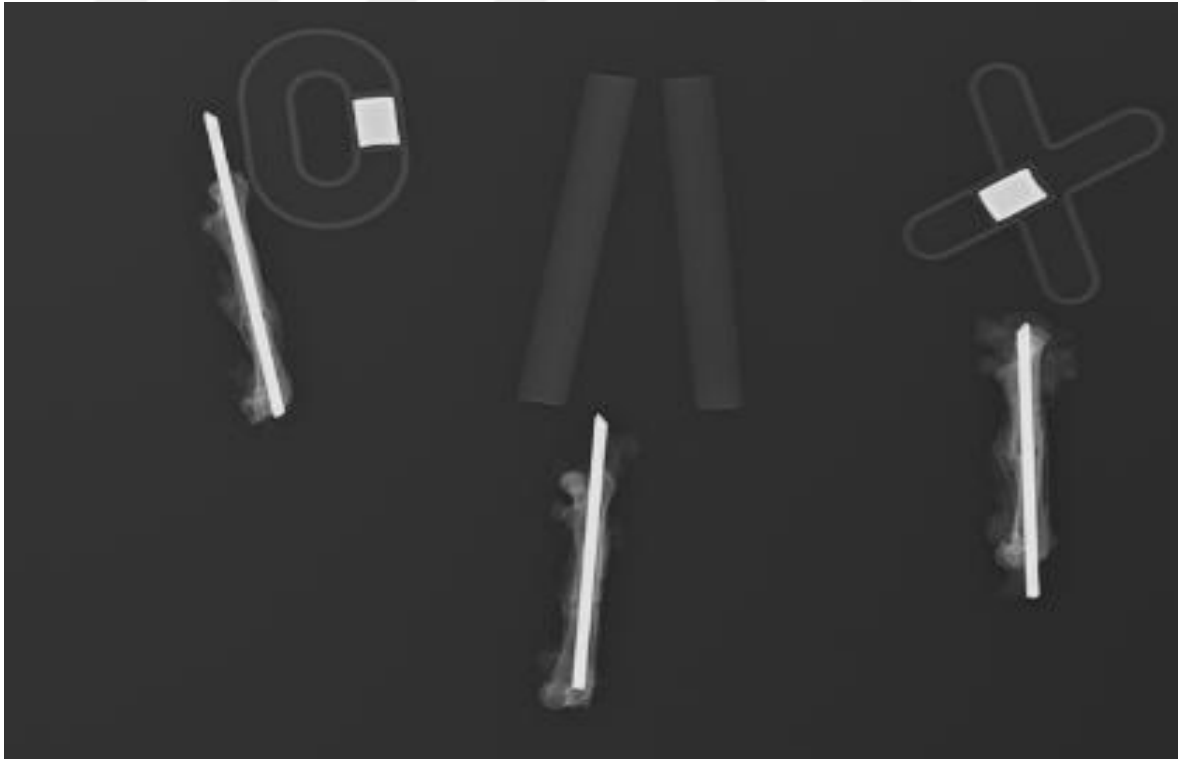
Resim 11. Grup III deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray AP graflerin örnekleri



Resim 12. Grup III deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray yan graflerin örnekleri



Resim 13. Grup IV deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray AP grafilerin örnekleri



Resim 14. Grup IV deneklerin sakrifikasyon sonrası X-Ray yan grafilerin örnekleri

Her bir grup ikili olarak diğer gruplarla Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında; Grup I ve IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$). Grup II ile Grup IV arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,003$). Grup I ile Grup II karşılaştırıldığında ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=1,000$). Grup I ile Grup III karşılaştırıldığında ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,090$). Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,149$). Grup III ile Grup IV karşılaştırıldığında ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=1,000$).

4.2. Histopatoloji Sonuçlarının Karşılaştırılması

Histopatolojik inceleme Huo ve ark. (85)'nin daha önce tanımladığı skorlama sistemi kullanılarak gruplar skorlandı ve karşılaştırıldı. Aşağıda her grubun aldığı skor değerleri verildi (Tablo 5-8).

Tablo 5. I.grubun histopatolojik skorları

Denek	Histopatoloji skoru
1	10
2	8
3	8
4	8
5	10
6	10
Toplam : 54	

Tablo 6. II. grubun histopatolojik skorları

Denek	Histopatoloji skoru
1	10
2	8
3	10
4	8
5	8
6	10
Toplam : 54	

Tablo 7. III. grubun histopatolojik skorları

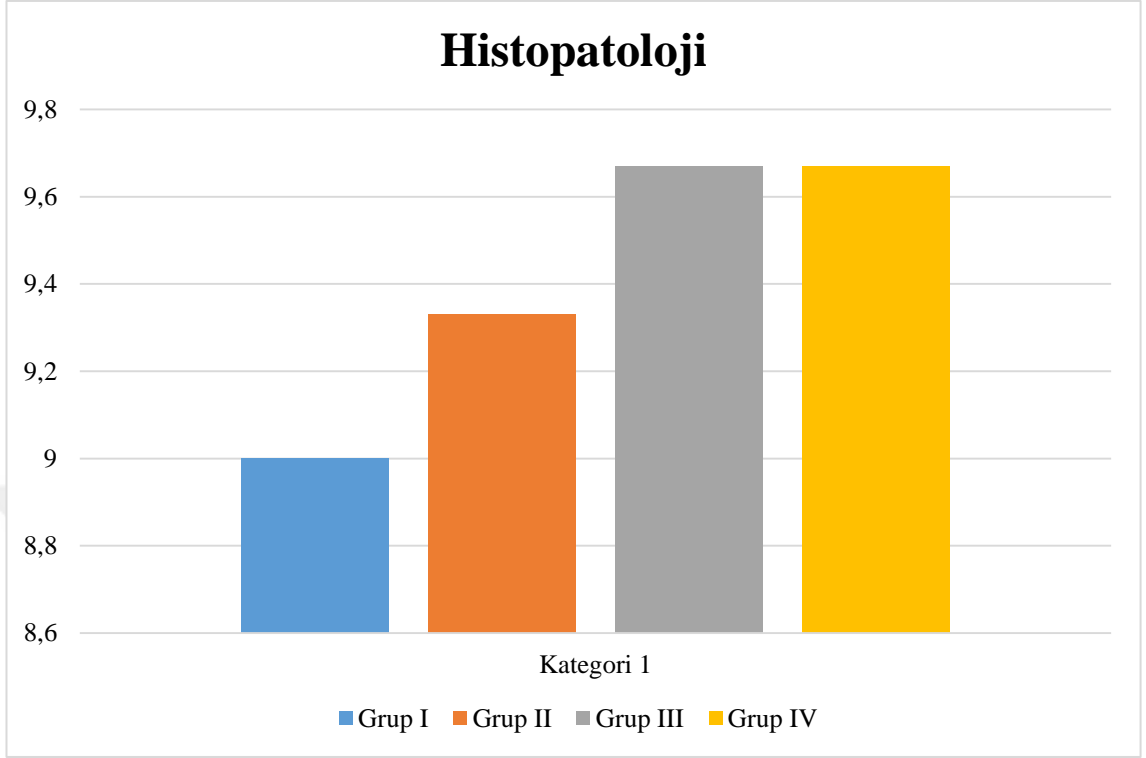
Denek	Histopatoloji skoru
1	10
2	8
3	10
4	10
5	10
6	10
Toplam : 58	

Huo ve ark. tanımladığı histopatolojik skarlama sisteminde grup I'in ortalaması 9, grup II'nin ortalaması 9,33, grup III'ün ortalaması 9,67 ve son olarak grup IV'ün ortalaması 9,67 olarak bulunmuştur. (Tablo 9)

Tablo 8. IV. grubun histopatolojik skorları

Denek	Histopatoloji skoru
1	10
2	10
3	10
4	8
5	10
6	10
Toplam : 58	

Tablo 9. Gruplar arasında histopatolojik skorların ortalaması



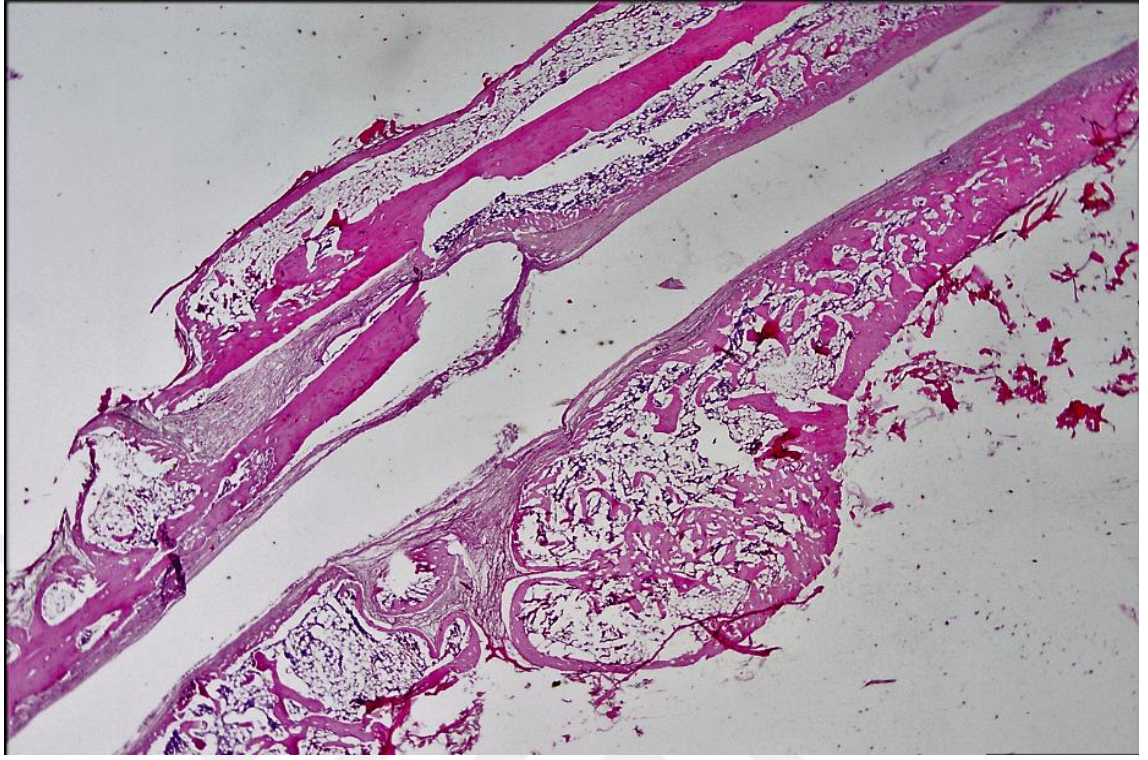
Gruplar arası fark istatistiksel olarak Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında p değeri 0.547 olarak bulunmuş ve istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

Kontrol grubunda (Grup I) 6. haftanın sonunda radyolojik olarak kaynama izlendi. Histopatolojik değerlendirmede de uyumlu olarak oniki ratın hepsinde osteotomi hattında matür-immatür kemik doku ile iyileşme görüldü (Şekil 13).

