



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

**Dolaşım Bozukluğunun Eşlik Ettiği Kırıklarda Edaravone'un Kırık İyileşmesi Üzerine
Etkisi**

Dr. Sezer ASTAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Yrd. Doç. Dr Murat AŞÇI

TOKAT
2017



**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Dolaşım Bozukluğunun Eşlik Ettiği Kırıklarda Edaravone'un Kırık İyileşmesi Üzerine
Etkisi**

Dr. Sezer ASTAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Yrd. Doç. Dr Murat AŞÇI

TOKAT

2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
RESİMLER	V
ŞEKİLLER	VI
TABLolar	VII
KISALTMALAR	VIII
TÜRKÇE ÖZET	IX
İNGİLİZCE ÖZET	X
1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2-GENEL BİLGİLER	
2.1 Kemik Doku	2
2.1.1 Kemik Histolojisi	4
2.1.2 Kemiğin Hücreleri	6
2.1.3 Kemik Kan Dolaşımı ve Dolaşım Fizyolojisi	9
2.1.4 Kemik Histogenezi	11
2.1.5 Kemik Metabolizması	14
2.2 Kırık İyileşmesi ve Kontrolü	18
2.3 İskemi	29
2.4 Reperfüzyon	30
2.4.1 Serbest Oksijen Radikalleri	31
2.5 Antioksidanlar	37
2.6 Edaravone	40
2.6.1 Edaravone Sistemik Etkileri	43
3- GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1 Deneklerin Hazırlanması ve Operasyon Tekniği	48
3.2 Edaravone'un Hazırlanması	52
3.3 Radyolojik İnceleme	55
3.4 Biyomekanik Değerlendirme	57
3.5 Histopatolojik İnceleme	58
3.6 İstatistiksel Analiz	59

3.7 Deney Grupları.....	59
-------------------------	----

4-BULGULAR

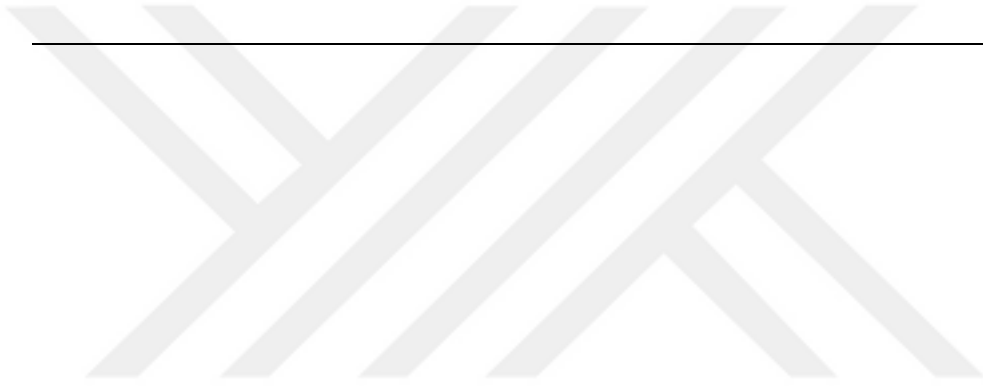
4.1 Radyolojik ve Morfolojik Bulgular	61
---	----

4.2 Histopatolojik Bulgular	67
-----------------------------------	----

4.3 Biyomekanik Bulgular	70
--------------------------------	----

5-TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	76
------------------------------------	-----------

6-KAYNAKLAR.....	82
-------------------------	-----------



TEŞEKKÜR

Asistanlığım boyunca benden bilgisini, tecrübesini esirgemeyen mesleki anlamca gelişmem için gerekli katkısını sunan kıymetli Anabilim Dalı Başkanımız Dr. Bora BOSTAN'a

Benim üzerimde çok emekleri olan kliniğimizin kurucularından saygıdeğer hocam Dr. Taner GÜNEŞ'e

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri, tecrübe, sabır ve hoşgörülerini esirgemeyen, tecrübelerini her fırsatta bizlere aktaran, bilimsel kişiliklerini her zaman örnek alacağım, idealist kişilikleri ve dürüstlükleriyle hayat boyu bize örnek olacak olan, kısacası sadece bir ortopedi ve travmatoloji uzmanı olarak değil, aynı zamanda bir hekim, bir insan olarak yetiştiren, geliştiren saygıdeğer tez hocam Dr. Murat AŞCI'ya, Dr. Erkal BİLGİÇ'e

Asistanlığımda hem ağabey hem de hoca olarak emeği bulunan, tecrübesini ve bilgisini aktaran kıymetli ağabeyim Dr. Orhan BALTA'ya

Aynı ekipte çalışma mutluluğuna eriştiğim değerli ağabeylerim Dr. Kürşat AYTEKİN, Dr. Recep KURNAZ, Dr. Enes ESER ve Dr. Mehmet Burtaç EREN'e uzmanlık eğitimim sürecinde birlikte çalıştığım Dr. Cihan UÇAR, Dr. Harun ALTINAYAK, Dr. Mete GEDİKBAŞ, Dr. Celal BİTİŞ ve Dr.Utkan SOBAY'a ve tüm hemşire kardeşlerime,

Sabrı, fedakarlığı ve sevgisi ile her zaman yanımda olan sevgili eşime, hayatıma kattığı tatlı anlam için biricik oğlum Yusuf Kerem'e

Sonsuz Teşekkürler

Dr.Sezer ASTAN

Tokat-2017

RESİMLER:

	Sayfa
1. Kemiğin morfolojik görünüm	5
2. Osteoprojenitör hücrelerin osteoblast ve diğer hücrelere farklılaşması	9
3. Kemik kanlanması	10
4. Fizis hattı bölgeleri	13
5. İnflamasyon evresi	20
6. Yumuşak kallus oluşma evresi	21
7. Sert kallus oluşma evresi	22
8. Yeniden yapılanma evresi	23
9. Edaravone molekülünün (3-metil-1-fenil-2-prazolin-5-one) kimyasal formülü	41
10. Rat iskemi modelinde femoral arter diseksiyonu	48
11. Rat tibialarına intramedüller K teli uygulaması	49
12. Giyotin cihazı yardımıyla kırık oluşturma	50
13. Femoral arter klemplenmesi	51
14. Edaravone	52
15. Femoral arter klemplenme sonrasında bekletme	53
16. Sakrifikasyon işlemi sonrasında tibiaların hazırlanması	54
17. Kırık sonrasında 0. ve 8. haftalardaki tibia radyografik görünümleri	55
18. Biyomekanik testin yapıldığı üç nokta bükme makinesi	57
19. Kontrol grubunun 8. haftadaki radyolojik ve morfolojik görünümü	62
20. Kırık grubunun 8. haftadaki radyolojik ve morfolojik görünümü	63
21. Kırık-iskemi grubunun 8. haftadaki radyolojik ve morfolojik görünümü	64
22. Kırık-Edaravone grubunun 8. haftadaki radyolojik ve morfolojik görünümü	65
23. Kırık-İskemi-Edaravone grubunun 8. haftadaki radyolojik ve morfolojik görünümü	66
24. Kırık-İskemi-Edaravone grubunun histopatolojik görünümü	67
25. Kırık-İskemi grubunun histopatolojik görünümü	68
26. Kırık-Edaravone grubunun histopatolojik görünümü	69
27. Biyomekanik test	70

ŞEKİLLER:

	Sayfa
1. İskemi -reperfüzyon hasarı şematik özeti	30
2. İskemi -reperfüzyon hasarında SOR oluşum mekanizması şematik özeti	35
3. Edaravonun antioksidan aktiviteyi nasıl etkilediğinin kabul edilen mekanizması	42



TABLÖLAR:

	Sayfa
1. Lane-Sandhu radyolojik puanlama sistemi	56
2. Huddlestone ve ark. histolojik değerlendirme sistemi	58
3. Gözlemcilerin gruplara göre radyolojik puan ortalaması ve analizi	61
4. Gruplara göre histopatolojik değerlendirme ve analizi	67
5. Kontrol grubunun kırılma kuvveti ve sertlik değerleri	71
6. Kırık-İskemi grubunun kırılma kuvveti ve sertlik değerleri	71
7. Kırık grubunun kırılma kuvveti ve sertlik değerleri	72
8. Kırık-Edaravone grubunun kırılma kuvveti ve sertlik değerleri	72
9. Kırık-İskemi-Edaravone grubunun kırılma kuvveti ve sertlik değerleri	73
10. Kırılma kuvveti ve sertlik değerlerinin gruplara göre dağılımı	73
11. Kırılma kuvvetinin gruplar arası analizi	74
12. Sertlik derecesinin gruplar arası analizi	75

KISALTMALAR:

- ATP:Adenozin trifosfat
AMP:Adenozin monofosfat
ADP:Adenozin difosfat
ALT: Alanin aminotransferaz
BAP:Bilimsel araştırma proje
BMP:Kemik morfojenik protein
cGMP:Siklik guanozin monofosfat
CPK :Kreatin fosfokinaz
CCl4: Karbon tetraklorid
GOT: Glutamik oksaloasetik transminaz
IGF :İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL: İnterlökin
LDH: Laktat dehidrogenaz
LPO:Lipid peroksidaz
MPO:Miyeloperoksidaz
MDA: Malondialdehit
MMP: Matriks metallopeptidaz
PDGF:Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
NSAİ:Non-steroidal antienflamatuar ilaçlar
STAT1:Signal transducer and activator of transcription 1
SOR:Serbest oksijen radikali
TNF-a:Tümör nekroz faktör alfa
TGF-B:Dönüştürücü büyüme faktörü-beta

ÖZET

Vasküler yaralanma, kompartman sendromu ve uzun süre turnike kullanımına bağlı komplike hale gelmiş kırıklarda, iskeminin kırık iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkileri sık görülen problemlerdendir.

İskemi ve reperfüzyon yaralanması ile komplike hale gelmiş kırıklarda, kırık sonrası iyileşme ile ilgili bir çok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir.

Kırık (40) rat ile gerçekteştirilen çalışmamızda operasyon sonrasında kırık-iskemi-ilaç grubunda ve kırık-ilaç grubunda cerrahi öncesinde ve cerrahi sonrasında 7 gün süreyle 0,3mg/kg/gün dozunda serbest oksijen radikali temizleyici olan Edaravone intraperitoneal olarak verilerek Edaravone'un kırık iyileşmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Sekizinci hafta sakrifiye edilen ratlar kırık grubu, kırık-iskemi grubu, kırık-edaravone, kırık-iskemi- edaravone grubu olmak üzere 4 grup radyolojik ve histopatolojik olarak kırık iyileşmesi yönünden incelendi. Biyomekanik incelemede ise sağlam (sol) tibialardan oluşan kontrol grubu da 5. grup olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda Edaravone verilen gruplar, kırık-iskemi ve kırık grubundan kırılma kuvveti, sertlik derecesi, histopatolojik ve radyografik olarak daha iyi bulunmasına rağmen istatistiksel analizde iskemi-kırık grubunun sertlik derecesi diğer gruplardan anlamlı düşük ve Edaravone verilen grupların histopatolojik değerlendirilmesi diğer gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Çalışmada gruplar arasında kırılma kuvveti ve radyolojik değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

Sonuç olarak iskemi ile komplike hale gelmiş kırıklarda, iskeminin kırık iyileşmesi üzerine olan muhtemel olumsuz etkileri, Edaravone'un serbest oksijen radikallerinin temizlenme etkisi ile ortadan kaldırılabılır.

Anahtar kelimeler: Kırık iyileşmesi, Edaravone, İskemi-reperfüzyon, Antioksidan

ABSTRACT

Adverse effects of ischemia in treatment of fracture in vascular injury, compartment syndrome and fractures complicated due to extended use of tourniquet is one of endemic problems.

Many studies have been conducted about post-fracture healing period in fractures complicated with ischemia and reperfusion injury.

We conducted our study by using 40 rat which are formed in 2 groups; fracture- ischemia-drug group and fracture-drug group. We searched the effects of edaravone in healing process by dosing 0,3 mg/kg/day edaravone intraperitoneal, a free oxygen radical scavenger, for seven days during pre-surgery and post-surgery periods. In eight week, the sacrificed rat, were examined in four groups as fracture group, fracture-ischemia group, fracture- edaravone group and fracture-ischemia-edaravone group in terms of fracture healing histopathologically and radiologically. In biomechanic examination, the control group which includes intact tibias was conducted as the 5th group.

In our study, although the groups given with Edaravone had better fracture strength, hardness grade, histopathologic and radiographically better than fracture-ischemia and fracture group, statistical analysis showed that the hardness level of ischemia-fracture group was significantly lower than the other groups and the histopathologic evaluation of the groups given Edaravone was significantly higher than the other groups. No statistically significant difference was found between fracture strength and radiological evaluation between the groups in the study.

In conclusion, in fracture cases which are complicated with ischemia, the prospective adverse effects of ischemia in healing process can be ruled out by the scavenging effect of free oxygen radicals

Key Words: Fracture healing, Edaravone, Ischemia-reperfusion, Antioxidant

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ortopedik pratikte vasküler yaralanma, kompartman sendromu ve uzun süre turnike kullanımına bağlı komplike hale gelmiş kırıklarda, iskeminin kırık iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkileri sık görülen problemlerdendir.

İskemi ve reperfüzyon yaralanması sonrasında kırık iyileşme döneminde serbest oksijen molekülünün olumsuz etkisini araştırmak ve kırık iyileşmesine yardımcı olmak için değişik antioksidan moleküller kullanarak birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir.

Literatür incelendiğinde. Edaravone'un antioksidan etkisiyle kas ve iskelet sistemi üzerine yapılmış çalışmalar olmasına rağmen intraperitoneal olarak verilen Edaravone'un iskemi-reperfüzyon-kırık modelinde kırık iyileşmesine etkileriyle ilgili bir çalışma bulunamamıştır.

Serbest oksijen radikali temizleme görevi olan Edaravone'un kırık iyileşmesinde faydalı olacağı düşüncesiyle yola çıktığımız alışmamızda, Edaravone'un kırık iyileşmesindeki etkisi radyolojik olarak, biyomekanik olarak ve histolojik inceleme yapılarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik Doku

Kemikler iskelet sistemi organlarıdır ve kemik dokusu kemiklerin yapısal komponentidir. Kemik doku hücrelerden ekstrasellüler matriksten oluşan iyi kanlanma gösteren, yapım ve yıkımın eş zamanlı olduğu özel bir bağ dokusu formudur. Diğer bağ dokularında ayrılan özelliği ise matriksin mineralizasyonudur. Bu özelliği sayesinde destek ve koruma fonksiyonuna sahip son derece sert bir doku oluşturur (1). Aynı zamanda kemik kalsiyum ve fosfat için depo görevi görmektedir. Böylece kemik, kan kalsiyum düzenlenmesinde ikincil rol oynamaktadır (2).

Kemik matriksi inorganik ve organik olarak iki kısımdan oluşur.

İnorganik madde; kemik matriksinin ağırlığının yaklaşık %60-70'ini oluşturur. Özellikle hidroksiapatit kristalleri ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) şeklinde en fazla bulunan kalsiyum (Ca^{+2}) ve fosfat (PO_4) olmak kaydıyla bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum olarak sayılabilir (3-4). Kollajen ile hidroksiapatit kristallerinin birlikteliği sayesinde kemiğin sertliği ve gücü sağlanır. Eğer bu kemikler dekalsifiye işlemine maruz bırakılırsa organik bölümün aksine normal şeklini korur, ancak çok esnek olur.

Organik kısım; kemik matriksi diğer matriks proteinleri ile beraber esas olarak tip 1 kollajen içermektedir. Kemik matriksinin ana yapısal ögesi tip I ve daha az miktarda tip V kollajendir. Tip III, tip XI, tip XIII gibi kollajenler de eser miktarda bulunmaktadır. Tüm bu kollajen molekülleri kemik matriks proteinlerinin toplam ağırlığının % 90'ını oluşturur. Matriks ayrıca ara maddeyi oluşturan non-kollajenöz proteinleri de içermektedir. Bu non-kollajenöz proteinler kemik gelişimi, büyümesi, yeniden şekillenmesi ve onarımı için gereklidir. Hem kollajen hemde ara madde kemik dokusunu oluşturmak için mineralize olurlar.

Kemik matrikste bulunan dört ana non protein grubu şunlardır.

Proteoglikan makromolekülleri; bir merkezi protein ve buna kovalent olarak bağlanmış çeşitli sayıda glikozaminoglikan yan zincirlerini içermektedir. Basınç mukavemetine katkıda bulunmak, büyüme faktörlerini bağlamak ve mineralizasyonu inhibe etmek ana görevleridir.

Çoklu yapışkan glikoproteinler; kemik hücreleri ve kollajen fiberlerinin mineralize ara maddeye tutunmalarından sorumludur. Önemli glikoproteinlerden bazıları osteonektin, osteopontin, siyaloprotein olarak sayılabilir.

Kemiğe spesifik vitamin K bağımlı proteinler; osteokalsin, protein-s, matriks Gla- proteinidir. Kemikteki en bol kollajen yapıda olmayan protein osteokalsindir. Osteokalsin düzeyi kemik yapım ile yıkım olaylarının iyi bir göstergesidir. Parathormon ile inhibe olur ve 1.25 dihidroksivitamin –D3 ile stimule olur. Kemik hücre döngüsünün göstergesi olarak idrar ve serumda ölçümü yapılabilir. Osteoblastlar tarafından sentezlenen osteokalsin, osteopontin ve osteonektin gibi kemik glikoproteinleri matriks kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumludurlar. (3; 5)

Büyüme faktörleri ve sitokinler; aralarında IGF, TNF-a, TGF-B, PDGF, BMP ve interlokinler bulunmaktadır. En özgül üyesi BMP'dir, çünkü mezenkimal hücreleri kemik üreten hücreler olan osteoblastlara farklılaşmasını indükler.

Kemik matriksi kanaliküllerle birbirine bağlı laküna adı verilen boşluklar ağı içerir. Bu boşlukları her biri bir kemik hücresi ya da osteosit içermektedir. Osteositler kanalikül denilen tünellere çok sayıda uzantı uzatır. Böylece bu kanaliküller vasıtasıyla komşu osteositler arası bağlantı sağlanmış olur.

Osteositlere ek olarak kemikle ilişkili dört hücre bulunmaktadır. Bunlar osteoprogenitor hücre, osteoblastlar, kemik döşeyen hücreler ve osteoklastlardır.

Kemik dokusu kompakt(sıkı) ve spongiyoz(süngerimsi)olarak sınıflandırılır.

Dış kısımda kompakt sıkı bir tabaka bulunur. Trabeküllerden oluşan süngerimsi ağ ise iç kısımda bulunur. Bu süngerimsi ağın içerisini kemik iliği ve kan damarları ile işgal edilmiştir. Kompakt ve süngerimsi kemiğin yerleşimi kemiğin şekline göre farklılık göstermektedir.

Şekillerine göre kemikler dört grup halinde sınıflandırılır. Bunlar uzun kemikler,

kısa kemikler, yassı kemikler, irregüler kemikler olarak sayılabilir. Uzun kemikleri diyafiz olarak adlandırılan gövdeleri ve her birine epifiz adı verilen genişlemiş uçları bulunmaktadır.

Diyafiz ve epifiz arasındaki konik parçaya ise metafiz adı verilmektedir. Kemiğin iç kısmını ise kemik iliği kavitesi oluşturur. Gövde kısmında kompakt kemik fazla iken uç kısımlarda spongioz kemik daha fazladır.

Kemiğin dış yüzeyleri sıkı fibröz bağ dokusu kılıfı olan ve osteoprogenitör hücre içeren periost ile kaplanmıştır. Kemikler eklem yüzleri hariç periost ile kaplıdır. Kemik yüzeyinde aktif kemik oluşumu devam etmiyorsa fibröz tabaka periostun ana komponentidir. Aktif büyüme devam ediyorsa osteoprogenitör hücre içeren sellüler iç tabaka aktiftir. Kollajen fibrilleri kapsül formunda kemik yüzeyine paralel dizilmiştir. Ligament ve tendonları kemiğe tutunma yerlerinde ise matriks içersine uzanım göstererek periosteumu kemiğe bağlar. Bu fibrillere Sharpey fiberleri denir.

Endosteum; osteoprogenitör hücreler ile bağ dokusundan meydana gelir ve kemiğin içinde boşlukları kaplar. Periosteum endosteumdan daha kalındır. Periosteum ve endosteumun görevleri arasında; kemik dokusunun büyüebilmesi, beslenebilmesi ve tamiri için gerekli olan osteoblastların devamlılığını sağlamaktır. Bu nedenle cerrahi sırasında periosteum ve endosteumun mümkün olduğunca korunması önemlidir. (3,5)

Kavite ve spongioz kemikteki boşluklar kemik iliği içermektedir. Birey yaşlandıkça kırmızı kemik iliği yerine yağ hücrelerinden zengin sarı kemik iliği alır. Fazla kan kaybında sarı kemik iliği kırmızı kemik iliğine dönüşebilir.