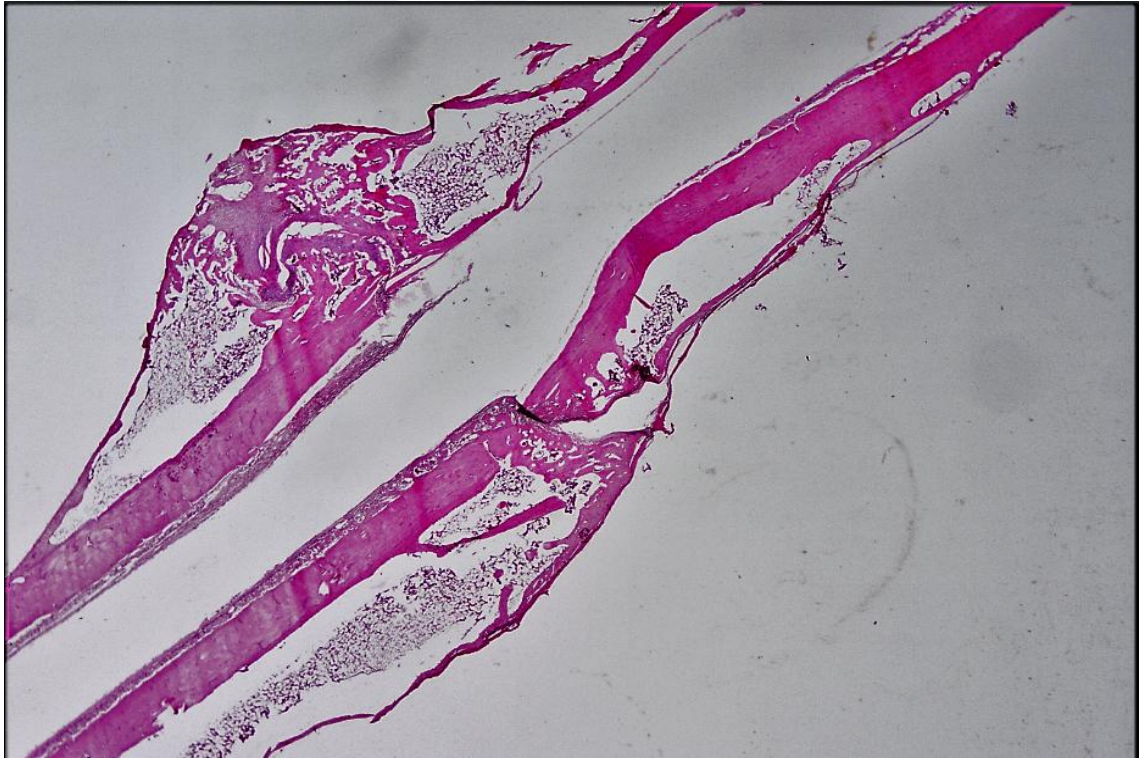
Sadece D vitamini verilen grupta (Grup II) 6. haftanın sonunda radyolojik olarak kaynama izlendi. Histopatolojik değerlendirmede de uyumlu olarak oniki ratın hepsinde osteotomi hattında matür-immatür kemik ile iyileşme görüldü (Şekil 14)

Sadece omega-3 PUFA verilen grupta (Grup III) 6. haftanın sonunda radyolojik olarak kaynama izlendi. Histopatolojik değerlendirmede de uyumlu olarak oniki ratın hepsinde osteotomi hattında matür-immatür kemik doku ile iyileşme görüldü (Şekil 15).

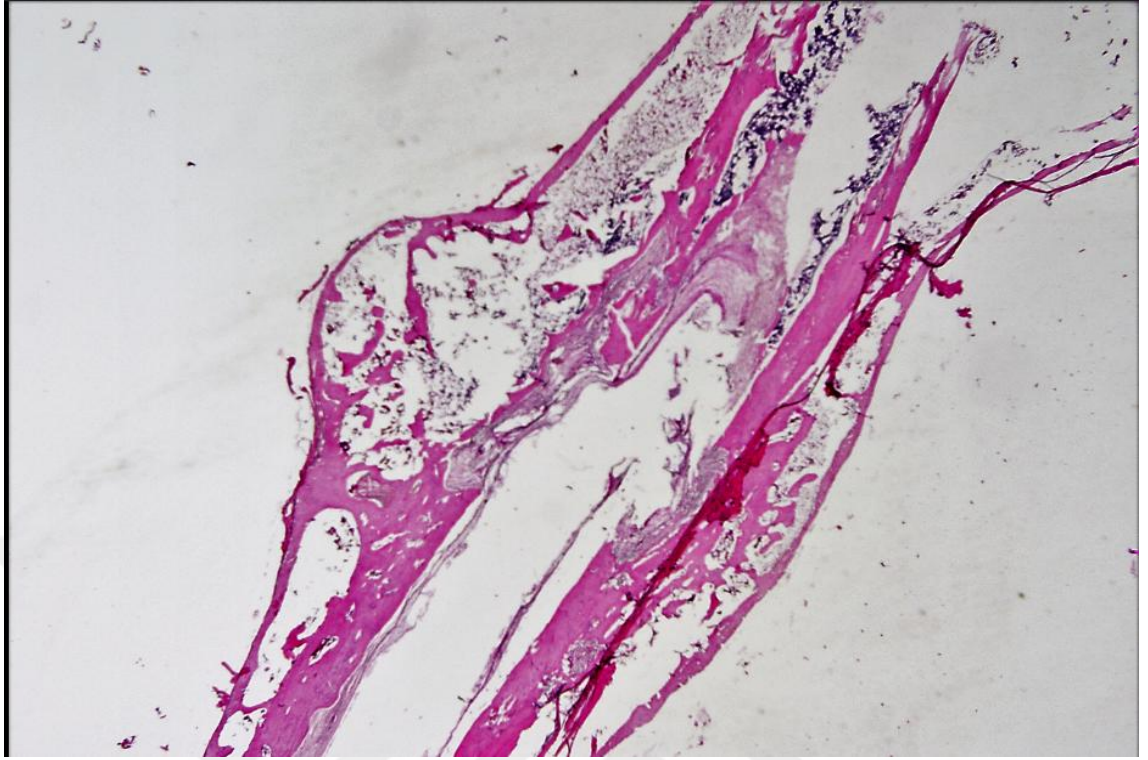
Omega-3 PUFA ve D vitamininin birlikte verildiği grupta (Grup IV) 6. haftanın sonunda radyolojik olarak kaynama izlendi. Histopatolojik değerlendirmede de uyumlu olarak oniki ratın hepsinde osteotomi hattında matür-immatür kemik doku ile iyileşme görüldü (Şekil 16).



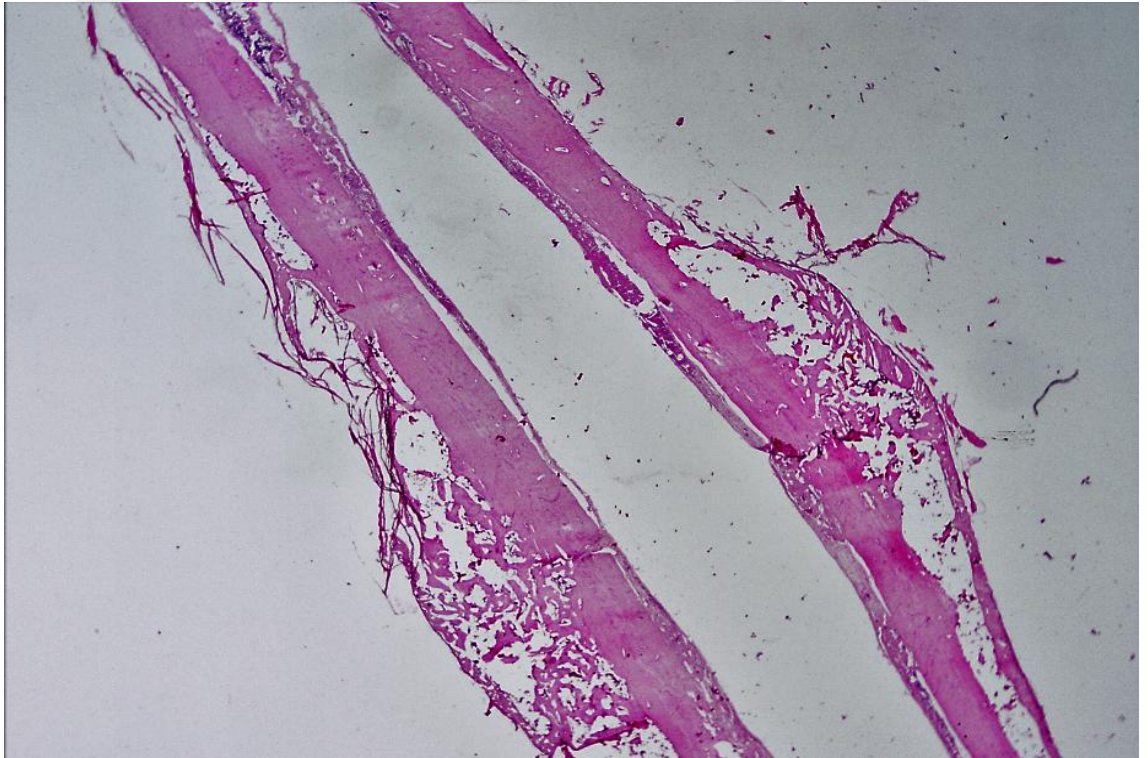
Şekil 13. Grup I' in osteotomi hattının sakrifikasyon sonrası mikroskopik görünümü



Şekil 14. Grup II' nin osteotomi hattının sakrifikasyon sonrası mikroskopik görünümü



Şekil 15. Grup III' ün osteotomi hattının sakrifikasyon sonrası mikroskopik görünümü



Şekil 16. Grup IV' ün osteotomi hattının sakrifikasyon sonrası mikroskopik görünümü

4.3. Biyomekanik Sonuçların Karşılaştırılması

Biyomekanik değerlendirmede yapılan üç nokta kırma (bending) testinde elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında en yüksek skorların kontrol grubu (grup I) ve omega-3 PUFA'nin verildiği üçüncü grupta (grup III) olduğu görüldü (Tablo 10-11). Grup I'in ortalama değeri 400,575, grup II'nin ortalama değeri 46,910, grup III'ün ortalama değeri 396,159 ve grup IV'ün ortalama değeri 281,224 olarak bulundu (Tablo 12). Gruplararası istatistiksel değerlendirme için yapılan Kruskal Wallis testinde $p=0,149$ olarak saptanmış olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

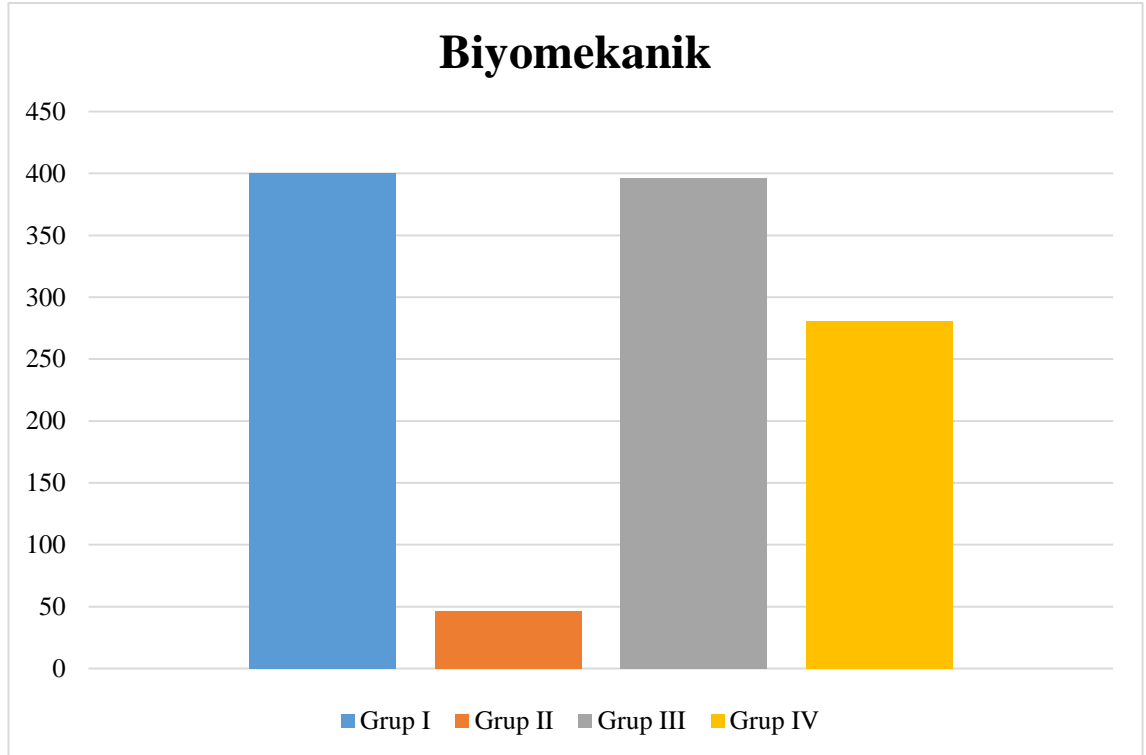
Tablo 10. Grup I ve II' de saptanan biyomekanik sonuçlar ve ortalama değerleri

	Denek No	Maksimum güç (Newton)	Ortalama
Grup I	7	469,462	400,575
	8	448,738	
	9	537,732	
	10	302,690	
	11	351,972	
	12	292,809	
Grup II	7	82,749	46,910
	8	16,347	
	9	21,084	
	10	39,748	
	11	67,120	
	12	54,413	

Tablo 11. Grup III ve IV’ de saptanan biyomekanik sonuçlar ve ortalama değerleri

	Denek No	Maksimum g¼c (Newton)	Ortalama
Grup III	7	154,660	396,159
	8	64,287	
	9	463,846	
	10	1144,82	
	11	341,434	
	12	207,908	
Grup IV	17	418,678	281,224
	8	67,510	
	9	704,538	
	10	25,204	
	11	135,297	
	12	36,864	

Tablo 12. Gruplar arasında biyomekanik skorların ortalaması

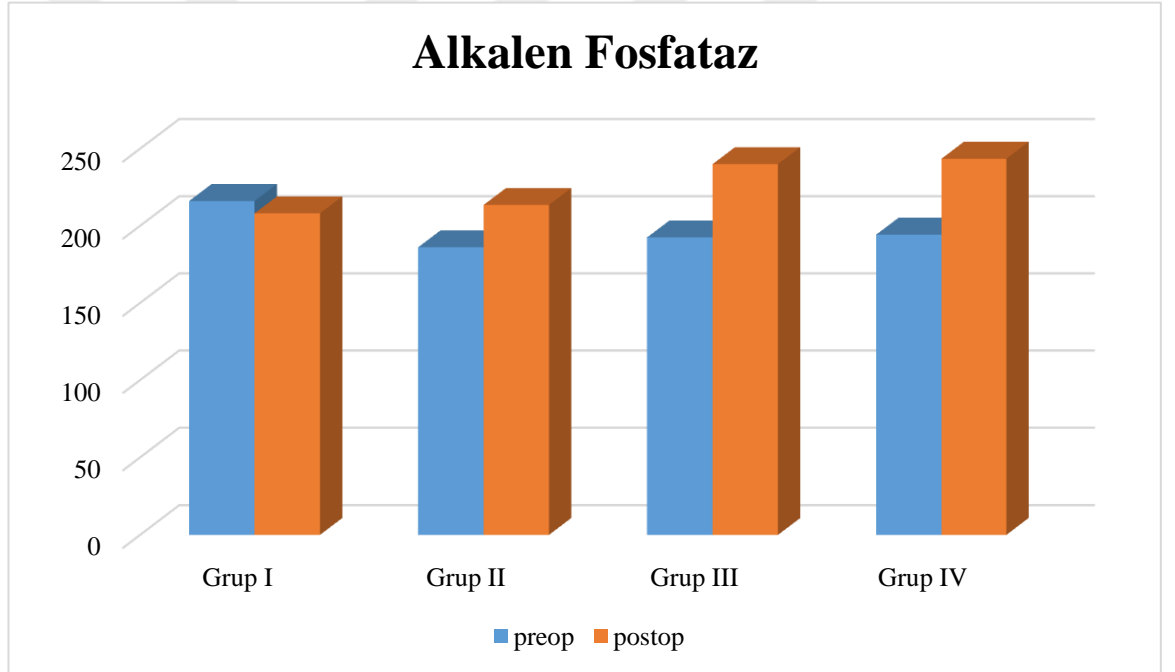


4.4. Biyokimyasal Sonuçların Karşılaştırılması

4.4.1. Alkalen Fosfataz

Deneklerden preop ve postop şeklinde alınan kan numunelerinden ALP çalışıldı. Grupların ortalama değerleri saptandı (Tablo 13). Grup içi istatistiksel olarak Wilcoxon Signed testi ile karşılaştırıldı. Tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Tüm postop gruplar Kruskal Wallis testi ile birbirleriyle karşılaştırıldıklarında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 13. Grupların ortalama ALP değerleri

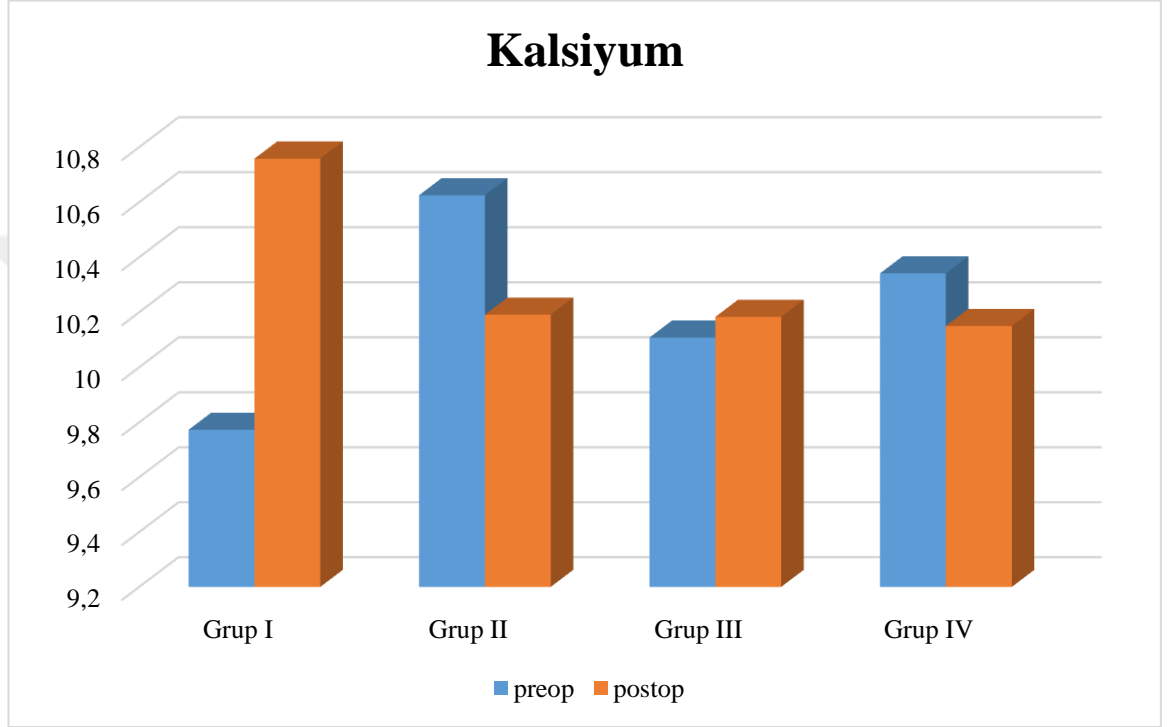


4.4.2. Kalsiyum

Deneklerden preop ve postop şeklinde alınan kan numunelerinden Ca^{+2} çalışıldı. Grupların ortalama değerleri saptandı (Tablo 14). Grup içi preop ve postop değerler istatistiksel olarak Wilcoxon Signed testi ile karşılaştırıldığında, grup I'de ve grup II'de istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşıldı ($p<0,05$). Grup III ve grup IV'te ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Tüm postop gruplarda Ca^{+2} değerlerine bakıldığında en düşük değerlerin grup III ve grup IV'de olduğu görüldü.