2.1.1 Kemik Histolojisi

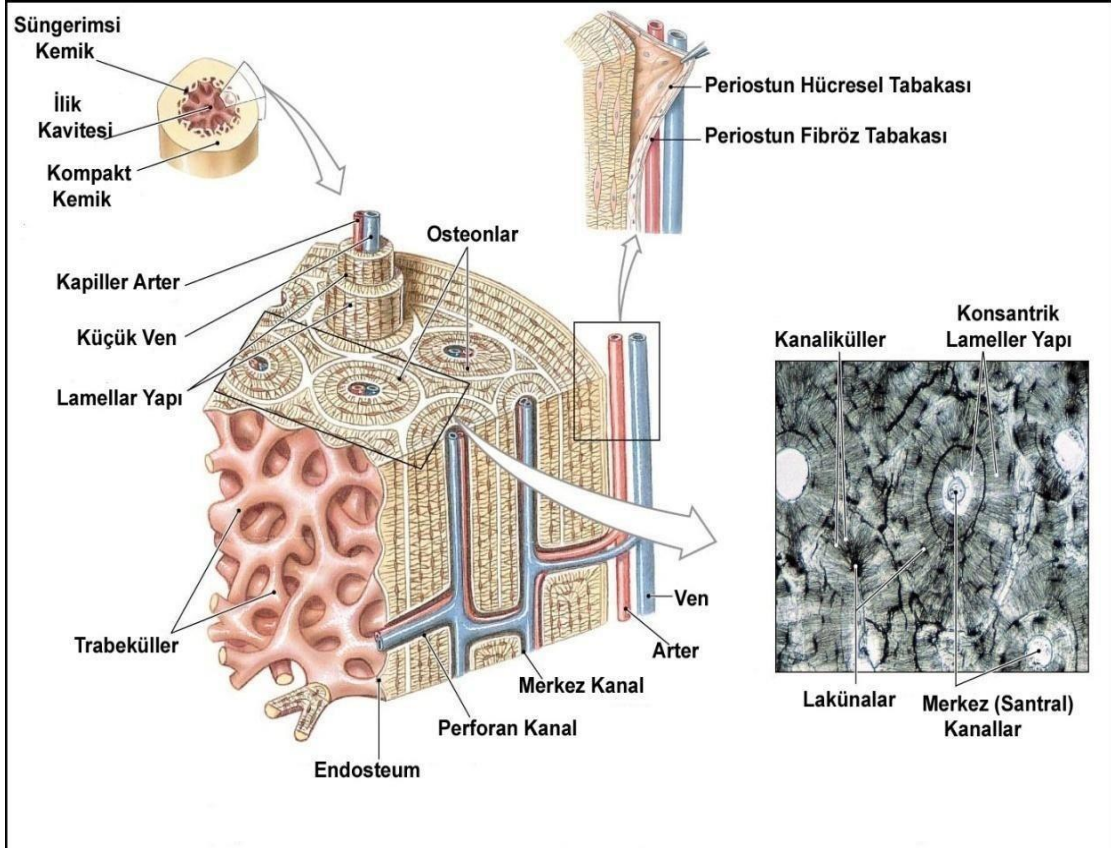
Matür kemik osteon adı verilen yapısal birimlerden oluşmaktadır. Vasküler ve sinir ağını destekleyen osteon kanalı ve konsatrik lamellerden oluşmaktadır. Osteonlar arasında ise ara lameller bulunmaktadır. Bu düzenleme nedeniyle matür kemiğe lameller kemik denilmektedir. Ayrıca bu dairesel lamellerde Volkmann kanalları denilen perfore edici kanallarda bulunmaktadır.

Lamellar kemikte paralel dizilim şeklinde bulunan 3–5 milimikron genişlikte olan tabakalar yoğun kollajen fibrilleri ile sıkı bağlantı sağlar ve kemiğin

sağlamlığını destekler (6- 7).

Lameller kemik immatür kemiğe göre oldukça sert, daha zor deforme olabilen ve oldukça güçlü yapıdadır (6-8).

Matür spongiyoz kemik yapı olarak matür kompakt kemiğe benzemektedir.



Resim 1: Kemiğin morfolojik görünümü. Pearson Education Inc. Publishing as Benjamin Cummings 2007. Türkçeye çevrilerek alındı.

İmmatür kemik ise gelişmekte olan fetus iskeletinde ilk oluşan kemik dokusudur. Kollajen fibriller ağ olarak düzenlenmişlerdir. Bu nedenle böyle kemiklere yığın kemik yada örgümsü kemik adı verilir. Matür kemiğe oranla çok sayıda hücre içerir. Yapım ve yıkım döngüsü daha fazladır. İmmatür kemik lameller kemiğe göre daha zayıf ve esnektir. Örgülü kemik strese dayanıksızdır (7). Embriyolojik hayatta ve hayatın ilk 3-4 yılındaki iskeleti oluştururlar. Tamamen matür kemik dokusuna dönüşmesi ortalama 4-5 yaş civarında olmaktadır. Ayrıca büyüme plaklarında, kırık iyileşmesi esnasında oluşan kallus

yapısında, tendon ve ligaman yapışma yerlerinde, implantların osteointegrasyon alanlarında, kemik yapımını stimüle eden medikal tedavilerde ve bazı metabolik rahatsızlıklarda (Paget Hastalığı, Osteogenesis imperfecta vs.) da immatür kemik dokusu bulunur (6-7).

2.1.2 Kemik Hücreleri

Kemik yapısının %2'sini oluşturur

Osteoprogenitör Hücre

Osteoblastlara farklılaşabilen ve kemik matriksi salgıyalabilen, istirahat halindeki embriyonik mezankimal hücrelerden kaynaklanan ve kök hücrelerin özelliklerine sahip olan, iğsi görünümlü soluk boyanan oval çekirdeğe sahip hücrelerdir (2). Periosteumun iç tabakasında ve havers kanallarını çevreleyen endosteumda bulunurlar. Mitoza girme yeteneklerini devam ettirerek osteoblastlara farklılaşabilirler (4). Osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasını tetikleyen ana faktör merkez bağlayıcı faktör alfa-1 adı verilen transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca düşük oksijen basıncı altındaki belli durumlarda bu hücreler kondrojenik hücelere de farklılaşabilirler. Soluk boyanan sitoplazmasında çok sayıda serbest ribozom olmasına rağmen az sayıda gelişmiş golgi kompleksi ve az sayıda granüllü endoplazmik retikulum (GER) içermektedir. Bu hücreler, yaşam boyunca canlı kalarak; erişkinde kemik kırıklarının onarımı sırasında yeniden aktive olurlar (5).

Osteoblast

Yaklaşık 20 mikrometre çapında olan kemik matriksi salgılayan kemik oluşturan hücrelerdir (3-4). Çok yönlü salgı yapan, bölünme yeteneğini koruyan hücrelerdir (2). Tip I kollajen ve kollajen olmayan proteinleri sentezlerler. Osteoblastlar tarafından salgılanan nonkollajen proteinler; osteoklastların farklılaşmasını düzenleyenler (nükleer faktör kappa B (RANK) aktivasyonu için reseptör ligandı (RANKL), makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), osteoprotegerin), kemik mineralizasyonu için gerekli olanlar (osteokalsin, osteonektin, osteopontin) ve osteoblastların ekstrasellüler matrikse integrinler aracılığıyla bağlanmasına aracılık eden kemik siyaloproteinleridir.

Diğer yandan kemiğe inorganik kısımların çökebilmesi için de osteoblastların varlığı gereklidir (5). Kalsifikasyon işlemi matriks içersine 50-250 nm lik membranla çevrili matriks veziküllerinin salgılanması ile dolduğu düşünülmektedir.

Diğer osteoblastlarla iletişimi sağlayan sitoplazmik uzantıları vardır. Hücre kendi etrafını matriks ile çevrildiği zaman bu uzantılar belirginleşir. Osteoblastların etrafı matriks ile çevrildiği zaman osteosit halini alır (4-5).

Osteoblastların sitoplazması bol granüllü endoplazmik retinakulum ve serbest ribozom içerirler (2). Matriks sentezi sırasında osteoblastlar tarafından protein sentezi yapılır. Kutuplaşmış hücreler olan osteoblastlarda matriksin salgılanması kemik matriksi ile temas eden yüzeylerden olur. Böylece kalsifiye olmamış matriks, osteoblastlar ile daha önceden salgılanmış olan kemik matriksi arasında yer alır. Bu olay "kemik appozisyonu" olarak isimlendirilir. İlerleyen zamanlarda kalsiyum (Ca^{+2}) tuzlarının çökmesi ile kalsifikasyon tamamlanır.

Yapılan çalışmalarda kültüre edilmiş osteoblastlara zararlı belirli antiseptikler hidrojen peroksit, povidon -iyodin, basitrasin bulunmuştur (9).

Osteoklast

Kemiğin uzaklaştırılmakta olduğu bölgelerde bulunan yaklaşık 100 mikrometre çapında olan çok çekirdekli, büyük ve hareket edebilen, kemiğin rezorbsiyonundan sorumlu olan bu hücreler; kemik iliğindeki monosit-makrofaj progenitör hücrelerin füzyonundan türerler (4, 5). Osteoklast oluşumu kemik iliğindeki stromal hücreler ile yakın ilişkilidir. Bu hücreler hem osteoklastların hemde makrofaj progenitör hücrelerin farklılaşması için gerekli olan sitokinleri salgırlarlar (2). Rezorpsiyon için yüzey alanını artıran kıvrımlı kenarları ve çevreleyen berrak bölgeleri vardır. Kemik rezorbsiyonun başladığı bölgelerde, Hawship lakunasında bulunurlar (9).

Osteoklastlar kemik matriksini rezorbe eden, kollajenaz, asid vb gibi diğer proteolitik enzimleri sentezler. Bu enzimlerden biri olan ve demir içeren tartarata dirençli asit fosfataz osteoklast aktivitesi ve farklılaşması için klinikte bir belirteç olarak kullanılmaktadır (2). Enzimlerle kalsifiye olan esas maddeyi serbestleştirir ve kemik rezorbsiyon artıklarını temizlerler (9). Kemiği rezorbe ederken aktive olmuş 3 bölge yardımcı ile yaparlar. Bunlar kırışık kenar, şeffaf zon, bazolateral

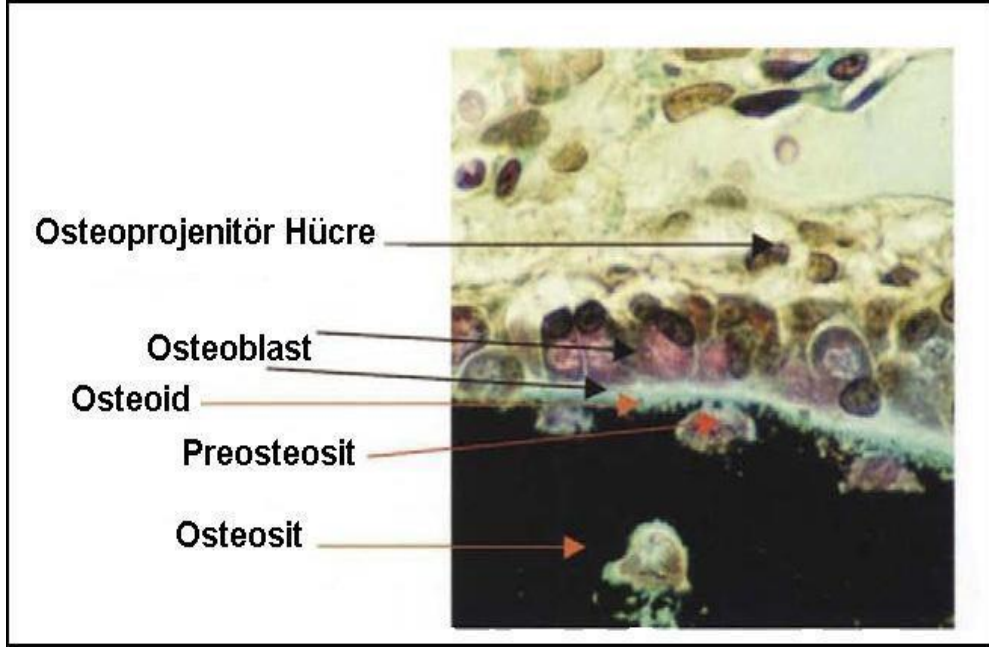
bölgedir (2).

Osteosit

Osteoid ya da kemik matriksi ile tamamen çevrelendiğinde osteoblastlara osteosit denir (2). Matür iskeletin kemiğinin %90'ını teşkil eden kemiği koruyan ve destekleyen hücrelerdir (9). Yassı elips şeklindeki yaklaşık 20-60 mikrometre boyutlarında olan osteositler, matriks lamelleri arasında bulunan lakunalar içine yerleşirler ve osteoblastlara farklılaşırlar.

Bu hücreler kemik matriksinin devamlılığını sağlarlar. Hücre dışı kalsiyum ve fosfat konsantrasyonunun kontrolü için önemli görev üstlenirler (9). Diğer önemli bir görevi ise mekanotransdüksiyondur. Kemiğe uygulanan mekanik güçlere yanıt verir. Komşu osteositler arasında besin maddelerinin hücreden hücreye geçişini sağlayan, sitoplazmik uzantılarının birbirleri arasında yaptıkları oluklu bağlantılar vardır (2).

Kan damarları ile osteosit arasında moleküler geçiş, osteositler ile kemik matriksi arasında bulunan çok az miktardaki ekstrasellüler madde yardımıyla olur. İlerleyen süreçte endoplazmik retikulumları ve golgi kompleksleri boyutları azalır. Nükleer kromatinler yoğunlaşır. Osteositlerin ölümünden sonra matriks rezorbsiyon izlenir (4-5).



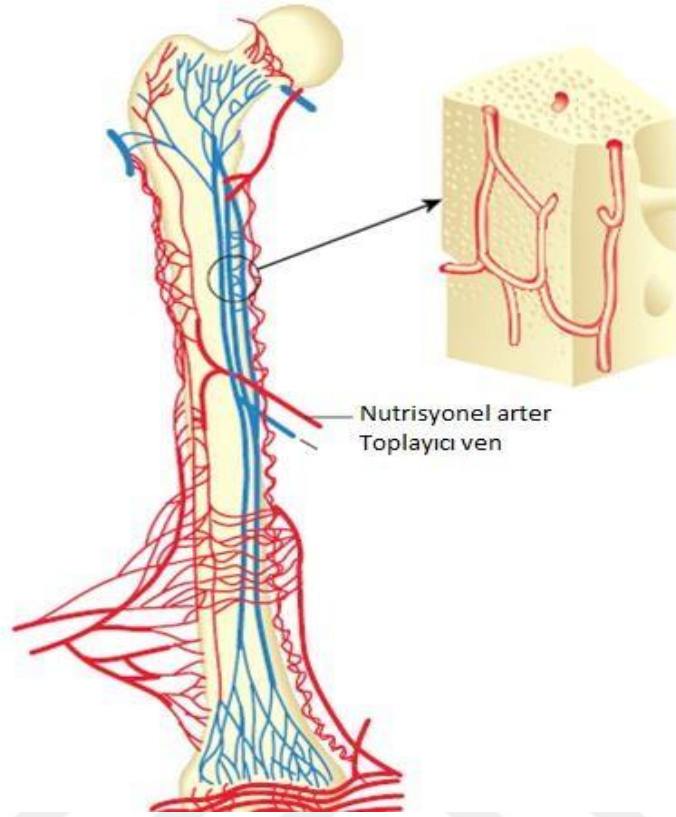
Resim 2: Osteoprojenitör hücrelerin osteoblast ve diğer hücrelere farklılaşması (Lian JB, Stein GS. Osteoblast Biology. In Marcus R, Feldman D, Kelsey J (ed). Osteoporosis. Third Edition. San Diego, CA: Academic Press 2008;93-150. Türkçeye çevrilerek alındı.)

2.1.3. Kemik Kan Akımı ve Dolaşım Fizyoloji

Kemik, kardiyak çıkımın yaklaşık %5-10'unu alır. Dolaşımı zayıf olan kemikler skafoid, talus, femur başı ve odontoidtir (9). Kırık iyileşmesinde kemik kan akımı kesinlikle şarttır. Damarlanmayı azaltan maddeler klinik olarak kırık kaynamasını olumsuz olarak etkilerken, kan akımı ve damarlanmayı artıran maddeler ise kaynamayı hızlandırmak için kullanılabilirler (10-12).

Kemiğin kan ile beslenmesi üç yolla olur.

Metafizo-epifiziel sistem arterler çevresindeki vasküler ağdan kaynaklanır. Nutrisyonel arteryel sistem sistemik dolaşımı sağlayan ana arterlerden direkt olarak yüksek basınçla çıkarlar ve olgun diafiziel korteksin 2/3 iç tabakasını beslerler. Periosteal sistem düşük basınçlı sistemdir ve olgun diafizin 1/3 dış tabakasını besler (13).



Resim 3:Kemik kanlaması: Colorized from Brinker MR ;Miller MD:
Fundamentals of orthopaedics,Philadelphia,1999,WB Saunders P4

Arteriel kan akımının yönü kemikte içten dışa doğrudur yani sentrifugaldır. Bunun sebebi besleyici arteriel sistemin yüksek basınçta, periosteal sistemin ise düşük basınçta olmasındandır. Deplase kırık oluşumunda endosteal dolaşımın kesilmesi sonucunda periosteal kan akımı artar ve kan akışı dıştan içe yani sentripedal hale gelir. Bu durum kırık iyileşmesinde kilit önemi olan periosteal kemik yapımına yol açar. Ayrıca çocuklarda aşırı vasküler ve kalın periosteum nedeniyle sentripedal akım dominanttır. Kemikteki venöz akımda kortikal kapillerlerin venöz sinüslere dökülmesine izin verecek şekildedir. Kemikteki venöz sistemin kapasitesi arteriel sistemin 6 ila 8 katıdır. Perforan ve nütrient venler vasıtasıyla ekstremite derin venlerine dökülürler (14-15).

2.1.4 Kemik Histogenezi

Kemik oluşumu, endokondral kemikleşme şeklinde (kıkırdak dokudan farklılaşma yoluyla), intramembranöz kemikleşme şeklinde (kıkırdak doku olmaksızın organik matriks üzerinde kalsifikasyonun oluşması yoluyla), appozisyonel kemikleşme (mevcut kemiğin üzerine yeni kemiğin birikmesi yoluyla) ile gerçekleşir (16). Ekstremitenin kemikleri ve aksiyel iskeletin ağırlık taşıyan bölümleri endokondral kemikleşmeye örnekken, kafa ve yüzün yassı kemikleri, mandibula ve klavikula intramembranöz kemikleşmeye örnektir (2).

Kemikleşme de her zaman ilk oluşan kemik dokusu olgunlaşmamış örgü (woven) kemiktir. Oluşan bu primer kemik yerine zamanla olgun lamelli kemik doku geçmektedir. Kemik yapımı, yıkımı dengeli bir şekilde devam eder. Kemik dokusu aktiftir ve devamlı olarak yenilenir. Bu yenilenme özellikle mekanik, kimyasal ve hormonal faktörlere bağlıdır (17-20).

Intramembranöz kemik oluşumu; mezenşimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşması ile olurlar. İlk belirti gestasyonun 8. haftası civarında görülmektedir (2). İlk olarak mezenşim hücreleri vasküler yapılar etrafında birikir. Aradaki boşluklar sertleşmemiş matriks ve kollajen lifler ile dolar. Mezenşim hücreleri osteoblastlara farklılaşabilen hücrelerdir. Bu hücreler hücrelerarası madde sentezini de yaparak osteositlere farklılaşırlar. Bu bölgeler kemikleşme merkezi olarak adlandırılır.

Oluşan kemik spongiyöz (trabeküler) yapıdadır. Araya kalsiyumda çökmemiştir ve osteoid doku olarak adlandırılır. Trabeküller büyür, ağ şeklinde spongiyöz kemik dokusu şekillenmiş olur.

Bu tür kemikleşmede periosteum ve endosteum kemikleşme dışındaki bağ dokusu tarafından yapılmaktadır. Trabeküller arası boşluklardaki bağ dokusu da kemik iliği miyeloid veya hematopoetik dokuya farklılaşır (17-20). Intramembranöz kemikleşme subperiosteal kemikleşmenin prototipidir ve kırık iyileşmesi sırasındaki periosteal iyileşme bu yolla olur (16).

Kondral kemikleşme; mezenkimal hücrelerin gelecekte kemik olacak bölgede proliferasyonu ve kümelenmesi ile başlar. Farklı fibroblastik büyüme faktörlerinin ve kemik morfogenezik proteinlerinin etkisi altında mezankimal hücreler önce tip II kollajeni eksprese ederler ve kondrosblastlara farklılaşırlar. Kemikleşme ilk olarak kemiğin genel şekline sahip olan hyalin kıkırdak modeliyle oluşur (2). Bu nedenle intrakartilagenöz kemikleşme olarak adlandırılır.

Kemikleşmenin ilk işareti, kıkırdak modelin çevresinde bir kemik manşetin ortaya çıkmasıdır. Organizmanın uzun ve bazı kısa kemikleri böyle meydana gelir. (17-20)

Kondral kemikleşme perikondral ve enkondral olmak üzere 2 ye ayrılır.

Perikondral kemikleşme; kıkırdak yüzeyindeki mezenşimal hücreler osteoblastlara dönüşerek bu bölgede toplanırlar ve ara maddeyi sentezleyerek osteosit haline dönüşürler. Sonrasını kalsifikasyon izler. Sonuçta ise diyafizin ortasında ve daha sonra da uçlara doğru gelişen ve kıkırdağı çevreleyen bir perikondral kemik dokusu ortaya çıkar. Kemikleşme bittikten sonra perikondriyuma periosteum denir. Bu kompakt yapı sayesinde kemiğin enine büyümesi sağlanmış olur (17-18).