Kruskal Wallis testi ile postop değerler birbirleriyle karşılaştırıldıklarında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

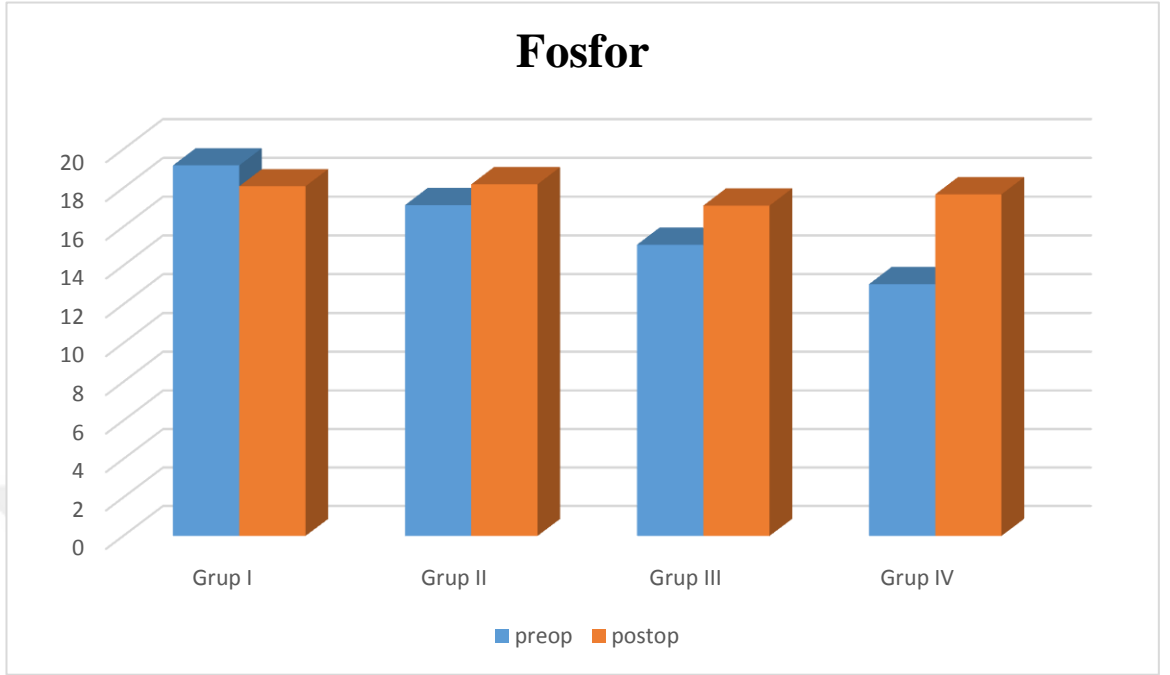
Tablo 14. Grupların ortalama kalsiyum değerleri.



4.4.3. Fosfor

Deneklerden preop ve postop şeklinde alınan kan numunelerinden P çalışıldı. Grupların ortalama değerleri saptandı (Tablo 15). Grup içi preop ve postop P değerleri istatistiksel olarak Wilcoxon Signed testi ile karşılaştırıldı. Grup IV’de preop ve postop P değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşıldı ($p<0,05$). Grup I, II ve grup III’de ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Tüm postop gruplarda ortalama P düzeylerinin benzer olduğu görüldü ve Kruskal Wallis testi ile birbirleriyle karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak sadece grup II ile grup III arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$).

Tablo 15. Grupların ortalama fosfor değerleri



5. TARTIŞMA

Kırık kemik iyileşmesi günümüzde önemini koruyan ortopedik sorunlardan birisidir, öyleki literatürde kırık iyileşmesi ve kaynamama üzerine birçok çalışma vardır. Kırık iyileşmesini; yüksek enerjili travmalar ve geniş yumuşak doku hasarı, kırık uçların birbirinden ayrılması, araya yumuşak dokuların girmesi (interpozisyon), besleyici damarların hasar görmesi, yapılan cerrahi redüksiyon sırasında aşırı disseksiyon ve yumuşak doku hasarı yapılması, kırığın transvers, parçalı veya segmenter olması (spiral ve oblik kırıklar daha çabuk kaynar), açık kırık (hematomun boşalması, kontaminasyon ve enfeksiyon olasılığı ve aşırı yumuşak doku hasarı nedeniyle), redüksiyonun başarısızlığı ve yetersiz stabilizasyon, yetersiz immobilizasyon, enfeksiyon, ileri yaş, eklem içi kırıklar (sinovyal sıvının kırık iyileşmesini bozucu etkisi nedeniyle), kırık öncesi patolojik durum varlığı, spongios kemik içermeyen veya kortikal kemik içeriği yüksek kırıklar, beslenme ve sağlıklı metabolizmayı etkileyen her türlü sistemik hastalık (diabet, maligniteler, sistemik enfeksiyonlar, anemiler vb), kemoterapi, radyoterapi, sigara bağımlılığı (nikotin), kortikosteroidler gibi birçok olumsuz etkileyen faktör olması, ortopedi doktorlarını kırık iyileşmesini olumlu etkileyecek ve hızlandıracak tedavi yöntemlerini bulmaya itmiştir.

D vitamini ve metabolitleri kemik metabolizması ve kırık iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Kırık sonrası kırık iyileşme sürecinde D vitamini düzeylerinde düşüş bildiren çalışmalar bulunmakta olup, literatürde vitamin D3'ün kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Bu yapılan deneysel çalışmalarda D vitamini uygulamasının günlük doz veya tek yüksek doz şeklinde olduğu görülmektedir.

Literatürdeki bu hayvan çalışma modellerinde uygulanan tek yüksek doz yola çıkılarak bu çalışmada da D3 vitamininin tek başına ve omega-3 PUFA ile kombine edilerek deneklere uygulanması temel olarak alındı. Ömeroğlu ve ark., Akkaya ve ark. yapmış oldukları çalışmalarda D3 vitamininin tek yüksek doz olarak, 50.000 IU/kg olacak şekilde uyguladıkları görüldü (86, 87). Yine başka bir çalışmada Hussain ve ark. tavşanlarda yaptığı çalışmada yine tek yüksek doz 50.000 IU/kg olarak uygulandığı görüldü (88). Biz de bu bilgiler ışığında toksik olmayan dozda vitamin D3'ü 50.000 IU/kg uyguladık.

Yapılan literatür taramalarında birçok branşta bilimsel çalışma yapılması ve hatta kullanılmasına rağmen omega-3 PUFA'nin Ortopedi ve Travmatoloji alanında kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin çalışılmamış olduğunu gördük. Buradan hareketle omega-3 PUFA'nin deneysel kırık iyileşmesindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla sadece omega-3 PUFA içeren preparatı kullandık. Bununla beraber omega-3 yağ asidi kullanılarak yapılan çalışmalar incelendiğinde Mancilla ve ark. ratlarda yapmış oldukları çalışmada omega-3 PUFA etkilerine bakmak için günlük uyguladıkları dozun 300mg/kg olduğu görüldü (89). Yine Trofimiuk ve ark., Umegaki ve ark. yaptıkları çalışmalarda da ratlara omega-3 PUFA günlük 300 mg/kg olarak verildiği görüldü (90,91). Biz de bu bilgiler ışığında ratlara verdiğimiz omega-3 PUFA miktarını literatürdeki bu çalışmalara dayanarak tek başına ve vitamin D3 ile kombine ederek günlük 300mg/kg dozunda uyguladık

Li ve ark. omega-3 PUFA'nin antiinflamatuvar etkileri arasında IL-1, IL-2 ve makrofaj göçünü inhibe edici faktör gibi proenflamatuvar sitokinlerin salınımını baskıladığını da tespit etmişlerdir (92).

Martinez-Ramirez ve ark. yaptığı çalışmada 65 yaş üzeri 167 hastada omega-3 PUFA ve omega-6 PUFA tüketiminin osteoporotik kırıkla ilişkisini incelemişlerdir. Omega-3 PUFA tüketiminin kemik kırılabilirliğine olumlu ya da olumsuz bir ilişki olmadığı fakat omega-6 PUFA tüketimi yüksek olanlarda (>188g/d) riskin belirgin olarak arttığı bulunmuştur (93).

Orchard ve ark. postmenapozal kadında yapmış olduğu incelemede düşük EPA ve DHA ile yüksek omega-6 PUFA alımının kırık riskinde orta düzeyde azalma ile ilişkilendirmişlerdir. Buna karşılık yüksek EPA+DHA alımının minimal kırık riski artışı

ile ilişkilendirmişlerdir. İlginç olan bu çalışmada yüksek EPA ve DHA tüketimi olan hastaların düşük kalsiyum ve D vitamini almalarına rağmen kırık riskinde minimal artışın olmasıdır. ALA veya EPA+DHA alımı ile kalça kırığı arasında ilişki görülmemiştir (94).