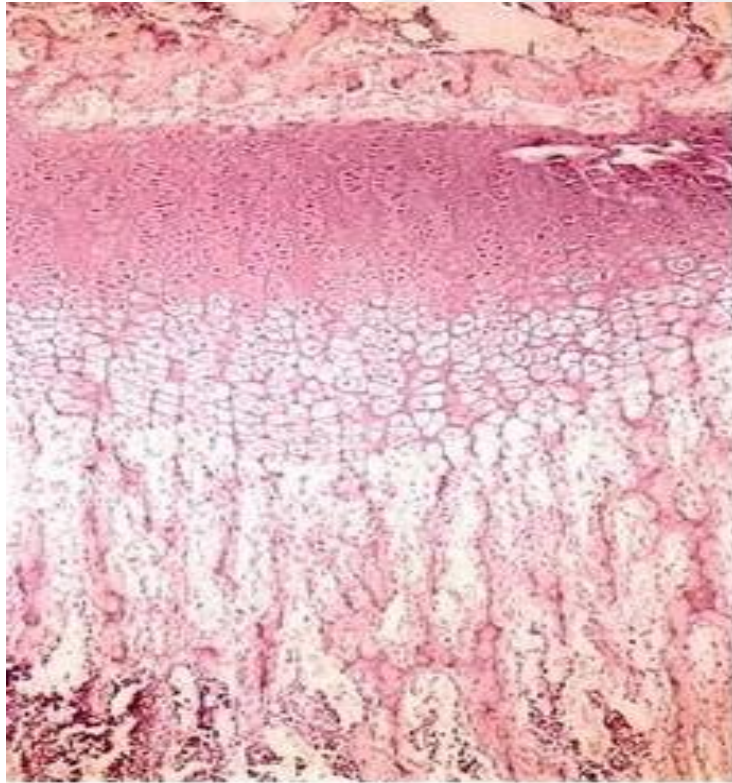
Enkondral kemikleşmede; özellikle uzun kemiklerin şekillenmesi böyle olur. Bu tür kemikleşme esas olarak kıkırdak hücrelerinin özellikle uzun kemiklerin diyafiz bölgesinde birtakım değişimleri şeklinde olmaktadır. İlk kemik önce diyafizi saran perikondriyumda intramembranöz yolla oluşur ve periost şekillenir. Diyafizdeki kemikleşme primer kemikleşmedir ve tamamen kemikleşinceye kadar sürer gider. Sonrasında epifizdeki kemikleşme başlar ve buna sekonder kemikleşme merkezi denir. Epifizdeki eklem kıkırdağı ise kemikleşmeye katılmaz.

Uzun kemiğin büyüme plağında meydana gelen ve kemiğin uzunlamasına büyümesini sağlayan olayları ise kısaca şöyle özetleyebiliriz.

Kıkırdak hücrelerinde görülen farklılaşmalar neticesinde doku birtakım zonlara (bölgelere) ayrılmaktadır (2).(Resim 4)

Bu bölgeler;

1. Dinlenme zonu: Morfolojik değişimi olmayan hyalin kıkırdak hücrelerinin bulunduğu bölgedir. Hücre proliferasyonu ve aktif matriks üretimi göstermez.
2. Proliferasyon zonu: Kıkırdak hücrelerinin hızla bölünüp çoğalması ve uzun kolonlar yaptığı bölgedir. Buradaki hücreler dinlenme zonundakilerden daha büyüktürler. Kollajen ve diğer matriks proteinleri üretirler.
3. Hipertrofi zonu: Büyümüş ve sitoplazmalarında glikojen toplanmış kıkırdak hücrelerinin olduğu bölgedir. Kondrositler metabolik olarak aktif kalırlar.
4. Kalsifikasyon zonu: Dokunun bazofilisi artığı, kıkırdak hücreleri dejenere olmaya başladığı ve ortama kalsiyum çökdüğü bölgedir. Bu zonun proksimalinde bulunan kondrositler apoptoza uğrarlar.
5. Rezorbsiyon zonu (trabeküler zon): Vasküler yapıdan zengin olduğu bölgedir.(enkondral tipte)



Dinlenme zonu

Proliferasyon zonu

Hipertrofi zonu

Ossifikasyon zonu

Trabeküler zon

Resim 4:Fizis hattı bölgeleri

Proliferasyon zonunda çoğalan kıkırdak hücreleri kemik uzun eksenine doğru dizilim gerçekleştirmektedir. Daha sonra hücreler sitoplazmalarında madde depolayarak büyümeye başlarlar (hipertrofik zon). Kalsifikasyon işlemi hücrelerde alkalen fosfataz enzimi dışarı çıkmasıyla başlar. Osteoklastlarca kalsifikasyondan sonra görülen kemik yıkımı veya rezorbsiyon olayında görev alırlar. Bu bölge kan damarlarından da zengindir. Rezorbsiyon sonucu kemik lakünaları oluşur. Osteoblastlar kaviteletin yüzeyine yerleşerek kemik matriksini sentezledikten sonra osteositlere dönüşürler.

Osteoklastların çevre kemik dokuyu eriterek açtıkları kavitelet, havers lameller sistemi meydana getirmektedir. Bu kaviteletin içi kemik iliği, osteoklastlar ve bağ dokusu dolmuştur. Bağ dokusu hücreleri osteoblastlara farklılaşır ve Havers'in en dış lamelini yaparlar. Böylece periferden merkeze doğru konsentrik olarak dizilmiş lamel tabakası meydana gelir (Osteon).

Kemik bir yandan devamlı olarak oluşurken bir yandan da osteoklastlarca yıkıma uğratılmakta ve bu iki olayın dengeli çalışmasıyla kemik normal süregen durumunu korumaktadır (17-20).

Appozisyonel kemikleşmede ise kemiklerin periosteal kalınlaşması ve kemik şekillenmesi esnasında bu tip kemikleşme olur. Endokondral ve intramembranöz kemikleşmeden farklı olarak kemik yüzeyinde osteoblastların toplanması ile başlar (16). Bu hücreler osteoid dokuyu sentezlerler, böylece tabakalar halinde lameller kemik meydana gelir (16-21).

2.1.5 Kemik Metabolizması

Kemik metabolik aktivitesinde üç özel hücre gereklidir. Bunlar; osteoblast, osteoklast ve osteosit olarak sayılabilir. Kemik; kalsiyum, sodyum, fosfor, magnezyum gibi vücut için önemli esansiyel iyonların depo işlevini görür.

Osteoblastlar, kalsiyum ve/veya fosfat gibi mineralizasyon için gerekli iyonların kullanılabilirliğini de etkiler. Osteoblastlar üzerinde paratiroid ve östrojen reseptörleri bulunur. Osteoklastlar üzerlerinde kalsitonin reseptörleri bulunur ve kemik matriksini yıkarlar (21).

Kalsiyum Metabolizması

Kemiğin yoğunluğu, kütlesi, materyal özellikleri, mikro ve makro-mimari yapısı ve kemik döngüsünün hızı kemiğin dayanıklılığını etkileyen en önemli faktörlerdir. Kalsiyum, kemiklerde en fazla bulunan mineral olduğundan dolayı, kemiğin dayanıklılığını belirleyen en önemli etkidir. Vücut kalsiyumunun %99'u hidroksi apatit kristalleri şeklinde bulunur. %1'lik kısmı ise plazmada, ekstraselüler sıvıda ve hücre içinde hücre fonksiyonlarının devamlılığı için değişebilen bir dağılım gösterir.

Kalsiyum dengesini düzenleyen üç önemli hormon ise kalsitonin, parathormon ve 1,25 dihidroksivitamin D3[1,25-(OH)₂ Vit D3] dür.

Kalsiyum plazmada proteine bağlı, iyonize ve organik iyonlarla kompleks şeklinde bulunur. Parathormonun kalsiyum metabolizmasına etkileri şunlardır; osteoklastik kemik resorpsiyonunu artırır, renal tübuler kalsiyum absorpsiyonunu artırır, inorganik fosfat reabsorpsiyonunu azaltır ve inaktif D vitamini hidroksilasyonunu artırır.

1-25-(OH)₂ vit D3 vitaminin kalsiyum metabolizmasına etkileri ise şunlardır: intestinal sistemden kalsiyum emilimini, kemikten kalsiyum rezorpsiyonunu ve distal renal tübüllerde kalsiyum reabsorpsiyonunu artırır (22).

Gıdalarla alınan kalsiyum %25-70'i gastrointestinal sistemden emilir. Kalsiyumun emiliminin büyük çoğunluğu duodenum ve jejunumda aktif taşıma ile meydana gelir. Kalsiyumun bağırsaktan emiliminin en önemli etken 1,25-(OH)₂ vit D3 dür.

Beslenme yoluyla alınan miktar da kalsiyum emilimini etkiler; fraksiyonel kalsiyum emilimi, yüksek kalsiyum alımına göre düşük kalsiyum alımında fazladır. Kalsiyum emilimi yaş ilerledikçe azalır. Kalsiyum, idrar, dışkı az miktarda terle atılır. Böbreklerle atılan kalsiyumun %98'i proksimal tübul ve henle kulpundan tekrar emilir. Kalsiyumun yeniden emilimini artıranlar; parathormon, tiazid grubu diüretikler, fosfat, metabolik alkalozdur.

Böbrek kalsiyum klirensi ise kulp diüretikleri, metabolik asidoz, hipermağnezemi, tuz diürezi, etanol, beslenme yoluyla aşırı protein alımı, ciddi

fosfat tüklenmesi ve parathormon eksikliğine göre artar (23).

Fosfor Metabolizması

Fosfat vücutta metabolik ve yapısal olaylar için gereklidir. %80-85'i iskelette, %10'u hücre içinde bulunur. Fosfor kemiğin yapısal kuvveti için gerekli olan hidroksiapatit kristalleri şeklinde bulunur. Kalsiyumdan farklı olarak fosforun %85'i serbest, %15'i proteine bağlıdır.

Plazma fosfor düzeyi; parathormon, insülin, 1.25 - (OH)₂D, büyüme hormonu gibi çeşitli hormonlar, yaş ve beslenmeden etkilenir. Plazma fosfatının %80-90'nı proksimal tübülde aktif olarak emilir.

Fosfatın proksimal tübülde geri emilimini artıran faktörler; hipoparatiroidizm, fosfat eksikliği, volüm eksikliği, büyüme hormonu ve hipokalsemidir (21).

Fosfat düzeyini azaltan faktörler hipokalemi, parathormon, sistemik asidoz, hipomagnezemi, tiazid ve furosemid, kalsitonin, karbonik anhidraz inhibitörleridir (22- 23).

D Vitamini Metabolizması

D vitamini barsak kanalında kalsiyum emilimini artıran güçlü etkiye sahiptir. Aynı zamanda hem kemik depolanması hem de kemik rezorpsiyonu üzerinde önemli etkileri vardır. Aktif D vitamini deri, karaciğer ve böbreklerde üç aşamada salgılanır.

Deride ultraviyole ışını 7-dehidrokolestrolü provitamin D₃'e dönüştürür. Bu da non- enzimatik yollarla vitamin D₃'e (kolekalsiferol) dönüşür. Vitamin D₃, spesifik vitamin D bağlayıcı proteine (DBP) bağlanarak karaciğere transfer olur. Burada hidroksillenerek 25 – hidroksivitamin D'ye (kalsifidiol yada 25-OH-D) dönüşür.

Sonrasında ise böbreğe gelerek 1 pozisyonunda hidroksillenerek en aktif olan 1,25- dihidrokolekalsiferol [kalsitriol ya da 1,25-(OH)₂D] oluşur.

Renal 1 α -hidroksilasyonu sıkı metabolik kontrolde olup; Parathormon, hipofosfatemi, hipokalsemi, büyüme hormonu, insülin, östrojenler, prolaktin ve düşük 1,25- (OH) $_2$ D seviyesi ile artarken, hiperkalsemi, hiperfosfatemi, düşük PTH düzeyi, ağır böbrek hastalığında ve yaşlılarda ise azalır.

Ağız yoluyla D vitamini alındığında aktivasyonun deri aşaması atlanır. D vitamini hücre dışı sıvıdaki iyonize kalsiyum düzeyini devam ettirmek ve osteoid kalsifikasyonunu arttırmak için parathormonu etkiler.

D vitamini esas olarak bağırsaktan kalsiyum ve fosforun absorpsiyonuna pozitif etki eder. 1,25- (OH) $_2$ D şeklindeki formu doğrudan kemikle etkileşir. D vitamini kalsiyumun böbrekten absorpsiyonunu artırır.

Hüresel farklılaşma ve çoğalmada (osteoklastlar içindeki monosit-makrofajların hemotopoetik hücrelere dönüşümü gibi) önemli bir rol oynayabileceği ve immun işlevlerde etkisi olabileceği gösterilmiştir.

Vitamin D eksikliği anormal kemik mineralizasyonunun en önemli nedenlerindedir. D vitaminin yetersizliği genellikle diyetle yetersiz alımdan, ciltte yetersiz yapılmasından, diyet ile alınan D vitaminin absorpsiyonu sorunlarından ya da vitamin D'nin biyoaktif metabolitlerine çevirim problemlerinden kaynaklanabilir.

Etanol, tütün, antiepileptikler, nöroleptikler, antitüberküloz ilaçlar, glukokortikoidler, L tiroksin ve kemoterapötik gibi bazı ilaçlar D vitamini bağlı sekonder kemik metabolizma sorunları meydana getirebilir (24).

Serum Alkali Fosfataz

Mineralizasyon olaylarında önemli rol oynar. Menopoz gibi kemik resorpsiyonundaki artışı olduğu dönemlerde serum alkali fosfataz değerleri, menopoz öncesi düzeylerinin yaklaşık iki katı kadar yükselir (25).

2.2 Kırık İyileşmesi ve İyileşmenin Kontrolü

Kemiğin anatomik bütünlüğünün bir kuvvete bağlı olarak bozulmasına kırık denmektedir. Kırık sonrası çeşitli fizyolojik olaylar sonucunda kemik bütünlüğü yeniden sağlanmaya çalışılmaktadır. Diğer dokulardan farklı olarak kemik dokusu skar bırakmadan aslına en uygun şekilde iyileşmektedir (26-28).

Kırık iyileşmesi kırığın oluştuğu andan itibaren başlar, kemik tekrar eski halini gelinceye kadar devam eder. (29)

İki tip kırık iyileşmesi vardır;

I. Primer (direkt) kırık iyileşmesi

II. Sekonder (indirekt) kırık iyileşmesi

Primer kırık iyileşmesi sadece bir iç kallus ile iyileşme gösteren dış kallusun görülmediği genellikle ayrılmamış veya anatomik olarak redükte edilmiş ve sıkı tespit uygulanmış durumlarda görülür. Kallus formasyonu yoktur. İntramembranöz kemikleşmeye örnektir.

Sekonder kırık iyileşmesi, stabil olmayan tespit sonrası spontan oluşan radyolojik olarak kallusun görüldüğü doğal kırık iyileşmesidir. Hem intramembranöz hem de enkondral kemik iyileşme meydana gelir. (30-31)

Kırık İyileşmesi Evreleri

Radyolojik ve histolojik olarak 3 evrede incelenebilir.

I. İnflamasyon (yangı) dönemi

II. Reperasyon (onarım) dönemi

III. Remodeling (yeniden yapılanma) dönemi

Yangı (İnflamasyon, hematom) Evresi (1-4 gün):

Kırık iyileşmesinin temelini oluşturan inflamatuvar dönem temelde günlerce devam eden bir süreçtir. Bu sürede hematom organize olur, fagositler ve lizozomal mekanizmalar ile nekrotik dokular debride edilir. Kırık iyileşmesinin başlangıcı olan yangı evresi kırığı izleyen 3-4 günde başlar (32). Oluşan hematomun basıncı kırık uçlarının bir arada tutulmasına kısmen yardımcı olur.

Birçok faktör içermesinden dolayı açık kırıklarda kırık hematomunun dışarı boşalmasıyla kırık iyileşmesi olumsuz yönde etkilenir.

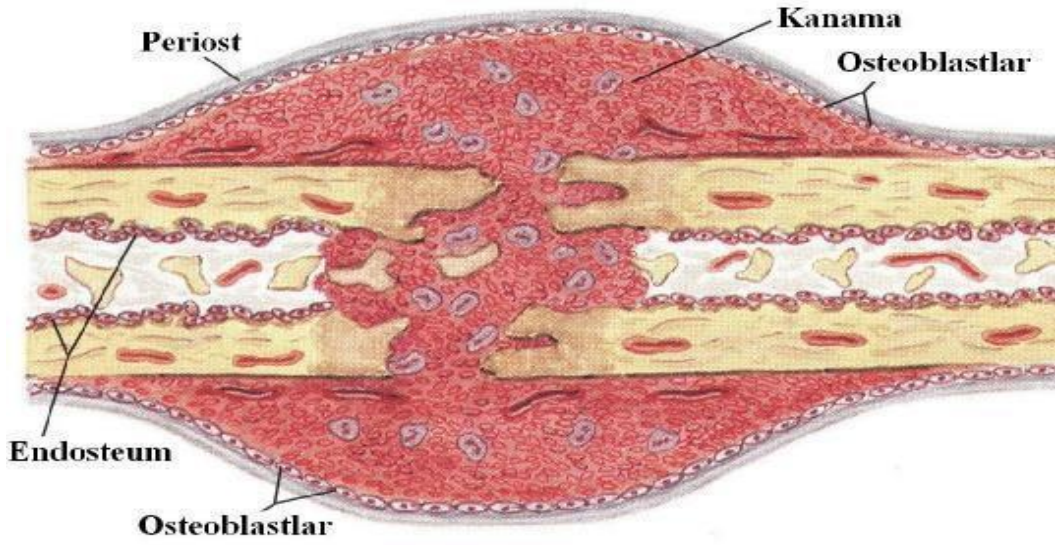
Diğer yara iyileşme süreçlerine benzer şekilde, bu evrede makrofaj, nötrofiller, trombositler ve yaralanan kemik hücreleri tarafından salınan IL-1, IL-6, TNF- alfa gibi yangı öncesi maddelerin salınımı ile karakterizedir. Bu araçlar iyileşme sürecinin başlatılmasında kritik öneme sahiptirler. Proinflamuar moleküller yaralanmayı izleyen 24 saat içinde zirve yapar ve sonrasında, kırığı izleyen 72 saatte en alt düzeye geriler (33).

Kırık bölgesinde mast hücrelerinden salgılanan histaminin ilk 1. günde içinde vazodilatasyon ve bunun sonucunda doku permabilitesinin artışıyla ilerleyen kan akımında artış oluşturur.

Pıhtılaşma mekanizmasıyla kanama durur. Kırık bölgesinde oluşan ödem ve iskemi beslenmeyi bozarak kırık bölgesinde bir miktar nekroza yol açar, sonrasında iyileşme için gereken kalsiyumda açığa çıkmış olur. Kırık uçlarındaki nekroza karşı bunun çevresinde inflamatuvar tepki oluşur. Böylece kırık uçları rezorbe olurlar (34).

Fibrin pıhtısının oluşması onarım fazı için gereken hücrelerin tutunmasına yardımcı olur. Akut dönemdeki bu gelişmelerle bölgeye hızlıca kemik yapıcı hücre proliferasyonu başlar (35,36).

Bu döneme inflamatuvar dönem denilme nedeni akut inflamatuvar hücrelerden özellikle polimorf lökositlerin kırık yerindeki ödemli bölgeye yayılmasıdır.



Resim 5: İnflamasyon evresi: Travma sonrası kemik ve çevresindeki kan damarlarının zedelenmesi sonucu hematoma oluşur. Kırık kenarlarındaki kemik ölür. Lökositler, makrofajlar, mast hücreleri sayesinde ölü kemik uzaklaştırılır. (The Netter Collection of Medical Illustrations, 1999)

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

İlk saatlerden itibaren 48 saat içerisinde kırık hematoma organize olmasıyla başlar. İnflamasyon döneminde oluşan fibrin yapı hücrelerin onarım fazı için şarttır.

Bu dönemde; mezenşimal hücreler, periosteumun iç tabakasındaki osteoprogenitör hücreler ve endosteumdaki osteoblastlar önemlidir. Mezenşimal hücreler çoğalıp farklılaşarak kırıkta doku, fibröz doku, birincil kemikten oluşan kemik (sert) veya fibrokartilaj (yumuşak) kallusu meydana getirirler.

Hayvan deneylerinde sürenin 2-7 gün kadar olan onarım doku şekillenmesi insanlarda genellikle 7-12 gündür.

Yumuşak kallusun büyüklüğü fibroz kırıkta ve kemikle ilgilidir. Kırık uçlarında ne kadar hareket olursa o kadar geniş kallus olur. Sert kallusun oluşması için ise osteoid mineralizasyonu gereklidir.

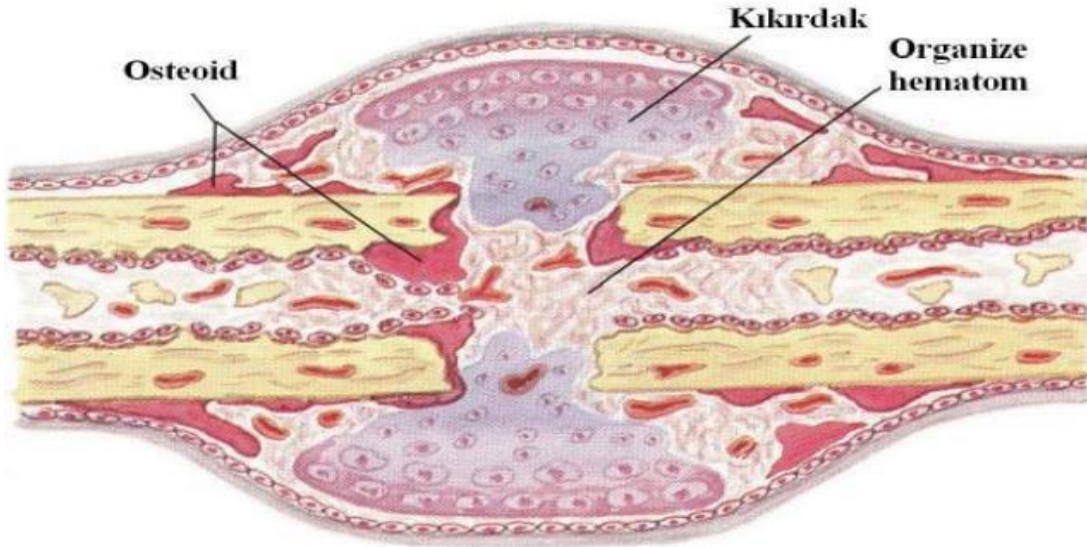
Yumuşak kallus ise oksijen basıncının düşük olduğu santral bölgelerde

meydana gelirken, sert kallus kırık periferinde intramembranöz olarak şekillenir. Yumuşak kallus içinde kırık uçlarının stabilitesi olumlu yönde etki eden kıkırdak dokular da zamanla endokondral ossifikasyon yoluyla kemikleşme meydana gelir. Kırık bölgesinde mediatörlerle birlikte damarlanmanın artması, inflamasyon bölgesine kemotaksisi artırır, böylece osteoblastların da etkinliği artar.

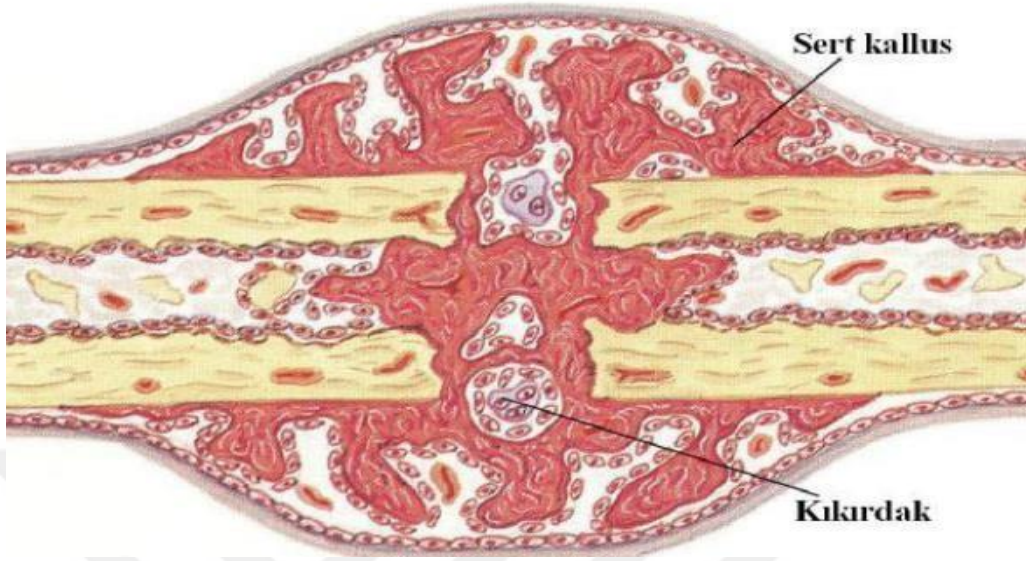
Bundan sonra ise kallusta mineralizasyon evresi başlamış olur. Hücreler ilk olarak Tip I kollajen fibrilleri içeren matriksi salgılar ve daha sonrasında hidroksiapatit kristallerinin depolanmasını sağlarlar.

İnternal ve eksternal kallusun etkisiyle kırık fragmanlarının stabilitesi artarak kaynama meydana gelir ancak kaynama henüz tamamlanmış değildir.

Onarım evresinin ortasında, kallusun kullanılmayan bazı kısımlarının rezorpsiyonu ve yeniden şekillenme evresi (remodelizasyon) başlamış olur (8).



Resim 6: Yumuşak kallus oluşma evresi: Pıhtı; kollajen lifleri ve damarsal elemanlarca organize edilir. Yeni damarlar oluşur. Osteoprogenitör hücreler preosteositler ve periost kaynaklı osteoblastlar ile endosteum gelişir. Mezenkimal orjinli osteoblastlar ve kondroblastlar da pıhtıda görülmeye başlar. Yumuşak kallusu osteoid, kıkırdak ve kollajen karışımı oluşturur. (The Netter Collection of Medical Illustrations, 1999)



Resim 7:Sert kallus oluşma evresi: Eksternal, periostal ve medüller yumuşak kallus, sert kallusa dönüşürken mineralize olur. (The Netter Collection of Medical Illustrations, 1999)

Yeniden Yapılanma (Remodelizasyon) Evresi (25-100 gün):

Kırık iyileşmesinin en uzun evrelerinden olan bu evrede genel kortikal yapı korunarak, yeni oluşan örgümsü kemik olgun lameller kemiğe dönüşüm gösterir ve orijinal uzun kemik yapısı yeniden sağlanır.

Klinik uygulamada kırıkların tipik olarak geç olgun kallus evresi ve erken şekillenme evresinde iyileştiği düşünülür.

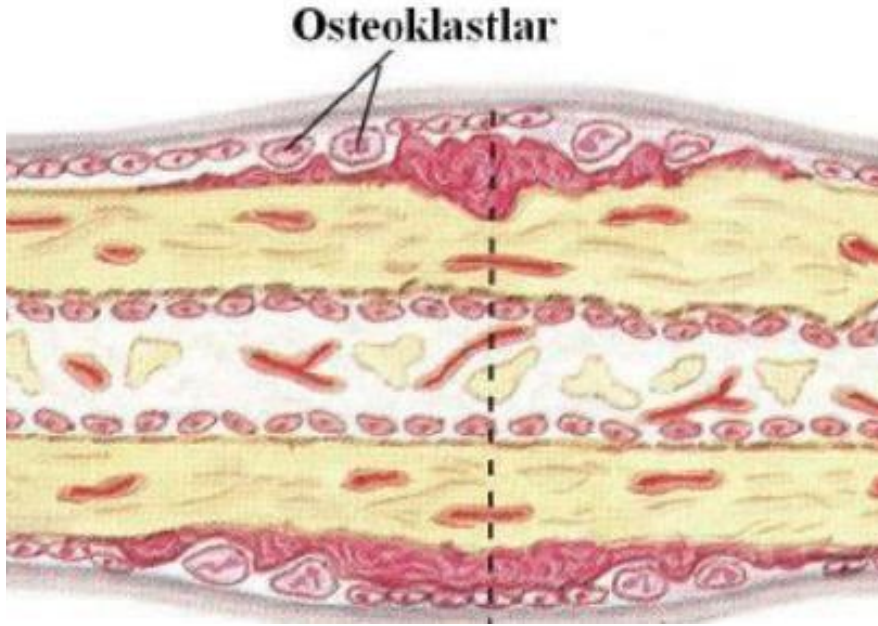
Kırık çevresinde oluşan fazlalıklar rezorbe olur, medüller kanal tekrar açılır. Bir taraftan osteoklastlar çalışırken diğer yandan da osteoblastlar yeni kemik yaparlar.

Kemiğin remodelizasyonunda kabul gören üç temel teori vardır:

İlk olarak 1892'de Wolf kendi adıyla anılan bir kanunla remodelizasyonu tarif etmiştir. Buna göre; mekanik yüklenmedeki artışın kemik kütlesinde artışa neden olduğu; yükün ortadan kaldırılması ile de belirgin kemik yıkımına neden olduğu gösterilmiştir.

İkincisi; Piezoelektrik teorisi kemiğin elektrik yüklere göre yeniden şekillenmesi esasına dayanır. Bu teoriye göre, kemiğin kompresyon yüzü kemik yapımını uyarırken; gerilme yüzü kemik yıkımını uyarır.

Üçüncü teori ise; yeniden şekillenmeyi lokal sitokinler ve sistemik hormonlar tarafından düzenlenen temel çok hücreli birimlere dayandıran Hueter-Volkmann Kanunu'dur (9).



Resim 8: Yeniden yapılanma evresi: Osteoklastik ve osteoblastik aktivite sert kallusu lamellar kemiğe dönüştürür. Normal kemik sınırları belirir, hatta angulasyonun kısmi veya tam olarak düzeldiği görülür. (The Netter Collection of Medical Illustrations, 1999)

Kırık oluştuğu anda osteoblast ve osteoklast miktarı iyileşme için yetersizdir. İyileşme için bölgesel olarak üretilen ya da dolaşımla gelen, kemik miktarını koruyabilen kenetleyici faktörlere ihtiyaç vardır (9,37,38).

Bu faktörlerden prostoglandinler ve kemik uyarıcı faktörler en önemlileridir.

Prostoglandinler (PG):

Hücre duvarının ve kollajen dokunun yaralandığı durumlarda araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi yardımıyla sentezlenen yağ asitleridir. İnflamatuvar hücrelere kemotaktik etkiye sahiptirler. Lenfositlerin antikor yapımını düzenlerler. Güçlü vazodilatatördürler ve hücre çoğalmasını uyarırlar. Hücre içine ve dışına kalsiyum (Ca^{+2}) transferine yardımcı olurlar.

Kemik uyarıcı faktörler:

Farklılaşmamış mezankimal hücrelerin çoğalmasına ve yeni kemik hücrelerinin oluşumuna destek verir.

Bu faktörlerin başlıcaları şunlardır. (8)

Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β):

Hücre dışı matriks ve trombositler en önemli kaynaklarıdır. İnflamasyon ve doku tamirinden sorumludur. TGF- β kondrosit ile osteoblastlarda üretilir ve enkondral kemikleşme sırasında hücre dışı matrikste depolanır. Trombositlerden de onarım zincirinde rol almak üzere salınır. En güçlü kemotaktik ajandır ve makrofajlardan salınır.

Matriks bileşenlerinden olan fibronektin, kollajen ve proteoglikanların oluşumunu integrin reseptörlerini uyararak artırır. Bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri suprese eder. Sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna katkı sağlar.

Kemik Morfojenik Proteini (BMP):

Mezankimal hücrelerin kırıkta ve kemik hücrelerine dönüşmesine, ektopik kemik uyarımına neden olan hasarlanan kemik kaynaklı morfogenetik proteindir. BMP-7 osteojenik protein BMP1, BMP-8 ise osteojenik protein 2 olarak bilinir.

Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü (FGF):

Kıkırdak ve fibroblastlar için mitozda önemli rol oynar. Kıkırdak oluşumu aşamasında kallus miktarını artırır.

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF):

Fibroblast ve kemik hücrelerinin çoğalmasında önemli rol oynar. Lokal veya dolaşımda bulunmaktadır. Kollajen sentezine olumlu yönde etki eder. Fibroblast mitozuna, mezankimal hücre çoğalmasına monosit ve makrofajların kırık bölgesine transferinde rol alır. PDGF uygulamasıyla kallus artmıştır.

İnterlökinler (IL):

Makrofaj ve monosit kaynaklıdır. IL-1 fibroblast mitozu, kollajenaz ve PGE-2 üretimde rol alır. Osteoklastlar üzerine etki ederek kemik geri emilimini de etki eder.

Plazma Fibronektini:

Yeni damar oluşumu için önemlidir.

Somatomedin C:

Kemikte büyüme hormonu gibi etki eder. Kondroblastların mitozuna, farklılaşmalarına ve matriks oluşumunu olumlu etki eder.

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF):

Geri emilimin hızlandırılarak kemik oluşumu üzerine olumlu etki eder.

Kondroblast Kökenli Büyüme Faktörü (CDGF):

Tip II kollajen ve hiyaluronik asit oluşunda görev yapar.

Makrofaj Kaynaklı Büyüme Faktörü (MDGF):

Ratlarda osteoblast benzeri hücreler ve kondrosit çoğalmasında önemlidirler.

Epidermal Hücre Kaynaklı Büyüme Faktörü (ECGF):

Kıkırdak ve kemik için mitozunda önemli rol oynarlar.

Endoteliyal Hücre Kaynaklı Büyüme Faktörleri (ECDGF):

Yeni damar oluşumunda görev alırlar.

Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler:

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

Yerel faktörler: (9,39,40)

1. Travmanın derece ve etkisi
2. Kırık uçlarının birbirine göre konumu
3. Kırık dolaşımı
4. Eklem içi kırıklar
5. Kırılan kemiğin türü
6. Kırık çizgisinin özelliği
7. Cilt ve yumuşak doku yaralanması
8. Yerel bir enfeksiyon varlığı
9. Yerel patolojik koşullar
10. Açık kırık olup kırık hematomunun dışarı akması
11. Elektrik akım
12. Kırık bölgesinde denervasyon olması
13. Yeterli tespit yapılmaması veya tespit süresinin kısa tutulması

Genel faktörler

Yaş:

Mezankimal hücre dönüşümü, yeni kemik dokusu meydana gelmesi ve kırığın yeniden şekillenmesinde etkinliği vardır (9,40).

Hormonlar:

Kalsiyum ve fosfat metabolizmasında parathormon (PTH), önemli bir düzenleyicidir. PTH, kemik mineral dansitesini arttırır, kırık riskini azaltır ve kırık iyileşmesini arttırır. Kalsitonin ve insülin de kırık iyileşmesini arttırır (9,41,42). Hem kompakt, hemde trabeküler kemik yapımını arttıran kalsitonin, PTH'nun antagonistidir. Yeni kemik oluşumu ile kalsitonin dozu arasında doğru orantı mevcuttur. Fakat iyileşmeye olumlu etki mekanizması henüz tam netlik kazanmamıştır.

Büyüme hormonu gibi anabolizan hormonlar, proteine bağlı kalsiyum (Ca^{+2}) artışını etkileyerek kırık iyileşmesine olumlu etki ederler.

Tiroid hormonunda PTH gibi kemiğin yeniden şekillenmesine etki ederek kırık iyileşmesi arttırdığı düşünülmektedir.

Kortizonun kırık iyileşmesini yavaşlatması osteoblast gelişimi ve matriks oluşumuna olumsuz etkisine bağlıdır. Kallus oluşumunu da azaltır.

Genel durum:

Kronik hastalıklar ve beslenme bozuklukları kırık iyileşmesine olumsuz etki eder. İltihabi olaylar, hiperemi nedeniyle kalsiyum (Ca^{+2}) tuzlarının çözünmesini sağlar. Artan lökositlerin proteolitik enzimleri, matriksin dejenere olmasına neden olur (43).

Kırık iyileşmesini olumlu ve olumsuz etkileyen faktörler:

Sigara:

Çalışmalar göstermiştir ki sigara içimi yerel kan akımını azaltmakta, osteoblast oluşumunu ve kemik metabolizmasını yavaşlatmaktadır, böylece kırık iyileşmesini bozmaktadır. İleriye ve retrospektif kohort çalışmaları, bu temel bilim kanıtını doğrulamaktadır ve sigara içen hastalarda yüksek oranda kaynama yokluğu ile daha uzun iyileşme süresi görülmektedir. (44-45)

Diyabet:

Diabetis mellitus, kendisiyle bağlantılı olan risk faktörleri periferik nöropati ve periferik vasküler hastalıklara ek olarak, kırık iyileşmesini doğrudan da etkiler. Diabetik ratlarda yapılan bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla kırık kallusunda %29 daha az gerilme kuvveti ve %50 daha az sertlik olduğu gösterilmiştir. Bu dezavantaj, şeker kontrolü yapılarak düzenlenebilir. Klinik çalışmalar, sağlıklı hastalar ile kıyaslandığında diyabetik hastaların daha yüksek oranda gecikmiş kaynama, kaynamama ve uzamış iyileşme süresi gösterdiğini ortaya koymuştur (46-47).

Diyet/ Beslenme:

Özellikle diyetteki kalsiyum ve vit- D eksikliğine bağlı bozuklukları, uzun zamandır bozulmuş kırık iyileşmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bir çalışmada, kırık kaynama yokluğu tedavisi gören hastaların %84'ünde metabolik endokrin anormallikler saptanmıştır, bunların %68'inde vitamin D eksikliği bulunmuştur. Ek olarak hiperparatiroidizm ve düşük büyüme hormon seviyelerinin yüksek kaynama yokluğu ile seyrettiği bulunmuştur (48,58).

İlaçlar:

Bazı ilaçların kemik iyileşme kapasitesini kısıtladığı gösterilmiştir. NSAİİ'ler akut ağrı ve şişliği etkin olarak azaltır ve kırıklarda narkotik gereksinimini düşürür. Ancak, temel bilimsel kanıtlar NSAİİ'lerin kemik kaynamasını yavaşlatma potansiyeli ya da kaynama yokluğu riskini artırması sebebiyle önerilmemektedir. Yeni literatür derlemelerine göre, kırık iyileşmesinde NSAİİ klinik kullanımının önemli bir zararlı etki ettiğini göstermemiştir. Yazarlar basit kırık tipine sahip hastaların bu ilaçlardan mahrum bırakılması için yeterli kanıt olmadığı sonucuna varmışlardır (49-50).

Sistemik kortikosteroid kullanımında hayvan modellerinde kırık iyileşmesini inhibe ettiği, kallus sertliğini azalttığı ve intertrokanterik kalça kırıklarında kaynamayı geciktirdiği gösterilmiştir (51).

Osteoporoz tedavisinde ve yetmezlik kırık önlenmesinde yoğun olarak kullanılan sistemik bifosfonatlar, kemikteki hidroksipatite tutunarak osteoklastların

kemik rezorpsiyonunu önlemekte ve böylece kemiğin yeniden şekillenme hızını azaltmaktadır. Değişik hayvan modellerinde bifosfanat kullanımı ile kallus hacmi, trabeküler kemik hacmi ve kemik mineral içeriğinin arttığı ama bunun yanı sıra, kallus olgunlaşması ve yeniden şekillenmenin geciktiği gösterilmiştir (52-54).

İskemi:

Uzun süre turnike kullanımı, vasküler yaralanma, kompartman sendromu gibi nedenlerden dolayı kırık hattının dolaşımı bozulur. Bunun sonucunda da iskemi-reperfüzyon hasarı meydana gelir. Bu hasar sonrasında çeşitli mekanizmalarla meydana gelen serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesini olumsuz etkilediği bilinmektedir (55-59).

2.3 İskemi

İskemi, perfüzyon yetersizliğine bağlı olarak, dokuya gerekli olan oksijen ve diğer metabolitlerin dolaşım tarafından karşılanamaması ve meydana gelen artık ürünlerin yine dolaşım ile buradan uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır.

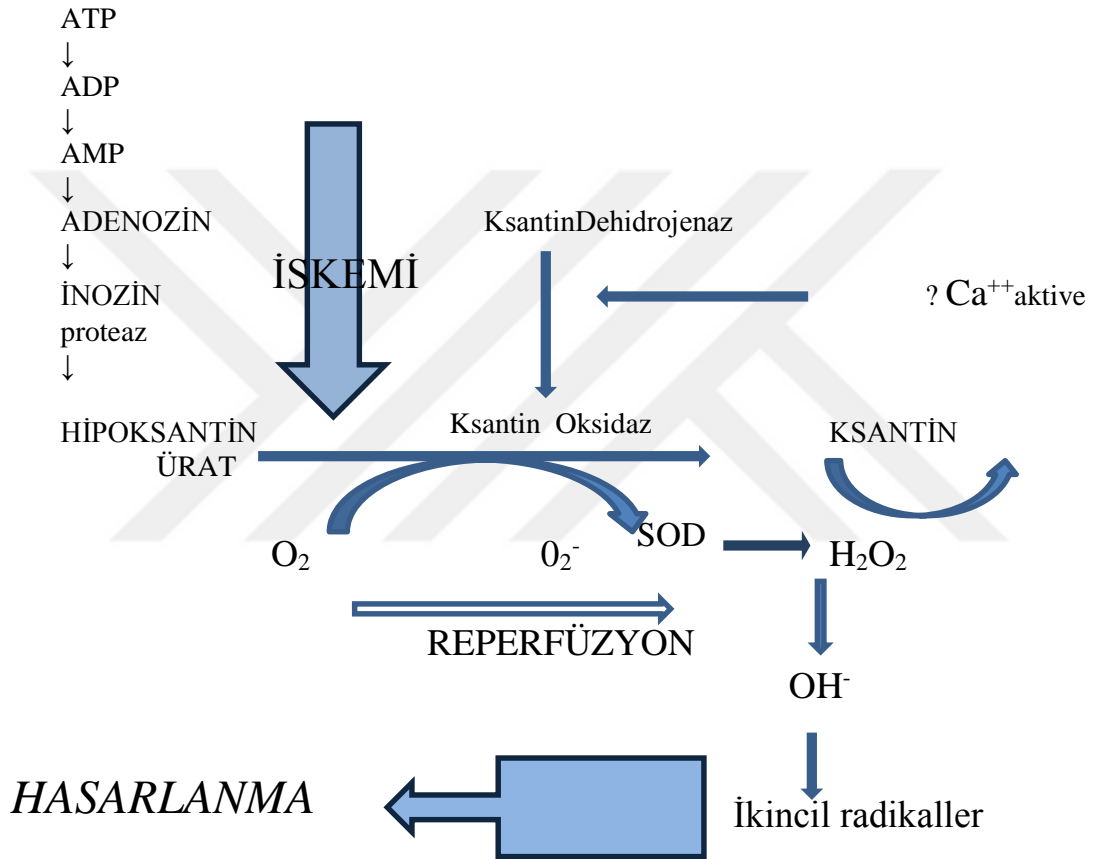
Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen ulaşması şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir (60).