A.Casado-Diaz ve ark. yaptığı çalışmada postmenopozal kadınlarda omega-3 PUFA'ndan zengin balık yağı alımının osteoporoz riskini azaltıp KMY'nu arttırdığı görülmüştür. Omega-3 PUFA kemik koruyucu etkisinin antiinflamatuvar etkisinden kaynaklandığı düşünülmüş olup, aynı çalışmada yüksek omega-6/omega-3 PUFA oranı içeren diyet ile beslenen kişilerde ortaya çıkan kardiyovasküler sorunların yanında kemik iliğinde mezenşimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşmasını artırarak osteoblast formasyonunu inhibe ettiği ve bu durumun kemik üzerine olumsuz etkisinin olduğu bulunmuştur (95). Diğer yandan uygun omega-6/omega-3 PUFA oranının yaşlanmayla beraber gelişen kemik patolojilerini önlemede etkili olduğu gösterilmiştir (96).

Tamara B Harris ve ark. yapmış olduğu çalışmada 66-96 yaş arası osteoporotik kırıklar belirlenip (540 kırık hastası, 898 kontrol hastası) 5-9 yıllık takip süresinde balık yağı alımı sorgulanarak değerlendirilmiştir. Erkek grupta yüksek PUFA alımının düşük kırık riskiyle ilişkili olduğu, bayanlarda omega-3 PUFA tüketiminin kırık riskiyle ilişkili olmadığı sonucuna varmışlardır. Bayanlarda orta düzeyde omega-6 PUFA ve AA alımının kırık riskiyle ilişkili olduğu günlük balık yağı tüketiminin ileri yaş erkekler ile orta yaş bayanlarda kırık riskini düşürdüğü gösterilmiştir (97).

15'er rattan oluşan gruplar farklı oranlarda omega-6/omega-3 PUFA içeren standart diyetlerle beslenmiş.1/2 oranında omega-6/omega-3 PUFA oranı olan grupta kemik formasyonunda minimal artış görülmüştür (98).

Rousseau ve ark. yapmış olduğu çalışmada 60 yaş üzeri 247 hasta ya değişik oranlarda omega-3 PUFA ve/veya omega-6 PUFA vererek KMY'nu değerlendirmişlerdir. Total omega-3 PUFA alımının, omega-6 PUFA ile karşılaştırıldığında total femur KMY'na anlamlı olarak olumlu etkisi gösterilmiştir. Total omega-6 PUFA ile değişik oranlarda omega-3/omega-6 PUFA verilen grupların KMY ile olumlu ilişkisi bulunmamıştır (99).

Aydoğan ve ark. D vitamini ve bifosfonatın kırık iyileşimi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada 24 adet rat; A grubu kontrol grubu (n:6), B grubu bifosfonat (10mg/gün) verilen grup (n:6), C grubu bifosfonat ve D vitamininin beraber verildiği grup (n:6), D grubu ise sadece D vitamini verilen (n:6) grup olarak belirlenip 4 gruba ayrılmış. 28 günün sonunda sakrifikasyon işlemi yapılarak Kruskal-Wallis testi ile radyolojik skorlar karşılaştırılmış. En yüksek skorları B ve C grubunun aldığını fakat istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulamamışlardır (p=0,512) (100).

Aslan ve ark.'nın 40 rat ile yaptıkları ratlarda kırık iyileşmesine vitamin D3 ve kalsiyumun etkilerinin araştırıldığı çalışmasında ratlar grup A (n:10) kalsiyum uygulanan (9 mg/gün) grup, grup B (n:10) vitamin D3 uygulanan (50.000 IU/kg) grup, grup C (n:10) kalsiyum ve vitamin D3 kombinasyonu uygulanan grup ve grup D (n:10) kontrol grubu olarak 4 gruba ayrılmışlar. Ratların tibiaları osteotomi sonrası Kr teli ile fikse edilmiş. 3 hafta sonra tüm ratlar sakrifiye edilerek histolojik biyomekanik ve radyolojik olarak karşılaştırıldığı sonuç olarak ortalama radyolojik skorların grup D için 1.6 ± 0.8 ; grup A için 1.7 ± 0.8 ; grup B için 2.3 ± 0.8 ve grup C için 2.4 ± 0.7 olduğu bulunmuş ve istatistiksel açıdan yalnızca C ve D grubunun radyolojik skorları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p= 0.037) (101).

Fu ve ark. ratlarda yapmış olduğu çalışmada ratlara overyektomiye takiben 12. haftada bilateral femurlarına osteotomi sonrası fiksasyon yapıldıktan sonra 40 rat iki gruba ayrılarak, bir gruba orta zincirli trigliserid diğer gruba da 1-25(OH)₂D vitamini sakrifiye edilene kadar (Ratların yarısı 6. hafta diğer yarısı 16. hafta sakrifiye edilmiş) gastrik lavaj ile verilmiş olup 6 hafta sonra yapılan radyolojik değerlendirmede 1-25(OH)₂D vitamini verilen grupta kırık hattının daha az belirgin olduğu, 16 haftanın sonunda ise kırık hattının her iki grupta da belirgin olmadığını tespit etmişlerdir (102).

Bizim yaptığımız çalışmanın radyolojik açıdan Lane-Sandhu skorlama sistemine göre incelediğimizde aldığı puan ortalamalarına bakıldığında en yüksek değerlerin omega-3 PUFA verilen grup III ve vitamin D3 + omega-3 PUFA verilen grup IV'de olduğu görüldü. İstatistiksel olarak yapılan Kruskal Wallis testinde kontrol grubuyla (grup I) grup IV arasındaki fark anlamlı bulundu (p=0,001). Ayrıca sadece vitamin D3 verilen grup II ile vitamin D3 + omega-3 PUFA verilen grup IV arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,003). Buna göre radyolojik olarak kaynama bulguları

açısından bakıldığında vitamin D3 ve omega-3 PUFA kombinasyonunun olumlu etkileri olduğu görülmektedir.

Aydoğan N. ve ark. D vitamini ve bifosfonatın kırık iyileşimi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmanın histolojik skorları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında en yüksek skorları B ve C grubunun aldığını bunun da istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.038$) olduğunu göstermişlerdir. Grup A ve B ($p=0,017$), Grup A ve C($p=0,009$), Grup B ve D ($p=0,043$), Grup C ve D ($p=0,037$) arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulmuşlar. Grup B ve C arasında ise ($p=0,326$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır (100).

Aslan ve ark.'nın ratlarda kırık iyileşmesine vitamin D3 ve kalsiyumun etkilerini araştırdıkları çalışmada histolojik incelemede ortalama histolojik skorun kontrol grubu için 5.6 ± 2.7 ; kalsiyum grubu için 6.0 ± 2.7 ; vitamin D grubu için 7.0 ± 2.1 ve kalsiyum ve vitamin D grubu için 7.2 ± 1.9 olarak bulmuşlardır. En yüksek skorları kalsiyum ve vitamin D grubunun aldığını fakat istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir ($p > 0.05$) (101).

Fu ve ark. ratlarda yapmış olduğu çalışmanın histolojik değerlendirmesinde 1-25(OH)₂D vitamini verilen grupta kal dokusunun daha iyi remodelize olduğu göstermiştir (102).

Bizim çalışmamızda histolopatolojik değerlendirme için Huo ve ark. (85)'nin daha önce tanımladığı skorlama sistemi kullanıldı. Grupların aldığı skora bakıldığında yapılan istatistiksel çalışmalarda gruplar arası anlamlı fark olmadığı saptansa da ($p=0,547$) en yüksek skorları yine omega-3 PUFA verilen grup III ve grup IV'ün aldığı görüldü.

Ömeroğlu ve ark.'nın yüksek doz D vitaminini tek doz olarak uyguladıkları deneysel kırık iyileşme modelinde çalışma grubuna 50.000 IU/kg D vitamini tek doz olarak uygulandıktan sonra biyomekanik değerlendirme yaptıkları çalışmada tek doz vitamin D uygulamasının kırık sahasındaki yük dayanıklılığı ve rijiditeyi arttırdığı ve yapılan Mann-Whitney U testi ile aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir ($p = 0.015$) (103).

Hussain ve ark.'nın yüksek doz D vitamininin tek doz uygulanarak yaptığı bir başka çalışmada ratların tibialarını biyomekanik açıdan üç nokta eğme testi ile

karşılaştırmışlardır. Kontrol grubunun değerleri minimal olarak daha yüksek bulunmuş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (88).

Aslan ve ark.'nın ratlarda kırık iyileşmesine vitamin D3 ve kalsiyumun etkilerini araştırdıkları çalışmanın biyomekanik incelemesinde ise çalışma gruplarında (kalsiyum, vitamin D, kalsiyum+vitamin D verilen gruplar) mekanik dayanıklılığın arttığı, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında kırık yüklenme değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p=0.000$). Fakat kalsiyum grubu ve vitamin D grubunun kırık yüklenme değeri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.208$) (101).

Bir başka çalışmada oluşturulan deneysel femur kırığı sonrası ratlar iki gruba ayrılarak; ilk gruba 25-(OH) D vitamini verilip diğer gruba ise herhangi bir etken madde verilmeyerek kontrol grubu oluşturulmuş. 5 hafta sonra hayvanların femurları sakrifiye edildikten sonra yapılan biyomekanik çalışmanın sonucunda yapılan karşılaştırmada 25-(OH) D vitamini verilen grupta olumlu sonuçların olduğu ve istatistiksel olarak da anlamlı sonuç çıktığı görülmüştür ($p<0.01$). İnsanlarda yapılacak çalışmada da benzer sonuçlar elde edilirse yaşlılardaki kırık iyileşmesine olumlu katkı sağlamanın alternatif bir yolu olabileceğini önerilmiştir (104).

Fu ve ark. ratlarda yapmış olduğu çalışmanın biyomekanik değerlendirmesinde 6. haftanın sonunda 1-25(OH)₂D vitamini verilen grubun biyomekanik verilerinin diğer gruba göre yaklaşık bir kat daha fazla olduğu ($p=0,001$), 16. haftadaki biyomekanik verilerinde ise 1-25(OH)₂D₃ vitamini verilen grupta daha iyi olduğu gösterilmiştir (102).

Bir başka çalışmada Lindgren ve ark. 16 tavşanın tibialarını kapalı kırık sonrası Kr teli ile fikse ettikten sonra iki gruba ayırıp, kontrol grubu sakrifiye edilene herhangi bir madde verilmeden takip edilip diğer çalışma grubuna sakrifiye edilene kadar günlük 75ng subkutan 1,25(OH)₂D₃ uygulamış oldukları çalışmadaki biyomekanik test sonucunda kontrol grubunda dayanıklılık değeri 101 ± 21 N çalışma grubunda ise dayanıklılık değeri 57 ± 8 N bulunmuştur. Sonuç olarak burada diğer çalışmaların aksine 1,25(OH)₂D₃ ün biyomekanik açıdan olumsuz yönde etki ettiği saptanmıştır ($p<0,05$) (105).