Oksijen yokluğu sonucunda aerobik metabolizmanın yavaşlamasıyla hücre içi adenosin trifosfat (ATP) depoları boşalır. Sonrasında ATP bağımlı kalsiyum (Ca^{+2}) transportunun sağlanamaması sonucu ekstraselüler kalsiyum (Ca^{+2}) plazma membranından intraselüler alana transfer olur.

Hücre içi depolarda bulunan kalsiyumun da sitoplazmaya geçmesiyle hücre içerisinde artan kalsiyum; fosfolipazlar, proteazlar, ATPaz'lar ve endonükleazları aktive ederek hücrel membranların hasarlanmasıyla başlayan geri dönüşsüz hücre hasarına yol açar. Hücre içi ATP miktarının azalması sonucu, kalsiyum (Ca^{+2}) artışının yanı sıra, sodyum-potasyum ATPaz pompasının çalışmamasına bağlı olarak hücre içi sodyum miktarı da yükselir. Sodyum artışıyla birlikte hücre içerisine su girmesi sonucu hücrel şişme meydana gelir. Bunun sonucu hücre içi osmotik basıncın artmasına neden olan inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin de toplanması olur. Anaerobik metabolizmanın artmasıyla laktik asit ve inorganik fosfatlar depolanarak hücre içi

pH'ı düşer. Sonraki olay ise protein sentezinin azalmasıdır.

Eğer hipoksi geçici değilse, ATP miktarının daha da azalmasıyla hücrel membran hasarı artarak geri dönüşümsüz hücrel zedelenme olur (Şekil 1) (61-62).



Şekil 1 : İskemi-reperfüzyon hasarı şematik özeti

2.4 Reperfüzyon

İskemik dokuda, yeniden kan akımının sağlanması ile hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi sağlanır. İskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlaması ile paradoksal olarak doku hasarına yol açar. Birçok çalışmada, iskemi-reperfüzyon hasarının iskemik hasara

göre çok daha fazla toksik ürün oluşturduğu gözlenmiştir (62). (Şekil 1).

İskemik dokuya yeniden sunulan oksijenin iskemi sonucu aktive olmuş endotel hücreleri ve aktive lökositlerde bulunan mitokondriyal enzimlerce kullanılması bol miktarda serbest oksijen radikali meydana getirir. Mikrosirkülasyon aşamalarında aktive olmuş endotel hücrelerinde fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşurken nitrik oksid oluşumu azalır. Bu dengenin bozulması, endotel hücrelerinden inflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasına ve lökosit-endotel hücreleri için adhezyon moleküllerinin sentezinin artmasıyla sonuçlanır (63- 66).

Nötrofiller serbest oksijen radikallerinin üretiminde ve iskemi-reperfüzyon hasarı gelişmesinde önemli rol oynarlar. Nötrofiller reperfüzyonla sağlanan oksijeni kullanarak serbest oksijen radikali üretilmesi ve oksidan doku hasarı gelişiminde önemli rol oynayan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, elastaz, ksantin oksidaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini sağlarlar. Nötrofillerin aktivasyonu ile sentezlenen plazminojen aktivatörü, apolaktoferrin, komplemanı aktive eden enzim, kollajenaz, elastaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler, hasarın daha da artmasına neden olur. Endotel hasarı sonucu vasküler geçirgenlik artarak nötrofillerin dokuya göçüne yardım eder (67).

İskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde rol oynayan etkenler şu şekilde sıralanabilir.

- Endotel hasarı
- Serbest oksijen radikalleri (SOR)
- Lökosit (PNL) aktivasyonu
- Kompleman sistemi aktivasyonu

2.4.1 Serbest Oksijen Radikalleri

İleri derecede reaktif, kısa ömürlü, en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren ve instabil moleküllerdir. Kimyasal formüllerde bu elektron “ \cdot ” simgesi ile (ör: OH \cdot gösterilir.)

Moleküler oksijenin indirgenmesi ve eksitasyonu ile değişik serbest oksijen radikalleri sentezleyebilirler.

Serbest oksijen radikalleri şu yollarla oluşmaktadır (68).

Radyan enerji Emilimi (ultraviyole, X ışını).

- Hücrede gerçekleşen oksidasyon redüksiyon reaksiyonları (örneğin: solunum, ksantin oksidaz, fenton reaksiyonu).
- Eksojen kimyasal maddelerin ve ilaçların enzimatik metabolizasyonu.
- Nitrik oksid (NO); endotel, makrofaj ve nöronlarda önemli bir kimyasal mediyatördür ve serbest radikale farklılaşabilir.
- İskemik hasarlı bölgenin reperfüzyonu ve oksijen terapisi sırasında.
- İnflamasyonda polimorf lökositler ve makrofajlar yolu ile

İnstabilite nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir (69-71).

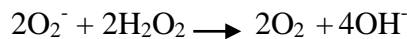
Bu bileşikler normal metabolik reaksiyonlar sırasında üretilebildiği gibi, inflamatuvar hasar, kimyasal hasar, hücre yaşlanması ve radyasyon hasarı gibi çeşitli hücresele olaylar sırasında da üretilirler (70,72,73).

Organizma, üretilen bu radikalleri temizlemek için antioksidan sistemlere sahiptir; ancak serbest oksijen radikallerinin aşırı miktarda üretiminde bu koruyucu sistemler yetersiz kalmakta ve buna bağlı oksidan hasar oluşmaktadır (66).

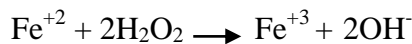
Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Yapısında ortaklanmamış elektron içermediği için radikal özelliği taşımaz. Reaktif tür olarak adlandırılmasının nedeni demir (Fe⁺⁺) veya diğer geçiş metallerinin varlığında hidroksil radikaline dönüşmesidir. Süperoksit radikalinden farklı olarak biyolojik zarları kolayca geçebilme özelliğine sahiptir (74). Süperoksit molekülünün iki adet hidrojen (H⁺) almasıyla oluşur. Katalaz enzimiyle H₂O ve O₂’e yıkılarak etkisizleştirilir.

Hidrojen peroksitin hidroksil oluşturduğu reaksiyon Haber-Weis reaksiyonu olarak bilinir. Bu reaksiyon katalizörlü (Fe⁺² ya da Cu⁺² gibi metal iyonlarının indirgenmesiyle) ya da katalizörsüz meydana gelebilir.



Fe⁺² iyonunun katalizörlüğünde gerçekleşen Haber-Weis reaksiyonuna Fenton reaksiyonu denir ve aşağıdaki gibidir.



Hidroksil (OH⁻)

Reaktif oksijen türleri içerisinde bilinen en güçlü ve en reaktif olanıdır (75). Yarılanma ömrü çok kısadır ve oluştuğu dokuda büyük oranda toksisiteye neden olurlar (76). Hidrojen peroksitin Haber-Weis ve Fenton Reaksiyonları sonucu indirgenmesiyle oluşur. Geçiş metallerinin, özellikle de demir ve bakır iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör etkisi gördükleri saptanmıştır (77). Hücrel membranlarda bulunan lipitlerin peroksidasyonunda önemli rol oynar (76).

Nitrit oksid(NO)

Nötrofiller, makrofajlar, hepatositler ve endotel hücrelerinde nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenirler.

Nitrik Oksid Sentaz (NOS) enziminin 3 farklı formu bulunmaktadır. Nöronal dokuda bulunan formu nNOS, endotelde bulunan formu eNOS, makrofajlarda bulunan ve inflamatuvar durumlarda aktivitesinde belirgin artış olan formu ise iNOS formudur.

Nitrik oksitin sinir sistemi, vasküler sistem ve immün sistem hücrelerinde birçok faydalı etkileri vardır. Radikal olarak reaktivitesi düşük olmasına rağmen metal içeren bileşikler ve radikaller ile yüksek hızla reaksiyona girer.

Lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO[•]ya antioksidan bir etki oluşturur. NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenerek etkisiz hale getirilir. Oksijen radikallerinden farklı olarak nitrik oksidi ortamdaki uzaklaştıran herhangi bir enzim bulunmaz. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO miktarının artması ile oksidasyonu da hızlanır ve böylece çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri meydana gelir. Bu reaktif türler hücrel moleküllerin nötrazilasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanması gibi NO[•] in dolaylı etkilerinden sorumludur (78).

Süperoksit (O₂⁻)

Oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu tüm aerobik hücrelerde oluşur. İskemi-reperfüzyon olayında dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit radikali direkt olarak çok fazla zarar vermez. Esas olarak zararlı etkisi

hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşumunda rol alması ile olur.



Süperoksitin diğer önemli bir etkisi NO ile peroksinitriti (NO₂⁻) meydana getirmesidir. Süperoksit, bu şekilde NO'ın faydalı etkilerini önler. Peroksinitritin hücrel yapılar için direkt zararlı etkileri olduğu gibi çeşitli reaksiyonlar sonucunda azot dioksit (NO₂), hidroksil (OH[•]), NO₂⁻ gibi daha toksik radikalleri oluşturarak da toksik etkiyle sonuçlanır.

Ksantin Oksidaz Enziminin Rolü

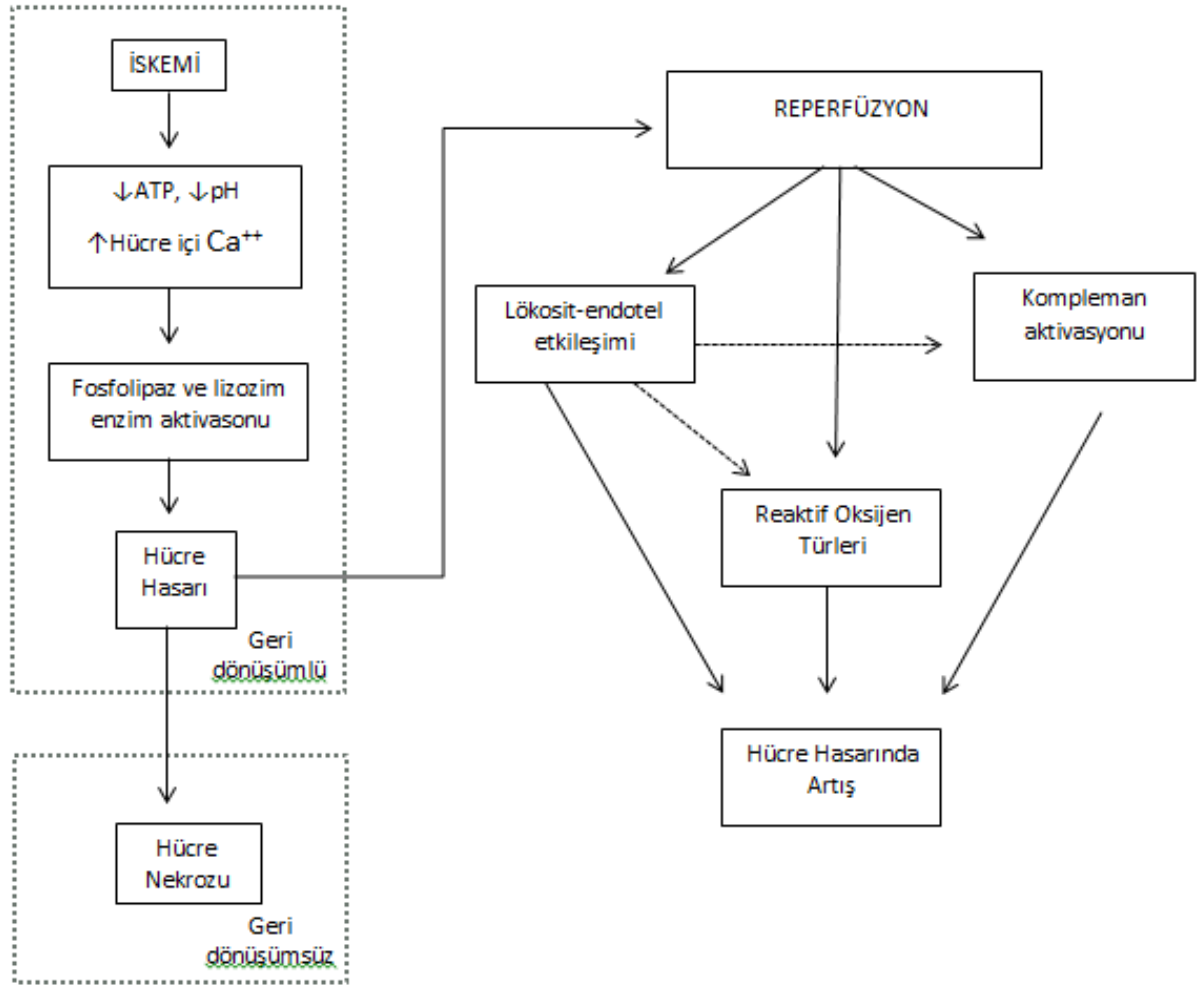
Ksantin oksidaz endotel hücrelerde bulunur ve serbest oksijen radikali üretiminde önemli rol oynar. Ksantin oksidaz enziminin kapiller endotel hücrelerinde aynı dokudaki diğer hücrelere göre 100 kat fazla bulunduğu gösterilmiştir (79).

Görevi ATP depolarının tükenmesi sonucu oluşan ve pürin metabolizmasının son oksidasyon ürünü olan hipoksantinine ksantine oksidasyonunu meydana getirmektir. Normal dokularda ksantin oksidaz, ksantin dehidrogenaz olarak bulunur. Elektron alıcısı olarak O₂ yerine NAD⁺ yi kullanır ve bu reaksiyon sonucunda serbest oksijen radikali oluşmaz (80).

İskemi sırasında hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun artması sonucu aktifleşen hücre içi proteazlar ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çevirir. Hücre içi ATP miktarının azalması sonucu adenozin mono fosfat (AMP) miktarı yükselir. Adenozin mono fosfat da adenozin, inozin ve hipoksantine metabolize olur. (80-81)

Ksantin oksidaz, reperfüzyonla dokuya yeniden sağlanan O₂ varlığında, hipoksantini ksantine, ksantini de ürik aside okside ederek ortama aşırı miktarda O₂⁻ ile H₂O₂ verilmesine sebep olur. İskemi sonrası dokularda süperoksit radikalının büyük kısmının kaynağı ksantin oksidaz sistemidir. (Şekil 2)

İskeminin yol açtığı bu dönüşüm farklı organlarda farklı hızlarda gerçekleşir. Barsak ve karaciğerde dönüşüm çok kısa süreli iskemilerde bile görülürken, iskelet kası ve deride daha uzun süreler gerektirir. Bu durum farklı organların iskemi reperfüzyon hasarına yanıtlarının farklı olmasının diğer bir nedeni olabilir (82).



Şekil 2: İskemi-reperfüzyon hasarında SOR oluşum mekanizması şematik özeti

Lipid Peroksidasyonu

Çoklu doymamış yağ asitlerinin (linolenik asit, araşidonik asit, linoleik asit,) oksidasyonunu içeren serbest oksijen radikalleri tarafından tetiklenen kimyasal bir olaydır.

Hidroksil radikali; protein, karbonhidratlar ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi birçok hücrel molekül ile reaksiyona girebilen yüksek oranda toksik bir serbest oksijen radikalidir.

Hücre membran lipitleriyle reaksiyona girerek lipid moleküllerinden H⁺ transferi yoluyla lipid peroksidasyonunu başlatır. Hidroksil radikalının başlattığı lipid peroksidasyonu zincirleme bir reaksiyondur ve reaksiyon bir antioksidan tarafından sonlandırılana kadar ya da lipid zinciri bitene kadar sürer gider. Lipit peroksidasyonu, lipit hiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sonlanır (81).

Kompleman Sistemi Aktivasyonu

İskemi-reperfüzyon hasarı, kompleman aktivasyonu ve bazı proinflamatuvar mediatörlerin oluşmasına neden olur. Kompleman sisteminde bu uyarılma ile; çeşitli proinflamatuvar molekülerin sentezinin artmasıyla trombosit, nötrofil ve endotel hücreleri arasındaki etkileşimin artmasıyla inflamatuvar yanıtın daha da şiddetlenmesiyle sonuçlanır (83-84).

İskemi-reperfüzyon hasarında anafilotoksinler (C3a, C5a) ve membran atak kompleksleri (C5b-9) önemli rol oynar. C5a, lökosit aktivasyonunun ve kemotaksisinin stimülasyonu yoluyla; lökosit-monosit-kemoatraktan protein-1 (MCP-1), TNF- α , IL-1, IL-6 gibi inflamatuvar ürünlerin artmasına neden olur (75-76). C5b-9 endotelial relaksasyon ve endotelial cGMP yi azaltarak vasküler tonusta değişikliğe neden olur. Sonuçta kompleman aktivasyonu iskemik organlarda vasküler hemostazı değiştirip kan akımında değişikliklere ve lökositin endotele adhezyonun artmasına neden olabilir (85-86).

Endotel Hücre Hasarı

İskemi reperfüzyon hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli görevleri vardır. Vasküler endotelyal tabaka, lokal hormonların ve otokoidlerin etkisiyle vasküler düz kas hücrelerinin tonusunu düzenler (87).

Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve fonksiyonunun bozulmasına sebep olur. Endotel hücreleri serbest oksijen radikali için potansiyel hedefken diğer taraftan da serbest oksijen radikali üretim merkezidir. Endotel hücreleri mikrovasküler tonustan sorumlu olan NO[•]i ve endotelin üretir. Nitrik oksid arteriyel dolaşımında endotelinin vazokonstriktör etkisini tersine çevirerek vazodilatasyon meydana getirir. Serbest oksijen radikali üretimi ile nitrik oksid

sentezi azalarak endotelin/NO oranında endotelin miktarı artar. Sonuçta arteriyel daralma, venlerde genişleme olur (38). Serbest radikallerin etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak çeşitli inflamatuvar maddelerin yanısıra büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A₂ salgırlarlar. Bu maddeler, lökositleri ve kompleman sistemini aktive ederek inflamatuvar yanıtın daha da şiddetlenmesine neden olarak iskemi rreperfüzyon hasarının şiddetlenmesine sebep olur. (88)

2.5 Antioksidanlar

Organizma oksidan hasarın etkilerini sonlandırmak için endojen antioksidan sistemlere sahiptirler. Bu sistemler enzimatik olan ve olmayan diye iki kısma ayrılabilir.

Enzimatik olmayan antioksidanlar

Alfa Tokoferol (Vitamin E)

Plazmada en fazla yer alan ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan tipidir. Yağda çözünen hücresel ana antioksidandır. Görevi membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunun ve hücre membranlarının hasarlanmasının engellenmesidir. (89-90)

Tokoferol serbest radikallere elektron transfer ederek, radikallerin hücre membran proteinleri ile reaksiyona girmesini ve lipid peroksidasyonunun başlatılmasını engeller (91- 92).

Vitamin E, insan vücudu için esansiyeldir ve dışarıdan alınması şarttır. Diğer vitaminler enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak rol almasına rağmen vitamin E'nin böyle bir özelliği yoktur. Bu yüzden bir vitaminden daha çok bir antioksidan olarak nitelendirilir (91).

Askorbik Asit (Vitamin C)

Bitkilerde bulunan suda çözünebilen antioksidan etkili esansiyel bir vitamindir.

Özellikle serbest radikalleri suda çözülmesi sayesinde etkisiz hale getirir.

Elektron verici bir ajan olması nedeniyle nitrat, moleküler oksijen, sitokrom a ve c''yi indirgeyebilir. Bir elektronun verilmesi sonucu askorbat, dehidroaskorbat (DHA) radikaline çevrilir. Askorbat, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca

reaksiyona girerek vitamin C kaynağı olarak kullanılan DHA meydana getirir.

Membrana bağlı Vitamin E'nin rejenerasyonunu da sağlar. Ayrıca LDL oksidasyonunu önlemede askorbatın α -tokoferole göre daha güçlü olduğu görülmüştür. Ayrıca askorbik asit tarafından Fe^{+3} , Fe^{+2} 'e dönüştürülmektedir. Fe^{+2} böylece hidrojen peroksidin hidroksil radikaline çevrilmesine neden olmaktadır (91,93). Askorbik asit tek başına pro-oksidan etkilidir ve bakır ile demir tuzları için indirgeyici olarak davranmaktadır.

Beta-Karoten (Vitamin A)

Sebze ve meyvelere renk veren, antioksidan etkili maddelerdir. En önemlileri α -karoten, β -karoten, kantaksantin, krosetin, likopen ve fukoksantindir. Beta-karoten antioksidan etkisini serbest oksijeni yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipitlerini oksidatif dejenerasyona karşı koruması özellikleriyle gösterir.

Yüksek konsantrasyonlarda beta-karoten pro-oksidan olarak davranmakta ve proteazların aktivasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca β -karotenin serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirme özelliği de vardır (91).

Enzimatik Antioksidanlar

Katalaz (CAT)

Hidrojen peroksidi su ve atomik oksijene indirgeyerek antioksidan etkisini gösterir ve hayvansal organizmaların karaciğer ve eritrositler olmak üzere aerobik hücrelerinde bulunur (94).

Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Hidrojen peroksidin indirgenmesinde önemli rol almaktadır. Katalitik aktivitesini seleno-sistein bileşiği sınıfına girerek sağlar. Ko-substrat olarak glutasyonun olması şarttır. Glutasyonu okside ederek, SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 nun H_2O 'ya indirgenmesini sağlar (94).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Vücutta farklı formlarda bulunan, endojen olarak sentezlenen ve organizmayı oluşturan esansiyel bir enzimdir. En çok bulunan bakır-çinkolu formu

(CuZn-SOD) sitoplazmada bulunur. Ekstrasellüler SOD, sadece fibroblast ve endotelial hücreler tarafından salgılanır ve heparan sülfatlara bağlı olarak hücre yüzeyinde eksprese edilir ve damar tonusunun düzenlenmesinde de rol oynar.

Süperoksit dismutaz süperoksit radikaline bir elektron verip H_2O_2 oluşturarak süperoksit radikalinin ortamdan temizlemesini sağlar. Oluşan H_2O_2 , katalaz ve GPx tarafından suya indirgenerek toksik etkisi nötralize edilir. Süperoksit dismutaz antioksidan etkisini süperoksit ile Fe^{+3} 'ün, Fe^{+2} 'ye indirgenmesi sonucunda hidroksil oluşumunu engelleyerek de yapar (91,95).

Diğer Antioksidan Moleküller

- Ürik Asit
- Glutasyon (GSH)
- Koenzim Q10

İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar

- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- Sitokinler (TNF ve IL-1)
- Barbitüratlar
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar)
- Trolox-C (vitamin E analogu)
- Nötrofil adhezyon inhibitörler
- Demir şelatörleri

- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıran (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)

Deneysel Çalışmalarda Antioksidan Etkisi Gösterilen Maddeler (96)

- Montelukast
- Oktreotid
- Beta-glukan
- Alfa-lipoik asit
- MESNA (2-merkaptöetan sulfonat)
- Ginkgo biloba alkaloidleri
- Resveratrol
- Üzum kabuğu ekstresi
- Oksitosin
- Pentoksifilin
- N-asetilsistein
- Melatonin
- CAPE(Caffeic acid phenethyl ester) (97)

2.6 Edaravone

Edaravone (3-methy-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, $C_{10}H_{10}N_2O$, MCI-186) güçlü bir sentetik serbest oksijen radikal temizleyicisidir (89-90). Etkisini lipit peroksidasyonunu inhibe ederek gösterir. Bunun yanında hidroksil ve süperoksit anyon seviyelerinin artışını baskılayarak çeşitli serebral iskemi ve inme modellerinde etki ettiği görülmüştür (98-99).

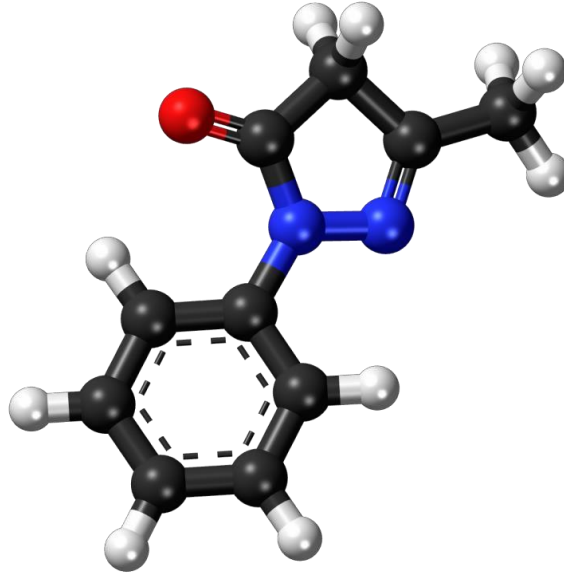
İlaç ilk olarak 2001 yılında Japonya'da iskemik stroke tedavisinde kullanılmıştır (100-101).

Serbest oksijen radikal temizleyicisi olmasının yanı sıra oksidatif stres, sitokinler, doku nekrozu, apoptoz, tümör markerları ve hücre adhezyon molekülleri üzerinde azaltıcı rol oynadığı da görülmüştür.

Yakın zamanda yapılan araştırmalarda edaravonun geç nöronal hücre ölümünü baskıladığı, mikroglia bağımlı hücre ölümünü engellediği, uzun dönem inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir.

Lipid oksidasyon hasarına sebep olan lipoksijenazı Edaravone inhibe etmektedir. Aynı zamanda matrix metalloproteinaz-9 (MMP-9) inhibisyonu yaparak vasküler hasar ve intraserebral kanama üzerine koruyucu etkileri bulunduğu gösterilmiştir (102).

Biyokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri

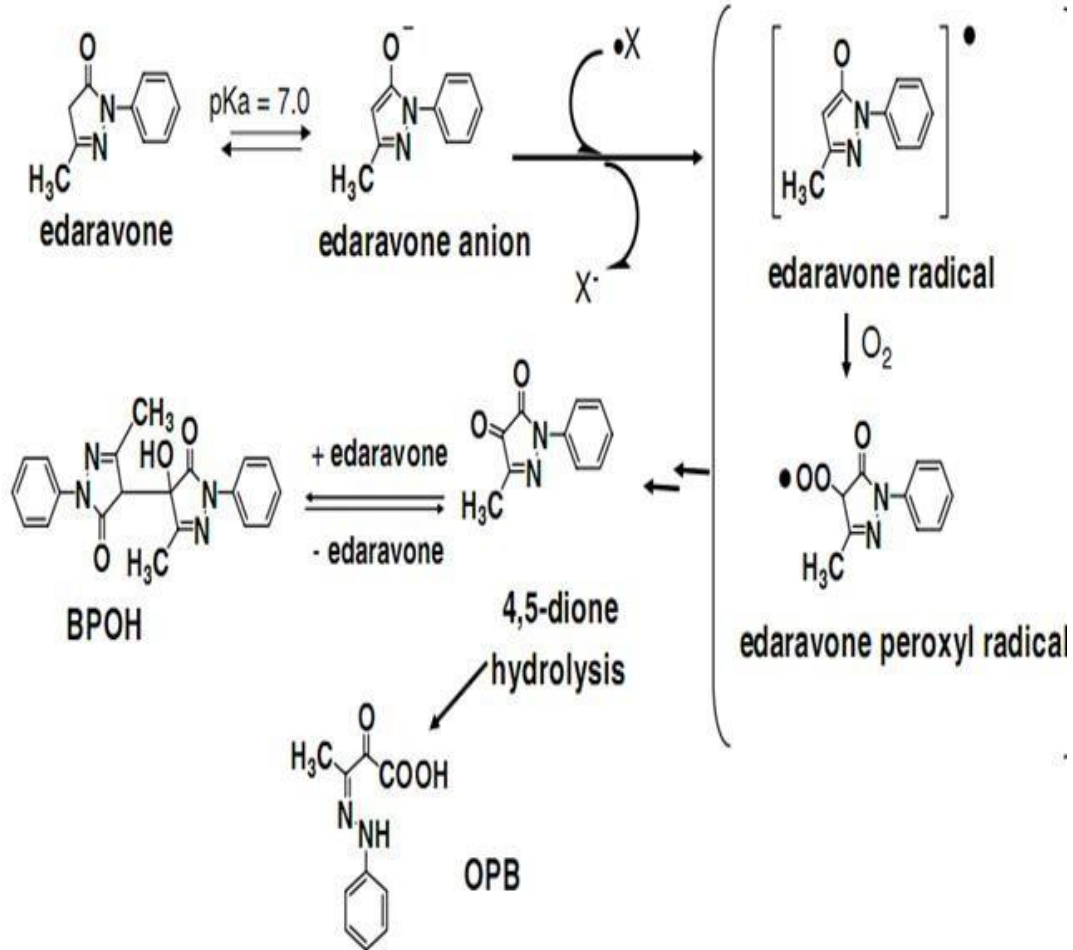


Resim 9 : Edaravone molekülünün (3-metil-1-fenil-2-prazolin-5-one) kimyasal formülü

Hücre membran geçirgenliği yüksek olan yağda ve suda çözünürlüğü olan düşük molekül ağırlığına sahip olan(MW 174.2) bir moleküldür. Hidrazin ve 3-oxopropionik asit esterlerinden meydana gelir. Yaklaşık yarısı fizyolojik pH'da anyonik formda bulunur.

Edaravone reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu doku hasarını iyileştirir. Serbest oksijen radikallerinden elektron transferi yaparak serbest oksijen radikali temizleyici olarak etki gösterir. Ayrıca Edaravone peroksidikali üzerine inhibitör etki göstererek E ve C vitamini etkilerine benzer etki gösterir (103).

Edaravone, karaciğerde glukonata metabolize olur ve sulfatla konjüge edilerek idrar yoluyla vücuttan temizlenir (104).



Şekil 3: Edaravonun antioksidan aktiviteyi nasıl etkilediğini kabul edilen mekanizma tablosu

Edaravone anionundan bir elektron peroksil radikaline transfer olur. Bunun sonucunda Edaravone radikali ve peroksil anyonu oluşur. Bu reaksiyon lipid oksidasyonundaki zinciri kırar. Daha sonra Edaravone peroksil radikali bir hidrojen atomu ve bir elektron eliminasyonu ile 4,5-dion'a dönüşür. Sonuç olarak 4,5 dionun hidrolizi sonucu 2-okso-3-(fenilhidrazon)- butonoik asite (OBP) dönüşür. (104)

2.6.1 Edaravone'un Sistemik Etkileri

A-İskelet ve Kas Sistemi Üzerine Etkileri

a-Osteoartrit Üzerine Etkisi

Huang ve ark. yaptığı çalışmaya göre kondrositlerce salgılanan proinflamatuvar sitokinler sonucunda tip 2 kollajen kaybı olduğu ve TNF- α tedavisine bağlı tip 2 kollajen kaybının Edaravone tedavisi ile ortadan kaldırılabileceği bulunmuştur.

Özellikle MMP- 3 ve MMP -13 tarafından aracılık edilmiş tip 2 kollajen kaybında Edaravone'un önleyici etkisi bulunmuştur. Edaravone'un TNF- α kaynaklı STAT1 aktivasyonunu ve IRF sentezini azalttığı bulunmuştur.

Bu bulgular Edaravone'un osteoartrit gelişimi için potansiyel koruyucu etkisini göstermektedir (105).

b-Kas Sistemi Üzerine Etkileri

Edaravone (MCI-186) ekstremelerde iskemi-reperfüzyon yaralanmasının önlenmesinde etkili olup olmadığını araştırmak amaçlı yapılan başka bir çalışmada ise 4 saatlik iskemi sonrasında hayvanlar değerlendirilmiş ve sonuç olarak MCI-186 ekstremelerde iskemi-reperfüzyon hasarı önlenmesinde etkili olduğu bulunmuştur. MCI-186 iskemide çok duyarlı olduğu bilinen hızlı kasılabilen glikolitik lifler içeren tibialis anterior kasında iskemi- reperfüzyon hasarı önlemede etkili olduğu görülmüştür (106).

Edaravone'un iskemik reperfüzyon hasarına karşı doğrudan iskelet kaslarında lipid peroksidasyonu önleyerek koruyucu etki sağladığını, ikincil ödem

ve dokunun inflamatuvar infiltrasyon insidansını azalatabileceği sonucuna ulaşılmıştır (107).

Yapılan başka bir çalışmada Edaravone'un postoperatif reperfüzyon hasarını önlediği immunohistolojik olarak sitokrom-c oksidaz boyama ile hücre canlılığı değerlendirilerek incelenmiştir.

Ratlar 2 gruba ayrılmış. Kontrol grubunun femoral arterleri 5 saat boyunca klemlenip sonra serbest bırakılmış. Diğer gruba ise femoral arter klemlenmeden önce 9 mg/kg Edaravone uygulanmış. 5. saat sonunda klemler açılarak alt ekstremiteler kasları sitokrom-c oksidaz boyası ile boyanmış. Pozitif alanlar bilgisayar dansitometrisi kullanılarak hesaplanmış. Edaravone grubunun kasları güçlü olarak sitokrom-c oksidaz ile boyanırken kontrol grubu boyanmadığı görülmüş. Sonuç olarak bu çalışmaya göre ratlarda preoperatif 9 mg/kg Edaravone tedavisinin postoperatif reperfüzyon hasarını önlediği düşünülmektedir. (108)

Yine Yamamura ve ark. 2010 yılında yaptığı çalışmada Edaravone'un glikojen depolarını yüksek düzeyde tutarak iskemi-reperfüzyon hasarında mitokondriyal hasarı önlediği bulunmuştur. (109)

Yine Yamamura ve ark. 2013 yılında yaptığı başka bir çalışmada Edaravone'un alt ekstremiteler kaslarında glikojen granülleri odaklanarak reperfüzyon hasarını önlemede nasıl etki ettiğini transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanarak araştırıldı. Sonuç olarak Edaravone'un kaslarda glikojen granülleri koruyarak bacak iskemi reperfüzyon hasarını önlediği görüldü (110).

Akut inme sonrasında kas atrofi ilerlemesini önlemede ve büyük ölçüde lokomotor fonksiyonunu iyileştirmede 14 güne kadar Edaravone tedavisinin etkili olduğu bulunmuştur (111).

c-Osteonekroz Üzerine Etkileri

Edaravone steroid kaynaklı osteonekrozun azaltılmasında lipid peroksidatif ürünlerini, endotel hücrelerde ve hematopoetik hücrelerde oksidatif DNA hasarını baskılayarak etki gösterdiği bildirilmiştir (112).

B-Periferik Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Yapılan bir çalışmada ratların siyatik ve tibial sinirler besleyen damarların ligasyonu sonrasında periferik sinir iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine, Edaravone'un etkileri araştırılmış. 3 grupta 1. gruba plasebo, 2. gruba standart dozda günde 3 mg/kg Edaravone toplam 7 gün, 3. gruba ise günde 1 mg/kg dozda Edaravone verilmiş. Reperfüzyon sonrası 1. haftada nörolojik ve elektrofizyolojik parametreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında standart dozda iyileşme saptanmıştır. 2. haftada bu farklılık gözlemlenmemiştir. 3. hafta sonunda kalıcı ödem ve sinir kılıfı dejenrasyonu standart dozda gözlemlenirken, düşük dozda plaseboda gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak Edaravone'un etkilerini araştırmak için uzun süreli çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (113).

C-Karaciğer Üzerine Etkileri

Edaravone oksidatif stress kaynaklı CCl₄ sebepli akut karaciğer hasarında koruyucu etkileri bulunmuştur (114). Bir başka çalışmada ise serumda artan ALT ve LDH aktivite değerleri Edaravone uygulaması ile önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (115). İskemi- reperfüzyon hasarı sonrasında MDA üretimini azaltmakta, hepatik enzim ve bilirübin üretimini düzenlemekte, oksidatif strese bağlı karaciğer hasarını iyileştirici etki, histolojik anormallikleri düzelttiği göstermektedir. İskemi reperfüzyon hasarı sonrasında artan sitokinlerin ve hücre adhezyon moleküllerinin üretimini baskılamakta ve portal kan akımını düzenlemektedir (116-118).

D-Spinal Kord Üzerine Etkileri

Abdominal aort klemplenmesi yoluyla yapılan spinal kord iskemi reperfüzyon hasarı modelinde Edaravone'un histopatolojik değişiklikleri, nörolojik disfonksiyonu ve oksidatif DNA hasarını azaltıcı etki gösterdiği, spinal kord nörolojik fonksiyonlarını düzelttiği ve spinal kord beyaz madde alanı üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu görülmüştür (118).

E-Kardiyak Etkileri

Miyositler üzerindeki koruyucu etkinliği, hücreler arası kalsiyum (Ca^{+2}) artışını inhibe etmesi ve mitokondri membranında bulunan kalsiyum (Ca^{+2}) geçiş porlarını açmasına bağlı olarak meydana gelmektedir (119-120).

Postiskemik rat kalbinde SOD, kreatin fosfokinaz ve serum MDA düzeylerini azaltmakta ve miyokardiyal nekrotik alanı küçültmektedir (121). Miyokard dokusu üzerinde iskemi reperfüzyon hasarını koruyucu etkinliği bulunmaktadır.

Akut miyokard infarktüs geçiren ve reperfüzyon süresince Edaravone tedavisi uygulanan hastalarda Edaravone infarkt alanını küçültmekte, sol ventrikül sistolik fonksiyonlarını korumakta ve reperfüzyon süresince oluşan taşiaritmi insidansını azaltmaktadır (122).

Ayrıca hipertansiyona bağlı miyokard hipertrofisini azalttığı, otoimmün miyokardiyal hastalıklarda kardiyoprotektif etkisi, tip 2 diyabetes mellitusta sol ventrikül disfonksiyonunu azalttığı görülmüştür. (123-124)

F-İntestinal Sistem Üzerine Etkileri

İntestinal mukozayı koruyucu etkisini lipid peroksidasyonu, bakteriyel translokasyonu, nötrofil infiltrasyonu, myeloperoksidaz ve IL-6 seviyelerini azaltarak gösterir (125-126).

G-Akciğer Üzerine Etkileri

Edaravone akciğer ödemi ve lökosit ekstravazasyonunu azaltmaktadır ve platelet aktive edici faktör (PAF) üretimini, fosfolipaz A₂ aktivasyonunu inhibe etmektedir. Akciğer subpleural bölgesinde fibrozisin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (127).

H-Böbrekler Üzerine Etkileri

İdrar çıkışını ve kreatin klirensini düzenlediği, kan üre ve kreatin seviyelerini azalttığı, tübüler epitelyal hücrelerde SOR üretimini baskıladığı ve böbrek fonksiyonları üzerinde olumlu etkinliğinin olduğu gösterilmiştir (121,128,129).

I-Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Oksidatif stress kaynaklı testis hasarını iyileştirdiği koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (130).



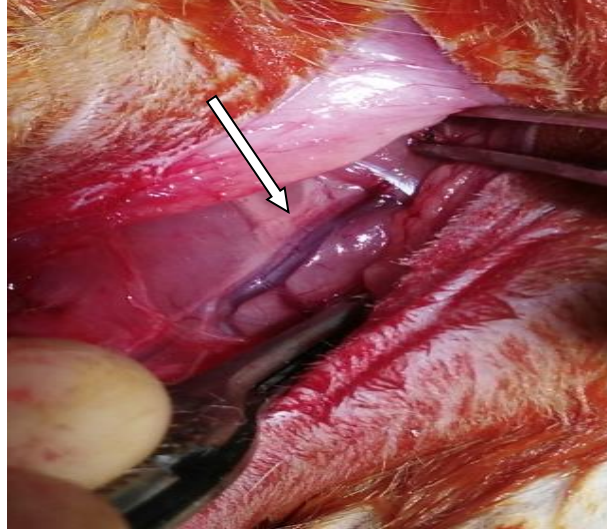
3-GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan deneyleri yerel etik kurulundan onay alınarak, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılacak gereçler için BAP desteği alındı.