Yine Lidor ve ark.'nın civcivler üzerinde yaptığı çalışmada açık tibia kırığı sonrası herhangi bir tespit yapılmadan bir grup kontrol grubu, diğer grup da lokal olarak 1.8 µg verilen 1,25(OH)₂D₃ grubu oluşturmuş. 2 hafta sonra yapılan sakrifikasyon sonrası yapılan biyomekanik karşılaştırmada 1,25(OH)₂D₃ verilen grubun torsiyona dayanıklılığının daha az olduğu bulunmuştur (p<0,05) (106).

Bizim çalışmamızda biyomekanik açıdan bakıldığında en yüksek puan ortalamaları kontrol grubu ve omega-3 PUFA verilen grup olan grup III 'ün aldığı görüldü. Yapılan karşılaştırmada ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0,149). D vitamini ile ilgili literatürde yapılan biyomekanik çalışmalarda olumlu veya olumsuz yönde etki ettiğine dair sonuçlar bulunmuş olup çalışmamızda da literatürdeki bazı çalışmalara benzer şekilde D vitamininin biyomekanik açıdan olumsuz yönde etki ettiği saptandı.

Kommenou ve ark.'nın yaptığı çalışmada 83 köpekte uzun kemik diafizler kapalı kırık oluşturulduktan sonra fiksasyon yapılmış olup, kaynama dokusunun hacmine göre; A grubu (n:35) orta düzeyde kal dokusu ve 2 hafta içinde kaynama bulgularının olduğu grup olarak, B grubu (n:36) hipertrofik kal dokusu ile beraber gecikmiş kaynamanın olduğu grup olarak, C grubu (n:12) minimal kal dokusu ile beraber gecikmiş kaynamanın olduğu grup olarak 3 gruba ayırdıkları çalışmada deneklerden perioperatif, 10. gün, 20. gün ve 30. gün sonrasında aylık kan örnekleri alınarak serum ALP, Ca⁺², P düzeylerine bakıldığı; grup A ve B'de serum ALP düzeylerinin 10. günde maksimum düzeylere ulaşmış ve 2. ay sonunda A grubunun, 3.-5. ay sonunda B grubunun normal seviyelere geldiği, grup C'de ise en başından beri serum ALP düzeyleri aynı kaldığı görülmüştür. Tüm gruplarda serum Ca⁺² değerlerinin ALP değerleri ile ters orantılı olduğu saptanmış, yalnızca B grubundaki Ca⁺² düzeylerindeki değişiklikler anlamlı bulunmuştur. Yine aynı şekilde serum P düzeyleri de ALP düzeyleri ile ters orantılı olarak bulunmuş ve B grubundaki P düzeylerindeki değişiklikler de anlamlı bulunmuştur (107).

Herrmann ve ark. 13 tibia ve 1 femur kırığı olan ve hiçbir ek patolojisi olmayan toplam 14 hastada yapmış oldukları çalışmada hastalardan perioperatif 28. ve 42. günlerde alınan kan örneklerinden ALP düzeylerini değerlendirme amaçlı olarak gruplar 6 ay içinde kaynayan (n:12) ya da gecikmiş kaynama (n:2) şeklinde 2 grup olarak

belirlenmiştir. 28. ve 42. günlerdeki ALP düzeylerinin kaynama grubunda belirgin olarak arttığı 42. ile 90. günler arası maksimum seviyelere ulaştığı bulunmuştur. Gecikmiş kaynama grubunda başlangıç ALP düzeylerinin yüksek olduğu ve çalışma boyunca artma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada kırık sonrası ilk iki ayda ALP'nin ardışık ölçülmesinin, gecikmiş kırık iyileşmesinin bir belirteci olarak kullanılabilceği düşünülmüştür (108).

Muljačić ve ark. 33 tibia kırığı ve 8 femur kırığı olan cerrahi geçiren 41 hastada yapmış olduğu bir başka çalışmada erken posttravmatik fazda biyokimyasal parametre olarak kemik-spesifik ALP düzeylerinin kırık iyileşme hızını gösterip göstermediğini incelemişlerdir. Bu çalışmada perioperatif, 7., 14. ve 21. günlerde alınan kandan serum ALP ve kemiğe spesifik ALP düzeylerine bakılmış ve eş zamanlı olarak kırık kaynaması da değerlendirilmiştir. Tibia grubunda 21. gündeki kemiğe spesifik ALP düzeylerinin diğer günlere göre anlamlı yüksek olduğu, femur grubunda da aynı şekilde 21.gün kemiğe spesifik ALP düzeylerinin diğer günlere göre anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur. Her iki grupta da serum ALP değeri ile kemiğe spesifik ALP düzeylerinin birbiriyle korele olduğu ve sonuç olarak ALP ve kemik-spesifik ALP gibi biyokimyasal parametrelerin değişimlerini izleyerek kemik iyileşmesini öngörebileceği sonucuna götürmüştür (109).

Nilsson ve ark. 63 femur boyun kırığı olan ve cerrahi yapılan hastalarda yapmış olduğu çalışmada serum Ca^{+2} , P, ALP değerlerini perioperatif, 1., 2., 4., ve 8. hafta alınan kan numuneleri ile karşılaştırmışlardır. ALP değerleri 1. haftada pik yaparken postop 8. haftada normal değerlere düştüğü, P düzeyinin yavaşça artıp 2.-3. haftalarda pik yapıp 8. haftada normal değerlere düştüğü ve Ca^{+2} değerlerinin ise ilk bir ay düşük olup takip sırasında ilerleyen dönemlerde normal değerlere geldiği görülmüştür (110).

Kanwar ve ark. izole uzun kemik kırıkları olan 50 hastada yapmış oldukları çalışmada cerrahi sonrası serum ALP düzeylerine perioperatif, 2.gün 3.ve 6. hafta ve 3., 6. aylarda bakılmış. Gruplar kaynamalarına göre normal kaynama grup A (n:33), gecikmiş kaynama grup B (n:11), nonunion ise grup C (n:6) olarak belirlenmiştir. Başlangıçta bütün hastaların serum ALP düzeyleri aynı bulunmuştur. ALP düzeylerinin grup A ve B de 6. haftada maksimum düzeye ulaştığı, grup C'de ise başlangıçtan beri takip süresince ALP düzeylerinde pek bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. A grubundaki yükselme B

grubuna göre anlamlı yüksek olduğu ve kaynama sonrası grup A'da normale dönüş varken grup B'deki yüksekliğin 6 aya kadar sürdüğü bulunmuştur. Bu çalışmada serum ALP düzeylerinin kırık iyileşmesi süreciyle iyi korelasyon göstermesine rağmen, yapılan başka çalışmalarda ALP'in kemik izoenziminin, kemik oluşumu için daha spesifik belirteç olduğu düşünülmüştür (111).

Bizim yaptığımız çalışmada da grupların başlangıç ALP değerlerinin birbirine yakın olduğu görüldü. Sakrifikasyon öncesi alınan kan numunesindeki ALP düzeyleri karşılaştırıldığında grup III ve grup IV'ün ALP değerlerinin diğer gruplara göre yüksek olduğu görüldü. Fakat istatistiksel çalışmada anlamlı bir fark bulunamadı. Literatürle uyumlu olarak radyolojik ve histopatolojik olarak kaynamanın en iyi olduğu gruplar olan grup III ve grup IV'de ALP düzeyleri yüksek bulundu.

Grupların ortalama postop Ca^{+2} değerlerine bakıldığında kontrol grubu dışındaki gruplarda düşük olduğu görüldü. İstatistiksel açıdan grup içi preop ve postop karşılaştırıldığında grup I de pozitif anlamlı, grup II'de ise negatif anlamlı bir fark bulundu. Tüm postop gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark bulunamadı. Literatürle uyumlu olarak radyolojik ve histopatolojik olarak kaynamanın en iyi olduğu gruplar olan grup III ve grup IV'de Ca^{+2} düzeyleri düşük bulundu.

Grupların ortalama preop ve postop P değerlerinin birbirlerine yakın olduğu görüldü. Grup içi postop değerler karşılaştırıldığında sadece grup II ve grup III arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Literatürden farklı olarak ortalama P değerlerinin radyolojik ve histopatolojik olarak kaynamanın en iyi olduğu gruplar olan grup III ve grup IV'de P düzeyleri yüksek bulundu.

6. SONUÇLAR

1- Histopatolojik ve radyolojik değerlendirmelerde kaynama açısından en yüksek ortalama skorlar omega-3 PUFA grubu ve vitamin D3 ile kombine edilen omega-3 PUFA grubunda bulundu. Buna göre histopatolojik ve radyolojik olarak omega-3 PUFA'nin kırık kaynaması üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır.

2- Biyomekanik açıdan bakıldığında ise üç nokta kırma testinde elde edilen en yüksek skor ortalamaları kontrol grubu ve yalnızca omega-3 PUFA verilen grupta bulundu. Omega-3 PUFA vitamin D3 ile beraber verildiğinde histopatolojik ve radyolojik olarak kaynama üzerine olumlu etkilere sahip olmasına rağmen, bu kombinasyon biyomekanik olarak olumsuz etki gösterebilmektedir.

3- Biyokimyasal olarak bakıldığında kaynama sürecinde kaynamanın en iyi olduğu gruplar olan omega-3 PUFA ve vitamin D3 ile beraber omega-3 PUFA verilen gruplarda ALP değerlerinin diğer gruplardan yüksek olduğu, Ca^{+2} değerlerinin ise düşük olduğu görüldü. Buna göre ALP ve Ca^{+2} değerlerinin takibi kırık kaynaması hakkında bir belirteç olarak kullanılabilir.