3.1 Deneklerin Hazırlanması ve Operasyon Tekniği

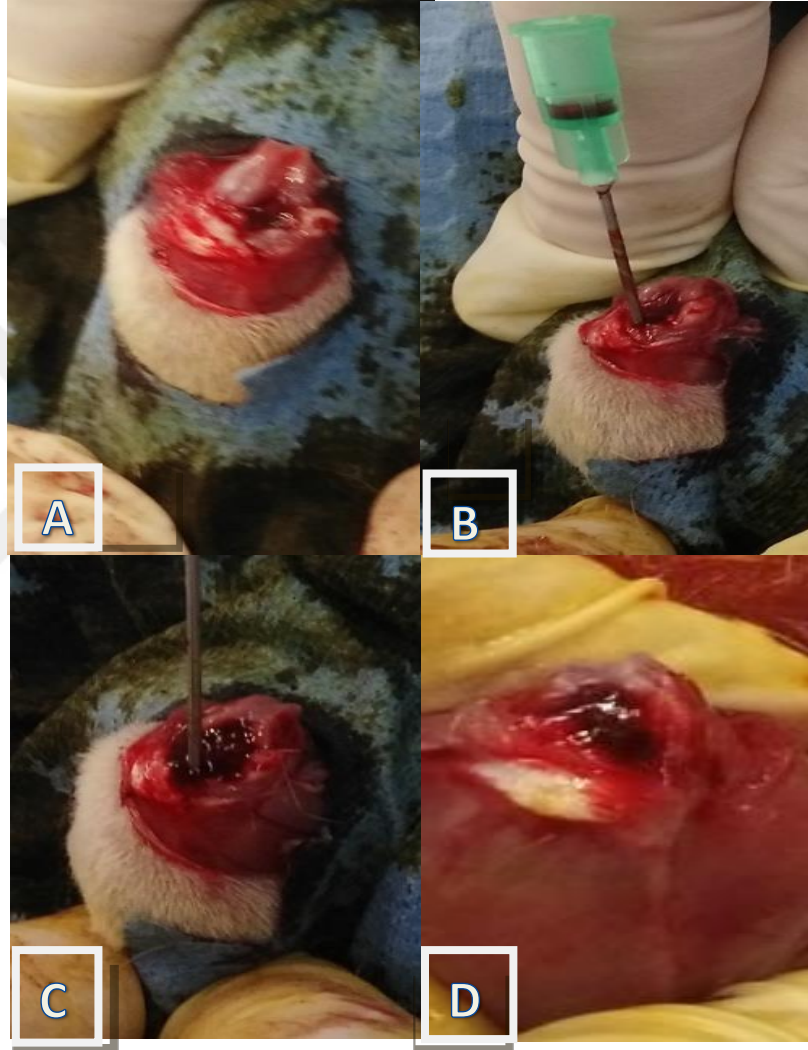
Kırkdört (44) adet rat randomize olarak, her bir grupta 11 tane olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Ortalama 250 gr (220-280 gr) ağırlığında yetişkin erkek Wistar Albino ratlar kullanıldı. Gruplar sadece kırık, iskemi-kırık, iskemi-kırık-edaravone, kırık-edaravone olarak ayrıldı. Antibiyotik profilaksisi olarak cerrahiden 30 dakika önce intraperitoneal 20 mg/kg sefazolin sodyum yapıldı ve postoperatif 8. saatte ek bir doz daha yapılarak antibiyotik profilaksisi sonlandırıldı. Genel anestezi, intraperitoneal ketamine (90 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) ile gerçekleştirildi. Wistar Albino ratların sağ alt ekstremiteleri traş edilip, aseptik şartlarda boyandıktan sonra femoral arter, sinir ve ven inguinal ligament distalinden disseke edildi. (Resim 10)

Mikrovasküler klemp ile Skjeldal ve ark. gerçekleştirdiği gibi femoral arter akımını engellemek için hazır tutuldu. (131-132)



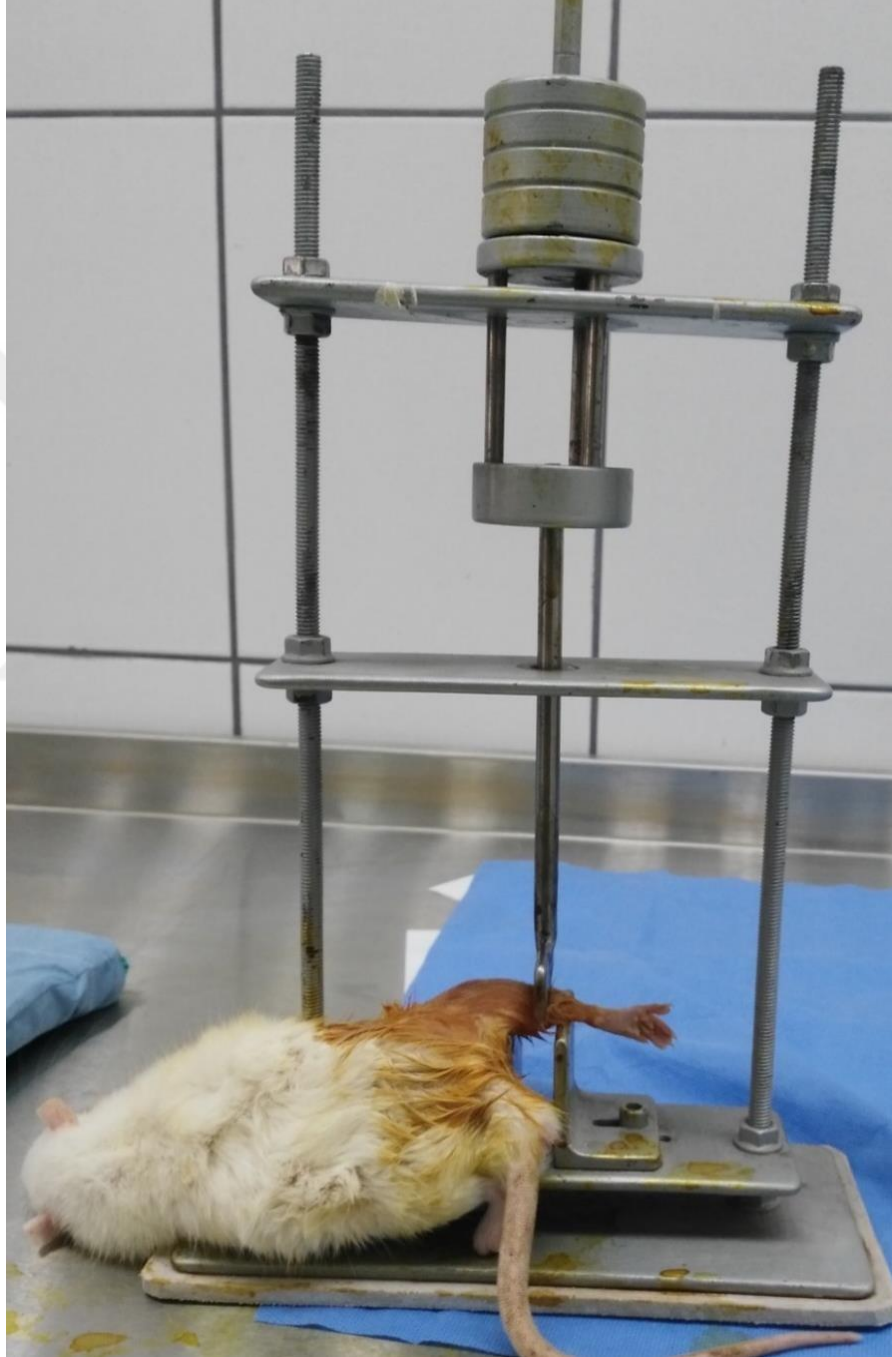
Resim 10: Rat iskemi modelinde femoral arter diseksiyonu

Sağ diz eklemine yaklaşık 1 cm'lik medial parapatellar insizyon ile girilip patella laterale disloke edildi. Tüberositas tibia'nın üzerinden 21 numara iğne ile tibia intramedüller olarak oyuldu. Tibiaya intramedüller olarak 0.8 mm paslanmaz çelik tel sokuldu. Telin dize yakın kısmı eğilerek kesildi ve patella redükte edilip, insizyon katlarına uygun kapatıldı. (Resim 11)



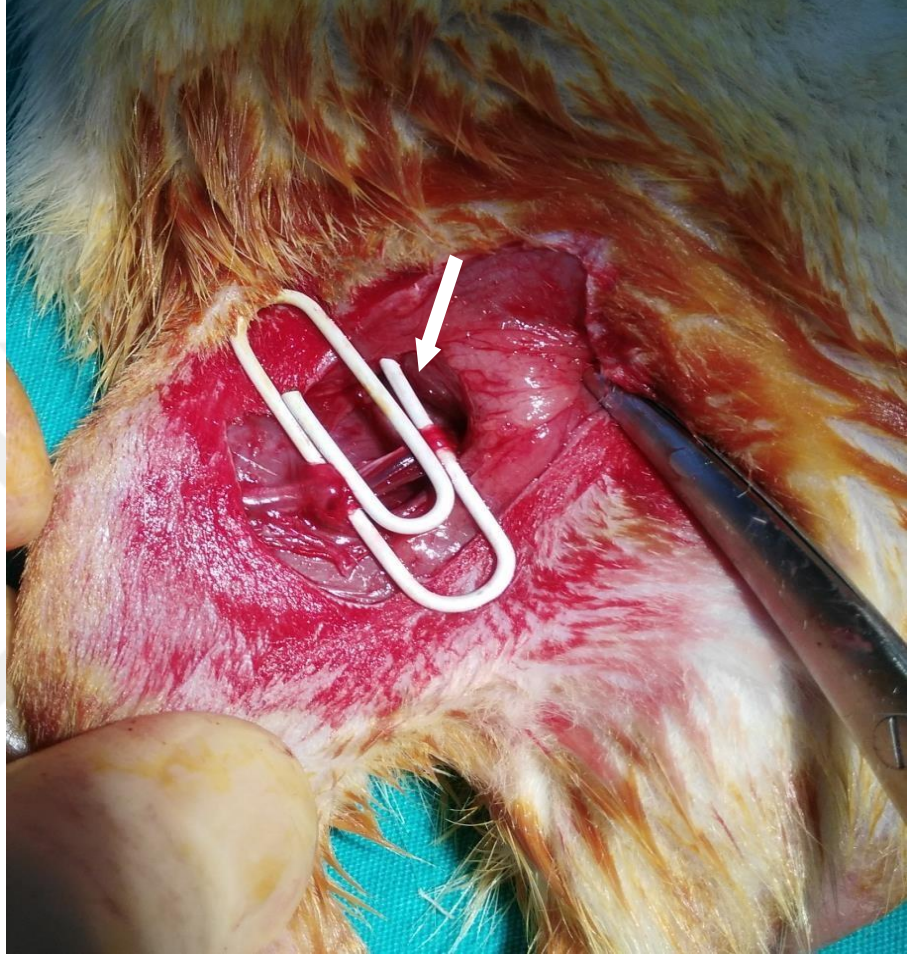
Resim 11: A- Medial parapatellar girişim, B- Tibianın intramedüller kanalının 21 numara iğne ile oyulması, C- Hazırlanan kanala 0.8 mm K teli uygulanması, D- Telin dize yakın kısmının eğilerek kesilmesi.

Sonrasında An ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde giyotin cihazında aynı mesafeden aynı miktarda ağırlık bırakılarak transvers, kapalı, diafiz ortasından tibial kırık oluşturuldu (132). (Resim 12)



Resim 12: Giyotin cihazı yardımıyla kırık oluşturma

Kırık meydana getirildikten sonraki aşamada femoral arter klemplenmesi ile iskemi gerçekleştirildi. (Resim13)



Resim 13: Femoral arter klemplenmesi

Kırık-edaravone, kırık-iskemi-edaravone grubuna, iskemi başlagıcından 30 dakika önce ve günde 3mg/kg doz 7 gün olmak üzere intraperitoneal Edaravone solüsyonu uygulandı.

3.2 Edaravone'un hazırlanması;

Daha önceden yayınlanmış makaleler referans alınarak toz halindeki Edaravone (3-methyl- 1-phenyl- 2-pyrazoline- 5-one, 5g, Sigma- Aldrich) 3 mg/kg intraperitoneal verilecek şekilde 1N sodyum hidroksit (NaOH) ile çözüldü. Oluşan derişim 1 N hidroklorik asit (HCL) ile Ph 7.35-7.40 olacak şekilde titre edildi. (133) (Resim 14)



Resim 14: Edaravone

4.5 saat iskemi sonrasında, klips açılarak iskemi sonlandırıldı. Femoral arteriyel akım tekrar sağlandı. (Resim 15)



Resim 15: Femoral arter klemplenme sonrasında bekletme

Sonrasında kasık insizyonu katlara uygun olarak kapatıldı. İskemi döneminde ve iskemi sonrasında ratlar 24°C oda sıcaklığında, supin pozisyonunda bekletildi.

Kasık bölgesi açık bırakıldığı için dokuda lokal dehidratasyonu engellemek amacıyla ıslak tampon ile üzeri örtüldü. İskemi oluşturulan ratlara, dehidratasyonu engellemek için iskemi döneminde 4 ml %0.9 NaCl izotonik solüsyon intraperitoneal olacak şekilde uygulandı. Ameliyat sonrası ağrıyı kontrol etmek için parasetamol 200 mg/ kg günde 2 kez içme sularına eklendi.

Ameliyat sonrası 1. günde kırık iskemi grubunda 3 denek hayvanının, kırık grubunda ise 1 denek hayvanının öldüğü görüldü.

Böylece gruplarda; kırık grubunda 10 denek hayvanı, iskemi-kırık grubunda 8 denek hayvanı, iskemi-kırık-edaravone grubunda 11 denek hayvanı, kırık-edaravone grubunda 11 denek hayvanı ile çalışmaya devam edildi. Deney hayvanlarının kırık tibialarına 0. ve 8. haftalarda radyolojik inceleme yapıldı.

Deney hayvanları, 8. hafta sonunda servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Tibia kemikleri yumuşak dokularından temizlendi. (Resim 16). Biyomekanik çalışmanın yapılacağı zamana kadar 4. gruba ek olarak kontrol grubunun karşı taraf (sol) sağlam tibiaları da alınarak -20°C'de saklandı.



Resim 16: Sakrifikasyon işlemi sonrasında tibiaların hazırlanması

3.3 Radyolojik İnceleme

Kırık bölgesindeki kemik oluşumu Lane ve Sandhu radyolojik puanlama sistemine göre değerlendirildi (134). (Resim 17) (Tablo 1)



Resim17: Kırık sonrasında 0. ve 8. haftalardaki tibia radyografik görünümleri

	Radyolojik Değerlendirme Sistemi	Puan
Kemik oluşumu	Kemik oluşumunun olmaması	0
	Kemik oluşumunun defektin %25'inin doldurması	1
	Kemik oluşumunun defektin %50'sinin doldurması	2
	Kemik oluşumunun defektin %75'inin doldurması	3
	Kemik oluşumunun defektin tamamını doldurması	4
Kaynama	Bariz kırık görülmesi	0
	Kaynama başlangıcı	1
	Tam radyolojik kaynama	2
Remodeling	Remodeling oluşmamış	0
	İntramedüller kanal remodelingi	1
	Korteks oluşumu	2
Her bir kategori için max	Proksimal kaynama	2
Toplam Puanlar	Distal kaynama	2
	Remodeling	2

Tablo 1: Lane-Sandhu Radyolojik Puanlama Sistemi.

3.4 Biyomekanik Değerlendirme

Biyomekanik değerlendirme Cumhuriyet Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu Madencilik ve Maden Çıkarma Bölümü'nden Öğretim Görevlisi Mahmut ÇİFÇİ gözetiminde 5 grupta "üç noktadan bükme" makinesi ile yapıldı. (Resim 18) (Hounsfield H50KM Surrey)

Tibia örnekleri, intramedüller gönderilen teller çıkartıldıktan sonra üç nokta bükme makinesinin üzerine yerleştirildi.10 mm/dakika sabit hızla kırık iyileşme bölgesinde, tekrar kırık oluşturacak şekilde kuvvet oluşturuldu. Tekrar kırık oluşturan kuvvet Newton birim olarak kayıt altına alındı.



Resim 18: Biyomekanik testin yapıldığı üç nokta bükme makinesi

3.5 Histopatolojik İnceleme

Sakrifiye edilen ratların tibialarında histopatolojik inceleme için alınan örnekler %10 nötral tamponlu formalinde 48 saat fikse edildikten sonrasında, dekal-sifikasyon için 0.1-M citrate içinde %10 formik asitte 24 saat bekletildi.

Dekalsifikasyon işleminden sonra tibiadan uzunlamasına kesitler alınarak, kırık hattı kallus bölgesinden histopatolojik inceleme için 5 mikrometre kalınlıkta parafin kesitleri hazırlandı ve histolojik inceleme için hematoksilin-eozin ile boyandı. Örnekler ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

Histolojik değerlendirme, Huddlestone ve ark. histolojik değerlendirme sistemine göre yapıldı. (135) (Tablo 2)

Grade	Kırık bölgesi histolojik bulguları
1	Fibroz doku
2	Ağırlıklı fibröz doku ve az miktarda kıkırdak doku
3	Eşit miktarda fibröz ve kıkırdak doku
4	Tamamen kıkırdak doku
5	Kıkırdak doku ve az miktarda olgunlaşmamış kemik dokusu
6	Eşit oranlarda kıkırdak ve olgunlaşmamış kemik doku
7	Ağırlıklı olgunlaşmamış kemik doku ve az miktarda kıkırdak doku
8	Tamamen olgunlaşmamış kemik doku
9	Olgunlaşmamış kemik dokusu az miktarda olgun kemik dokusu
10	Olgun (lamellar) kemik doku

Tablo 2: Huddlestone ve ark. histolojik değerlendirme sistemi

3.6 İstatistiksel Analiz

Çalışma gruplarının genel özellikleri hakkında bilgi vermek amacı ile tanımlayıcı analizler yapılmıştır. Sürekli değişkenlere ait veriler ortalama±standart sapma şeklinde verilmektedir. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Fark bulunan değişkenler için çoklu karşılaştırmalar (Post HOC Testleri/Tukey HSD) uygulanmıştır. p değerleri 0.05''den küçük hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hesaplamalarda hazır istatistik yazılımı kullanılmıştır (IBM SPSS Statistics 19, SPSS inc., an IBM Co., Somers, NY).

3.7 Deney Grupları

Grup-1 (Kontrol Grubu) (n=10)

Bu grup ratlarda kırık grubunun sakrifiye işlemi sonrasında karşı taraf(sol) sağlam tibiaları alınarak biyomekanik test yapıldı.

Grup-2 (Kırık Grubu) (n=10)

Bu grup ratların sağ tibiaları cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında opere edildi. Medial parapatellar yaklaşımla tibiaya intramedüller olarak 0.8 mm paslanmaz çelik tel sokuldu. Daha sonra giyotin cihazı ile transvers, kapalı, diafiz ortasından tibial kırık oluşturuldu. Radyolojik inceleme sonrasında 8. haftada ratlar sakrifiye edildi. Takiben sağ tibiaları alınarak biyomekanik test ve histopatolojik inceleme yapıldı.

Grup-3 (Kırık-İskemi Grubu) (n=8)

Bu grup ratların sağ tibialarına cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında medial parapatellar yaklaşımla girildi. Tibiaya intramedüller olarak 0.8 mm paslanmaz çelik tel sokuldu. Daha sonra giyotin cihazı ile kapalı, transvers mid-diafizyel tibial kırık oluşturuldu. Sonrasında femoral arter diseksiyonu yapılarak femoral artere klemp konuldu. 4,5 saat sonunda klemp açılarak iskemi reperfüzyon modeli oluşturuldu. Radyolojik inceleme sonrasında 8. haftada ratlar saktifiye edildi. Takiben sağ tibiaları alınarak biyomekanik test ve histopatolojik inceleme yapıldı.

Grup-4 (Kırık-Edaravone Grubu) (n=11)

Bu grup ratları sağ tibiaları cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında opere edildi. Medial parapatellar yaklaşımla tibiaya intramedüller olarak 0.8 mm paslanmaz çelik tel sokuldu. Daha sonra giyotin cihazı ile kapalı, transvers mid- diafizyel tibial kırık oluşturuldu. Takiben ratlara cerrahi öncesinde ve cerrahi sonrasında 7 gün süreyle 3 mg/kg dozunda Edaravone intraperitoneal olarak verildi. Radyolojik inceleme sonrasında 8. haftada ratlar saktifiye edildi. Takiben sağ tibiaları alınarak biyomekanik test ve histopatolojik inceleme yapıldı.

Grup-5 (Kırık-İskemi-Edaravone Grubu) (n=11)

Bu grup ratların sağ tibialarına gerekli cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında medial parapatellar yaklaşımla girildi. Tibiaya intramedüller olarak 0.8 mm paslanmaz çelik tel sokuldu. Daha sonra giyotin cihazı ile kapalı, transvers mid-diafizyel tibial kırık oluşturuldu. Sonrasında femoral arter diseksiyonu yapılarak femoral artere klemp konuldu. 4,5 saat sonunda klemp açılarak iskemi reperfüzyon modeli oluşturuldu. Takiben ratlara cerrahi öncesinde ve cerrahi sonrasında 7 gün süreyle 3 mg/kg dozunda Edaravone intraperitoneal olarak verildi. Radyolojik inceleme sonrasında 8. haftada ratlar saktifiye edildi. Takiben sağ tibiaları alınarak biyomekanik test ve histopatolojik inceleme yapıldı.

4- BULGULAR

Çalışma sırasında kırık-edaravone grubundan 2 (iki) tibia numunesinde atrofik psodoartroz ve malunion olduğu gözlemlendi. Kırık hattının stabilitesinin bozulması nedeni ile bunlar çalışmaya dahil edilmedi. Kırık grubundan bir ratta ise proksimal tibiada kistik yapı olduğu gözlemlendi. Çalışmada intraperitoneal Edaravone enjeksiyonu sonrası ratlarda herhangi bir yan etki görülmedi.

4.1 Radyolojik ve Morfolojik Bulgular

Sekinci hafta sonunda çalışmayla ilgili bilgisi olmayan 2 gözlemci tarafından ratların radyolojik parametreleri değerlendirildi ve tespit edilen değerlerin ortalamaları alındı. 8. hafta bitiminde çekilen grafilerde her dört gruptaki tibialar Lane ve Sandhu radyolojik puanlama sistemine göre değerlendirildi. Tüm gruplarda radyolojik olarak kaynama saptandı.