Sonuç olarak; bu çalışmada omega-3 PUFA'nin vitamin D3 ile beraber kullanımının deneysel kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkileri bulunmuştur. İleri dönemlerde klinik çalışmalarla beraber kırık iyileşmesinde omega-3 PUFA ve vitamin D3 kombinasyonu destekleyici bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Ege R. Kırıkların Etyopatolojisi. Travmatoloji, 4. Cilt, Kadioğlu Matbaacılık, Ankara, 2-61, 1989.
2. Wood G. General principles of fracture treatment. In: Canale (Ed) Campbell's Operative Orthopaedics, Mosby, Philadelphia, 2669-70, 2003.
3. Horrobin DF. The regulation of prostaglandin biosynthesis by the manipulation of essential fatty acid metabolism. Rev Pure Appl Pharmacol Sci 1983; 4: 339-83
4. Coetzer H, Claassen N, van Papendorp DH, Kruger MC. Calcium transport by isolated brush border and basolateral membrane vesicles: role of essential fatty acid supplementation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1994;50:257-66
5. Lukas R, Gigliotti JC, Smith BJ, Altman S, Tou JC. Consumption of different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids by growing female rats affects long bone mass and microarchitecture. Bone 2011;49:455-62.
6. Basse EJ, Littlewood JJ, Rothwell MC, Pye DW. Lack of effect of supplementation with essential fatty acids on bone mineral density in healthy pre- and postmenopausal women: two randomized controlled trials of Efacal v. calcium alone. Br J Nutr 2000;83:629-35
7. Zwart SR, Pierson D, Mehta S, Gonda S, Smith SM. Capacity of omega-3 fatty acids or eicosapentaenoic acid to counteract weightlessness-induced bone loss by inhibiting NF-kappaB activation: from cells to bed rest to astronauts. J Bone Miner Res 2010;25:1049-57
8. Banu J, Bhattacharya A, Rahman M, Kang JX, Fernandes G. Endogenously produced n-3 fatty acids protect against ovariectomy induced bone loss in fat-1 transgenic mice. J Bone Miner Metab 2010;28:617-26.
9. Weiler HA, Fitzpatrick-Wong SC. Modulation of essential (n-6):(n-3) fatty acid ratios alters fatty acid status but not bone mass in piglets. J Nutr 2002;132:2667-72.

10. Mollard RC, Kovacs HR, Fitzpatrick-Wong SC, Weiler HA. Low levels of dietary arachidonic and docosahexaenoic acids improve bone mass in neonatal piglets, but higher levels provide no benefit. *J Nutr* 2005;135:505–12.
11. Watkins BA, Li Y, Seifert MF. Dietary ratio of n-6/n-3 PUFAs and docosahexaenoic acid: actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats. *J Nutr Biochem* 2006;17:282–9.
12. Hogstrom M, Nordstrom P, Nordstrom A. N-3 Fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO2 study. *Am J Clin Nutr* 2007;85:803–7
13. Endres S, DeCaterina R, Schmidt EB, Kristensen SD. n-3 Polyunsaturated fatty acids: update 1995. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 629-638.
14. Bayram N. Histoloji. Anadolu Üniv. Yayınları 1995;125-132
15. Bağcı V. Alt ekstremitte kırıklarının plak ile biyolojik tespiti. Tez çalışması Şişli Etfal Eğitim ve Arş. Hastanesi 2005, İstanbul
16. Kotan LD. Silika metodu ile kemikten DNA ekstraksiyonu. Tez çalışması. Çukurova Üniversitesi 2010, Adana
17. Demirdöver C. Kollajen, hidroksiapatit ve sinir büyüme faktörü'nün, kranial kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine etkileri: Sıçanlarda deneysel çalışma. Tez çalışması. D.E.Ü.T.F 2003, İzmir
18. Kılıçoğlu SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *AÜTF Mecmuası* 2002;55(2):143-150
19. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament In: *Fractures*. Philadelphia, Lippincott Company, 1:147–167, 1984.
20. Altunatmaz K. Kırık iyileşmesinin biyolojisi ve biyolojik osteosentez. *İÜVF dergisi* 2004;30(1):141-147
21. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.*1978;60-B(2):150-62

22. Özeç İ, Öztürk M. Distraksiyon Osteogenezisi Cumhuriyet Üniv. Dişhekimliği Fakültesi Dergisi 2000;3(1):47-51
23. Brinker M R, O'Connor D. Kemik. In: Miller M (Ed) Miller'ın Ortopedi Kitabı. Çeviri editörleri Yetkin H, Yazıcı M, Ankara, Adya, 1-44, 2006.
24. Schenk RK. B, Jupiter J, Levine A, Trafton P (Eds) Biology of fracture. In: Browner Skeletal Trauma. Saunders, Philadelphia, Vol 1: 29-74, 2003.
25. Us AK. Kırıklar hakkında genel bilgiler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü Ders Notları, Ankara, 2005
26. Janssens W, Lehouck A, Carremans C, Bouillon R, MaThieu C, Decramer M. Vitamin D Beyond Bones in Chronic Obstructive Pulmonary Disease:Time to Act. Am J Respir Crit Care Med 2009; 179 :630-636.
27. Khan SN. Bone growth factors. Orthop Clin North Am. 31(3): 375–388, 2000
28. Miller M D. Bone. In: Miller M (Ed) Review of Orthopaedics. Saunders, Philadelphia. 1–22, 1996.
29. Gartner L P, Hiatt J L. Cartilage and bone. Color Textbook of Histology. Saunders, Saint Louis, 114–130, 1997.
30. Jungueria C L, Carnerio J, Kelley O. Bone. In: Basic Histology. Appleton and Lange, New Jersey, 132-151, 1995.
31. Wilkins K. Travma. In: Lynn Staheli (Ed) Pediatrik Ortopedi. Çeviri editörü Yalçın S, Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, 203-260, 2005.
32. Yılmaz C, Erdemli E, Selek H, Kınık H, Arıkan M. The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. Arch Trauma Surg 121: 426–8, 2001.
33. Ozaki A. Role of fracture hematoma and periyosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periyosteum in the initial step of the healing process. J. Orthop. Sci 5(1):64–70, 2000.
34. Brond AR, Rubin TC. Fracture healing. In: Surgery of the Musculoskeletal System. Churchill Livingstone, New York 1: 93-114, 1990

35. Ward A, Clissold S. Pentoxifylline: A review of its Pharmacodynamics and Pharmacokinetic Properties, and its Therapeutic efficacy. *Drugs* 34: 50–97, 1987
36. Dursun A. D vitamininin kemik metabolizması dışındaki etkileri. *Beslenme ve Yemlikler I- II, Katkı Pediatri Dergisi* 2007; 28:225-234.
37. Bringhurst FR, Demoy MB, Kronenberg HM. Vitamin D. *Williams Textbook of Endocrinology* (Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS ed). Tenth edition. Philadelphia, Saunders Elsevier 2003; 1317-1323.
38. Özkan B, Döneray H. Vitamin D eksikliğine bağlı rikets. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2008; 4(5): 38-44.
39. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1678-1688.
40. Arslan D. Yaşlılarda oral ve parenteral D vitamininin etkisi: Prospektif çift kör plasebo kontrollü çalışma. Yandal uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı, Ankara, 2007.
41. Erçin S. 1-24 ay sağlıklı süt çocuklarında serum 25-OHD düzeyi ve etkileri. Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Kliniği, İstanbul, 2008.
42. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring The evidence *Br J Nutr* 2003; 89:552-572.
43. Deluca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1689-1696.
44. Holick MF. Vitamin D status: Measurement, interpretation and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009; 19(2):73-78.
45. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful Health perspective. *Nutr Rev* 2008; 66(10): 182-194.

46. Dong Y, Pollock N, Stallman-Jorgensen IS, Gutin B, Lan L, Chen TC, Keton D, Petty K, Holick MF. Low 25-hydroxyvitamin D levels in adolescents: race, season, adiposity, physical activity, and fitness. *Pediatrics* 2010; 125(6): 1104-1111.
47. Holick MF. The Dilemma: To screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Clinical Chemistry* 2010; 56(5): 729-731.
48. Dawson H B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005;16:713-6.
49. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Orav EJ, Lips P, Meunier PJ, Lyons RA, et al. A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *N Engl J M* 2012;367:40-9.
50. Brumbaugh PF, Speer, DP, Pitt, MJ 19821 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 a metabolite of vitamin D that promotes bone repair *Am J Patho* 1982;11;171-179
51. Herr C, Greulich T, Koczulla RA, Meyer S, The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer, *Respiratory Research* 2011, 12:31.
52. Burton JL. Dietary fatty acids and inflammatory skin disease. *Lancet* 1989; 7: 27-30.
53. Endres S, DeCaterina R, Schmidt EB, Kristensen SD. n-3 Polyunsaturated fatty acids: update 1995. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 629-638.
54. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF. Effects of changes in fat, fish and fibre takes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989; 2: 757-761.
55. Knapp HR, Fitzgerald GA. The antihypertensive effects of fish oil. A controlled study of polyunsaturated fatty acid supplements in essential hypertension. *N Engl J Med* 1989; 320: 1037-1043.
56. Jeeksi LJ, Zerouga m, Stillwell W. Omega-3 fatty acid containing liposomes n cancer therapy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 210(3): 227-233.

57. Yen A, Black HS; Tschen J. Effect of dietary omega-3 and omega-6 fatty acid sources on PUVA-induced cutaneous toxicity and tumorigenesis in the hairless Mouse. *Arch Dermatol Res* 1994; 286: 331-336.
58. DeGomez D, Brenner RR. Oxidative desaturation of alpha linolenic, linoleic and steric acids by human liver microsomes. *Lipids* 1975; 10: 315-317
59. Diboune M, Ferard G, Ingenbleek Y et al. Soybean oil, blackcurrant seed oil, mediumchain triglycerides and plasma phospholipid fatty acids of stressed patients. *Nutrition* 1993; 3(4): 344-349.
60. Brown AJ, Pang E, Roberts DCK. Persistent changes in fatty acid composition of erythrocyte membranes after moderate intake of n-3 polyunsaturated fatty acids: study design implications. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 668-673.
61. Chilton FH, Patel M, Fonteh AN et al. Dietary n-3 fatty acid effects on neutrophil lipid composition and mediator production. Influence of duration and dosage. *J Clin Invest* 1993; 91: 115-122.
62. Morlion BJ, Torwesten F, Lessire A et al. The effect of parenteral fish oil on leukocyte membrane fatty acid composition and leukotriene synthesizing capacity in postoperative trauma. *metabolism clinical and experimental* 1996; 45: 1208-1213.
63. Roulet M, Frascarolo Ph, Pilet M, Chapius G. Effects of intravenously infused fish oil on platelet fatty acid phospholipid composition as platelet function in postoperative trauma. *Jornel of Parenteral Enteral Nutr* 1997; 21: 296-300.
64. Urakaze M, Hamazaki T, Makuta M et al. Infusion of fish oil emulsion: effects on platelet aggregation and fatty acid composition in phospholipids of plasma, platelets and red blood cell membranes in rabbits. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 936-940.
65. Breil I, Koch T, Heller A et al. Alteration of n-3 fatty acid composition in lung tissue after short-term infusion of fish oil emulsion attenuates inflammatory vascular reaction. *Crit Care Med* 1996; 24(11): 1893-1902.

66. Bourre JM, Bonneil M, Dumant O et al. Effect of increasing amounts of dietary fish oil on brain and liver fatty acid composition. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1043: 149152.
67. Nau S, Hirschmüller-Ohmes I, Sturm G, Fürst P. The influence of parenteral n-3 fatty acids on nitrogen and lipid metabolism in rats. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(S): 8215-8225.
68. Fischer S, Weber PC. Prostaglandins formed in vivo in man after dietary eicosapentaenoic acid. *Nature* 1984; 307: 165-168.
69. Wolfrom G. V-3 Fettsäuren-ihir Stoffwechsel und ihre Wirkungen auf vaskuläres System, Fettstoffwechsel und Immun system. *Akt Ernähr Med* 1995; 20: 173-179.
70. Alexander JW. Nutrition and infection: new perspectives for an old problem. *Arch Surg* 1986; 121: 966-672.
71. Endres S, Ghorban R, Kelley VE et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of IL-1 and TNF by mononuclear cells. *N Engl J Med* 1989; 320: 265-271.
72. Bjerve KS. N-3 fatty acid deficiency in man. *J Intern Med* 1989; 225(S): 171-175.
73. Bondreau M, Chanmugam P, Hart S et al. Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidonic acid. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 111-117.
74. Wan Y. PPARgamma in bone homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(12):722-8.
75. Maurin AC, Chavassieux PM, Meunier PJ. Expression of PPARgamma and beta/delta in human primary osteoblastic cells: influence of polyunsaturated fatty acids. *Calcif Tissue Int.* 2005;76(5):385-92
76. Rahman MM, Bhattacharya A, Banu J, et al. Endogenous n-3 fatty acids protect ovariectomy induced bone loss by attenuating osteoclastogenesis. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):1833-44.

77. Sun D, Krishnan A, Zaman K, et al. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res.* 2003;18(7):1206–16
78. Kruger MC, Horrobin DF. Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: a review. *Prog Lipid Res* 1997; 36: 131–151
79. Bhattacharya A, Rahman M, Sun D, Fernandes G. Effect of fish oil on bonemineral density in aging C57BL/6 female mice. *J Nutr Biochem* 2007;18:372–9.
80. Uchida R, Chiba H, Ishimi Y, Uehara M, Suzuki K, Kim H, et al. Combined effects of soy isoflavone and fish oil on ovariectomy-induced bone loss in mice. *J Bone Miner Metab* 2010;29:404–13.
81. Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Journal of Nature* 2004;427:504
82. Bordin L, Priante G, Musacchio E, Giunco S, Tibaldi E, Clari G, et al. Arachidonic acid-induced IL-6 expression is mediated by PKC alpha activation in osteoblastic cells. *Journal of Biochemistry* 2003;42:4485–91
83. Rahman M, Halade GV, Bhattacharya A, Fernandes G. The fat-1 transgene in mice increases antioxidant potential, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and enhances PPAR-gamma and SIRT-1 expression on a calorie restricted diet. *Jornal of Oxid Med Cell Longev* 2009;2:307–16.
84. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987;12: 213-25
85. 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.* 1991;9: 383-90.
86. Ömeroğlu, S. Erdogan, D. & Ömeroğlu, H Effects of single high-dose vitamin D3 on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 1997;116: 37-40

87. Akkaya S¹, Nazalı M, Kılıç A, Bir F. Cefazolin-sodium has no adverse effect on fracture healing in an experimental rabbit model. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi*. 2012 Apr;23(1):44-48
88. Hussain A.Z, Jambu N. Lourdes K.(2016) Does a single high dose of vitamin D3 an effect on fracture healing *International Journal of REsearch in Orthopaedics* 2016 Drc;2(4):260-262
89. Flores-Mancilla LE, Hernández-González M, Guevara MA, Benavides-Haro DE, Martínez A P Long-term fish oil supplementation attenuates seizure activity in the amygdala induced by 3-mercaptopropionic acid in adult male rats.*Epilepsy and Behavior* 2014 Apr;33:126-134.
90. Trofimiuk E1, Braszko JJ. Concomitant docosahexaenoic acid administration ameliorates stress-induced cognitive impairment in rats. *Physiol Behav*. 2013 Jun 13;118:171
91. Umegaki K1, Hashimoto M, Yamasaki H, Fujii Y, Yoshimura M, Sugisawa A, Shinozuka K. Docosahexaenoic acid supplementation-increased oxidative damage in bone marrow DNA in aged rats and its relation to antioxidant vitamins. *Free Radic Res*. 2001 Apr;34(4):427-35
92. Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R ve ark. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK -2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. *Kidney Int* 2005; 67: 867–74.
93. Martinez MJ, Palma S, Martinez MA, et al. Dietary fat intake and the risk of osteoporotic fractures in the elderly. *Eur J Clin Nutr*. 2007; 61(9):1114–1120.
94. Orchard TS, Cauley JA, Frank GC, et al. Fatty acid consumption and risk of fracture in the Women's Health Initiative. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010; 92(6):1452–1460.
95. Casado A , Santiago MR , Dorado GJM , Quesada G. The omega-6 arachidonic fatty acid, but not the omega-3 fatty acids, inhibits osteoblastogenesis and induces adipogenesis of human mesenchymal stem cells: potential implication in osteoporosis *J Osteoporos Int* (2013) 24:1647–1661

96. Salari P, Rezaie A, Larijani B, Abdollahi M A systematic review of the impact of n-3 fatty acids in bone health and osteoporosis. *Med Sci Monit* 2008;14(3):37–44
97. Tamara B Harris, Xiaoling S, Ilse R, Plasma phospholipid fatty acids and fish-oil consumption in relation to osteoporotic fracture risk in older adults: the Age, Gene/Environment Susceptibility Study1–5 *Am J Clin Nutr* 2015;101:947–955.
98. Plotquin D, et al. Prostaglandin release by normal and osteomyelitic human bones. *Journal of PLEFA* 1991;43:13-15.
99. Rousseau JH, Kleppinger A, Kenny AM. Self-reported dietary intake of omega-3 fatty acids and association with bone and lower extremity function. *J Am Geriatr Soc.* 2009;57(10):1781-1788.
100. Aydogan N. Özel I. İltar S. (2015) The effect of vitamin D and Bisphosphonate on fracture healing: An experimental study *Journal of Orthopedics and Trauma* 2016;7(2):90-94.
101. Aslan B., Kalaci A., Bozlar M. (2006) Effect of Vitamin D3 and Calcium on Fracture Healing in Rat Turkey *Klinikleri J Med Sci* 2006, 26:507-513.
102. 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 *j.bone*.2009.01.378. Epub 2009 Feb 5
103. Ömeroglu H, Ates Y, Akkus O, Biomechanical analysis of the effects of single high-dose vitamin D3 on fracture healing in a healthy rabbit model *Orthop Trauma Surg* 1997: 116:271-274
104. Baeke D, Martínez ME, Carrascal MT, Rodríguez AM, Munuera L , Effect of 25-OH-vitamin D on fracture healing in elderly rats *J Orthop Res*, 1998 Nov;16(6):650-3.
105. Lindgren JU, DeLuca HF, Mazess RB. Effects of 1,25(OH)2D3 on bone tissue in the rabbit: studies on fracture healing, disuse osteoporosis, and prednisone osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 1984 Sep;36(5):591-5.

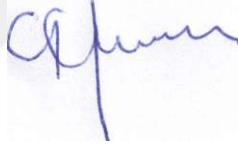
106. Lidor C, Dekel S, Meyer MS, Blaugrund E, Hallel T, Edelstein S, Biochemical and biomechanical properties of avian callus after local administration of dihydroxylated vitamin D metabolites *J Bone Joint Surg Br.*1990 Jan;72(1):137-40.
107. Komnenou A¹, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Dessiris A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(1):35-8.
108. Herrmann M¹, Klitscher D, Georg T, Frank J, Marzi I, Herrmann W. Different kinetics of bone markers in normal and delayed fracture healing of long bones. *Clin Chem.* 2002 Dec;48(12):2263-6
109. Muljacić A, Poljak-GR, Zivković O , Bilić V, Guberina M, Crvenković D. Course and rate of post-fracture bone healing in correlation with bone-specific alkaline phosphatase and bone callus formation. *Coll Antropol.* 2013 Dec;37(4):1275-83.
110. Nilsson BE, Westlin NE. The plasma concentration of alkaline phosphatase, phosphorus and calcium following femoral neck fracture. *Acta Orthop Scand.* 1972;43(6):504-10
111. G. Kanwar, M. Yadav, S. Kumar, S. Kirad , N. Jain Serum Alkaline Phosphatase a prospective biomarker for assessment of progress of fracture healing *Impact Journals* 2014: 3(1);15-20

TUTANAK

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı araştırma görev görevlisi Dr.Yasin Yalçın'ın 07/03/2017 tarihinde yapılan "Ratlarda Omega -3 Poliansatüre Yağ Asitleri ve D Vitamininin Kırık İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması " adlı Tıpta Uzmanlık Tezi Değerlendirme Sınavında başarılı olmuştur. İş bu tutanak tarafımızca imza altına alınmıştır.

Başkan

Prof.Dr. C.Yıldırım TURK



Uye

Prof. Dr. Okay BULUT



Üye

Doç.Dr. İbrahim Halil KAFADAR