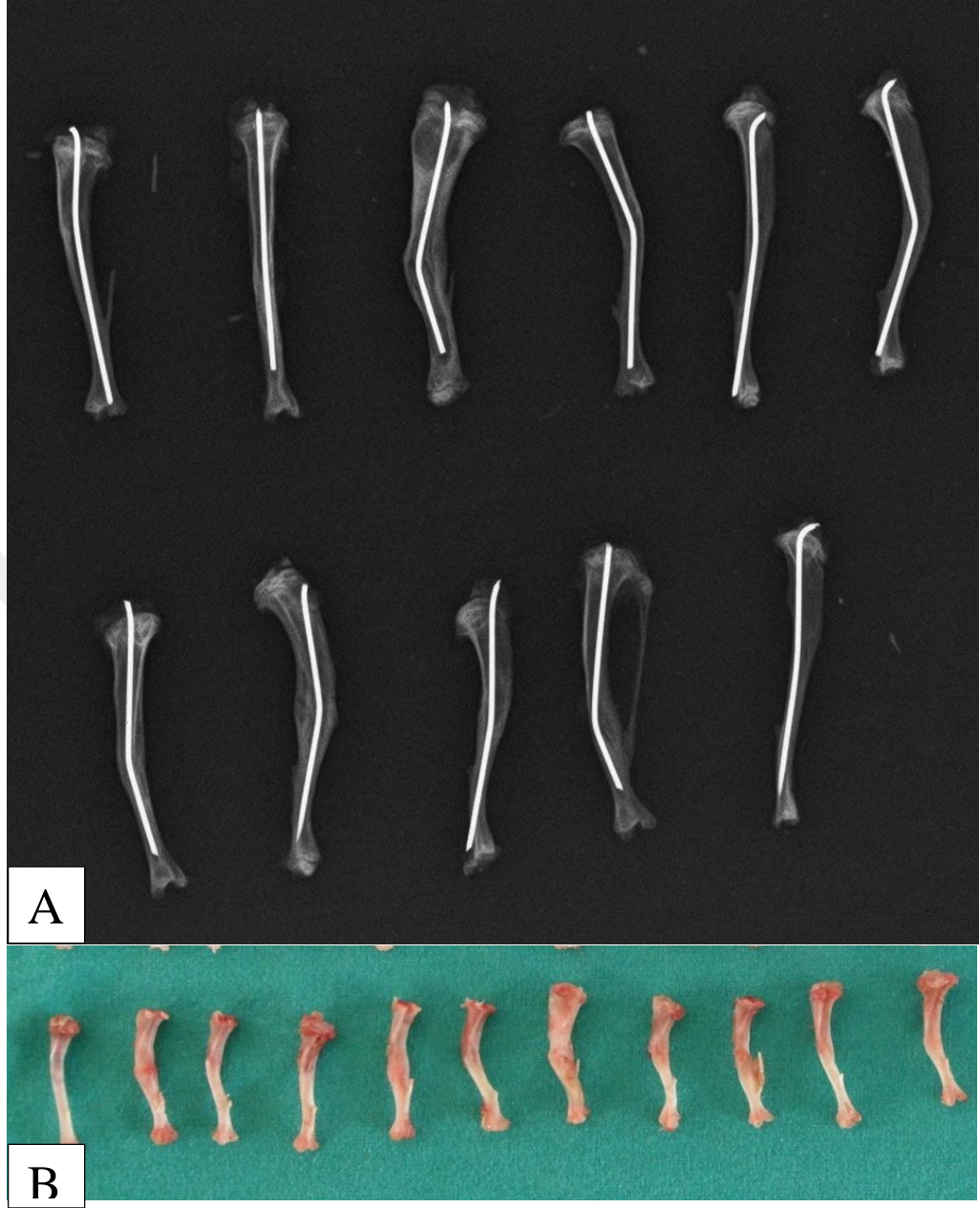
Gözlemci	Kırık Grubu (n=11)	Kırık-İskemi Grubu (n=8)	Kırık Edaravone Grubu (n=9)	Kırık-İskemi Edaravone Grubu (n=10)
1.	9,64±0,67	8,5±3,12	9,67±0,5	9,6±0,84
2.	9,36±0,81	9,13±0,83	9,67±0,71	9,5±0,97
T	1,936	0,517	0,001	0,557
P	0,082	0,621	0,999	0,591
Veriler Ort±SS şeklinde gösterilmiştir. İki Eş Arasındaki Farkın Önemlilik Testi				

Tablo 3: Gözlemcilerin gruplara göre radyolojik puan ortalaması ve analizi

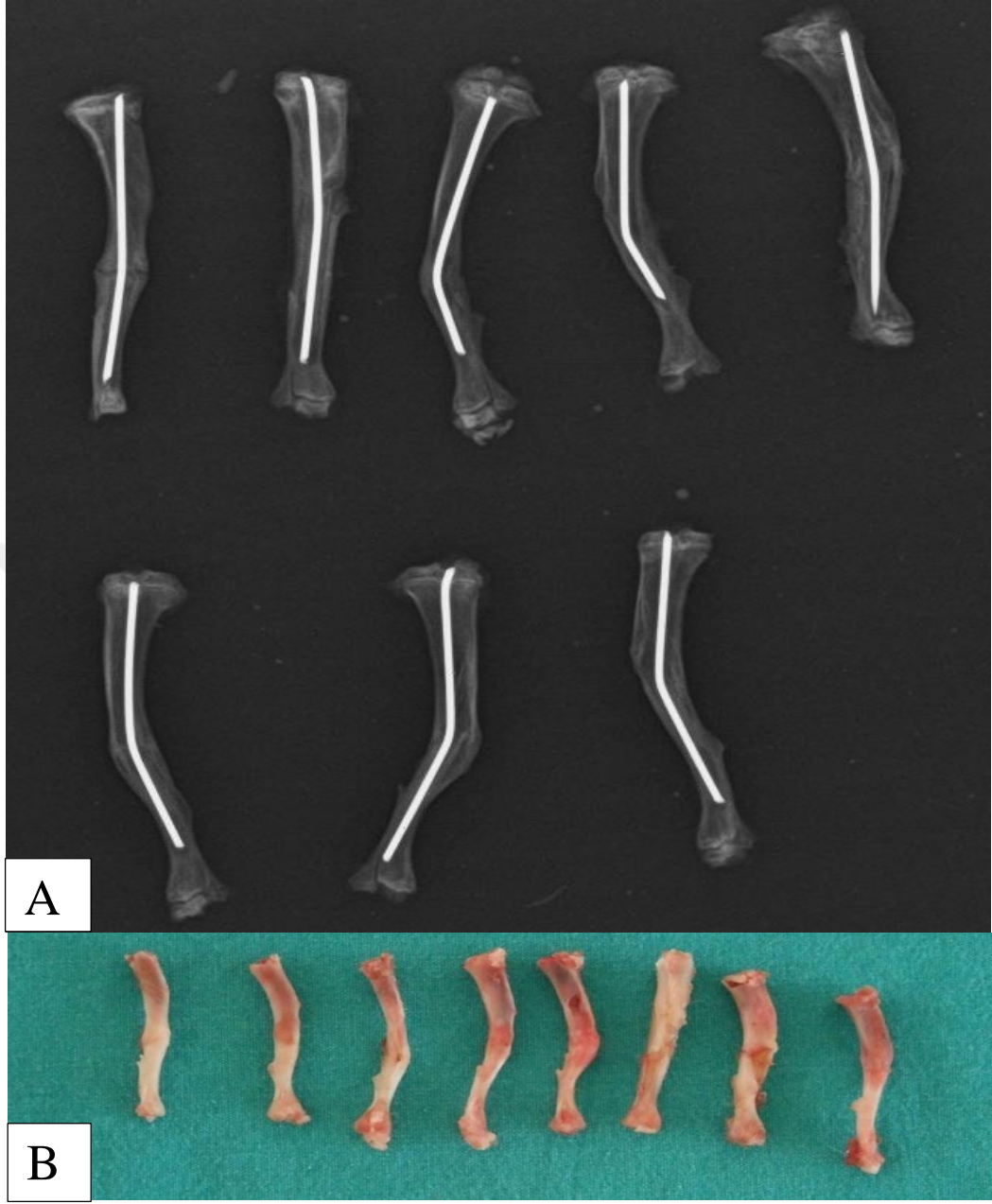
Radyolojik olarak en düşük ortalama 8.5 ile kırık iskemi grubunda, en yüksek değer 9.67 ortalama ile kırık-edaravone grubunda görülmesine rağmen ortalama radyolojik puanların istatistiksel değerlendirmesinde gruplar arasında ve gözlemciler arasında anlamlı farklılık bulunamadı.



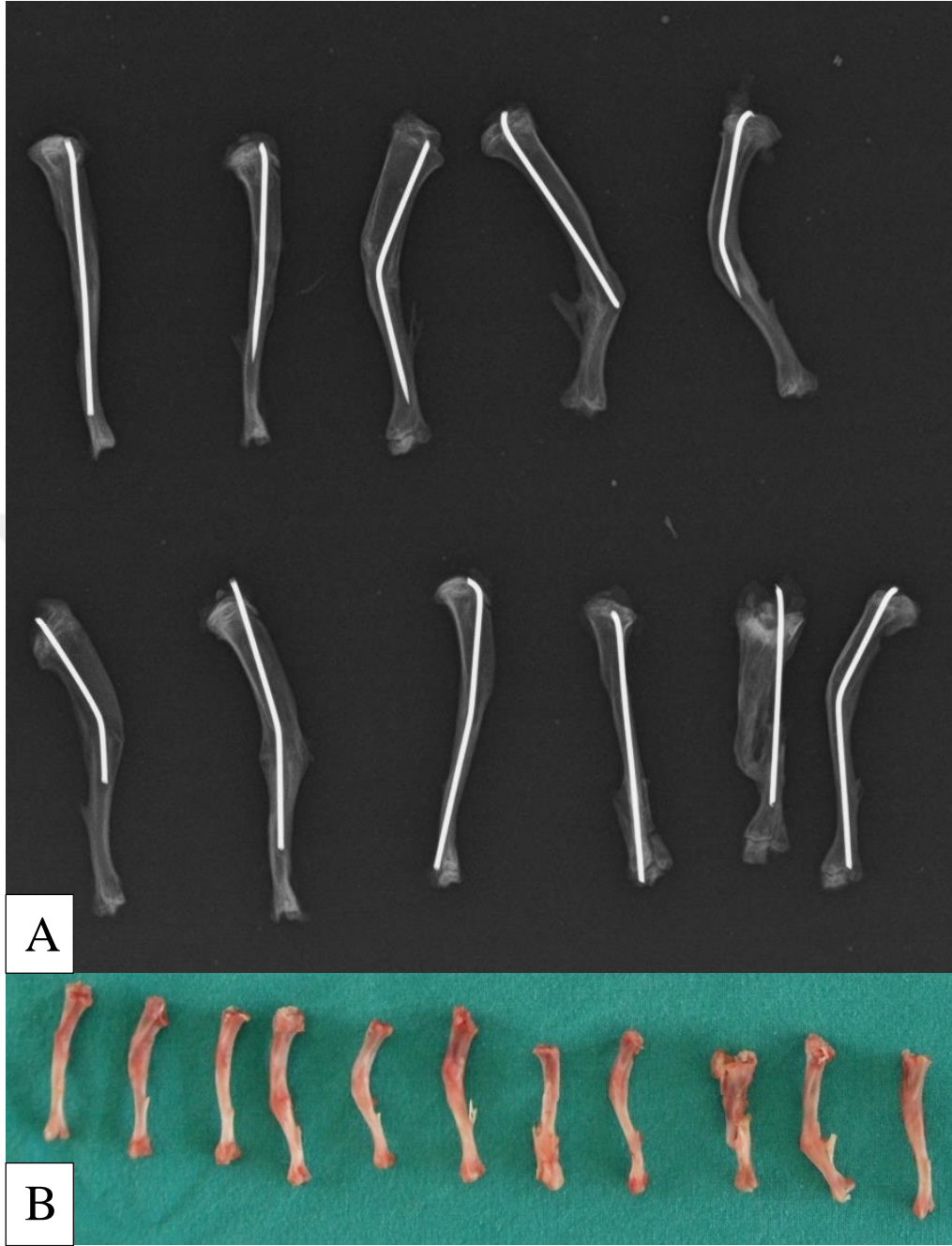
Resim 19: Kontrol grubunun 8. hafta sonunda radyografik (A) ve morfolojik görünümü (B)



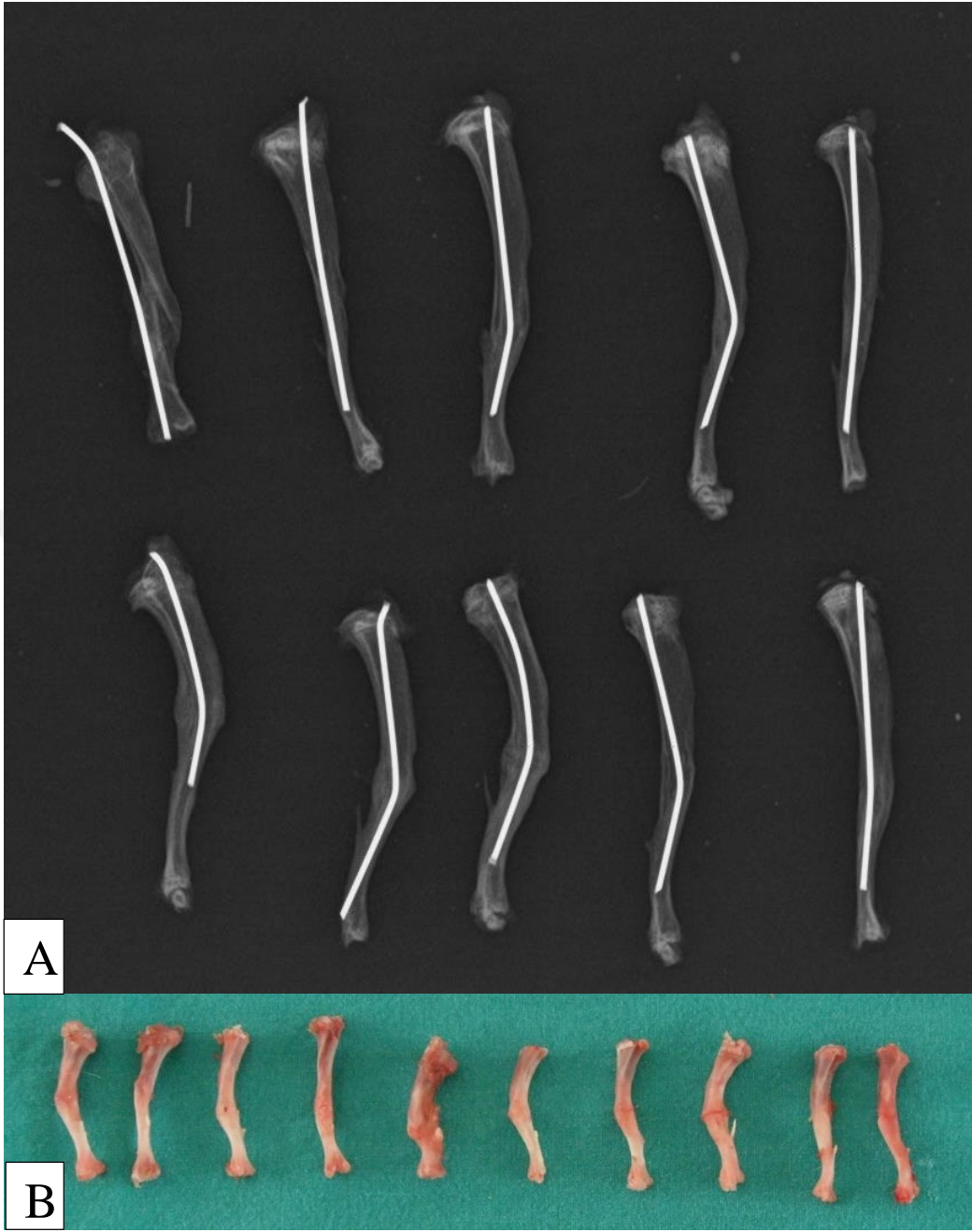
Resim 20: Sadece kırık grubunun 8.hafta sonunda radyografik (A) ve morfolojik görünümü (B)



Resim 21: Kırık-iskemi grubunun 8. hafta sonunda radyografik (A) ve morfolojik görünümü (B)



Resim 22: Kırık-edaravone grubunun 8. hafta sonunda radyografik (A) ve morfolojik görünümü (B)



Resim 23: Kırık-iskemi-edaravone grubunun 8. hafta sonunda radyografik (A) ve morfolojik görünümü (B)

4.2 Histopatolojik Bulgular

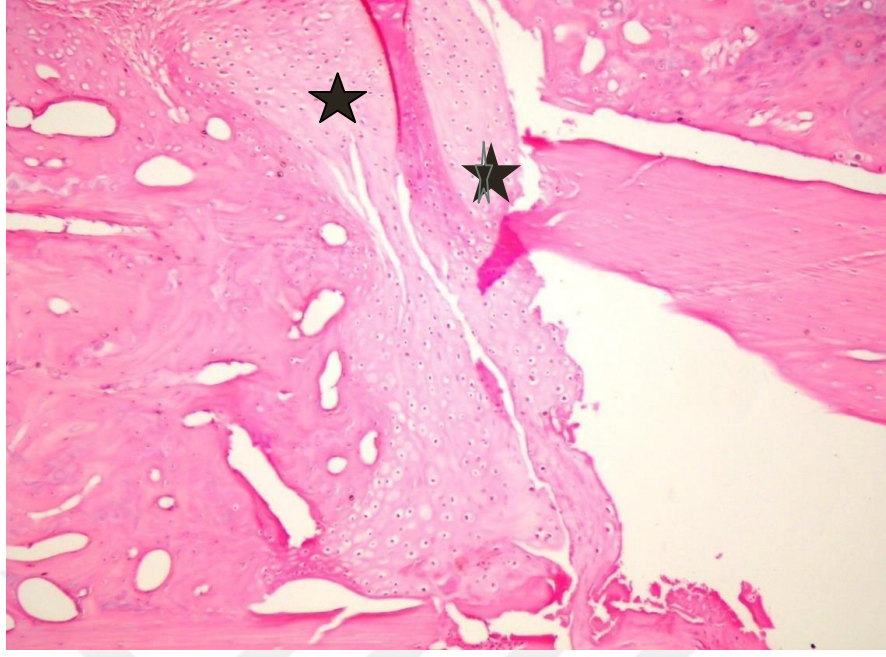
Sekizinci hafta sonunda sakrifiye edilen ratların tibia kırık iyileşme bölgelerinden inceleme için alınan örnekler Huddlestone ve ark. histolojik değerlendirme sistemine göre incelendi.

	Grade II	Grade III	Grade IV	Grade V	Grade VI	Grade VII	Grade VIII	Grade IX	Grade X	Ortalama Değer
Kırık-İskemi	1(%10)	1(%10)		3(%30)	2(%20)	3(%30)				5,3
Kırık-Edaravone						4(%36)	2(%18)	4(%36)	1(%9)	8,18
Kırık				2(%18)		6(%54)	2(%18)	1(%9)		7,0
Kırık-İskemi Edaravone			1(%10)		4(%40)	3(%30)	2(%20)			6,5

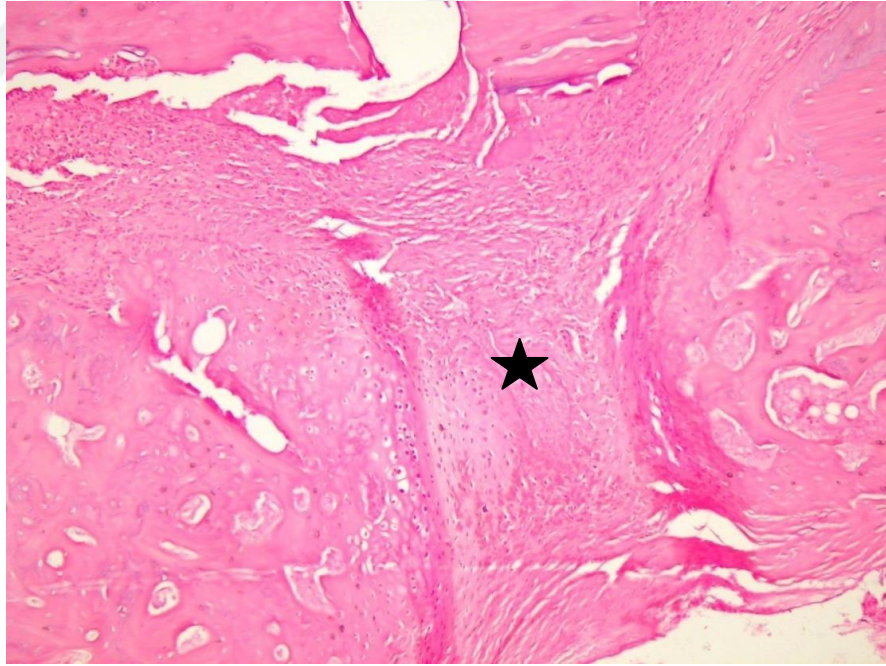
Tablo 4: Gruplara göre histopatolojik değerlendirme

Gruplar arasında en düşük skorlama grade II ile kırık-iskemi grubunda, en yüksek değer grade X ile kırık-edaravone grubunda bulundu.

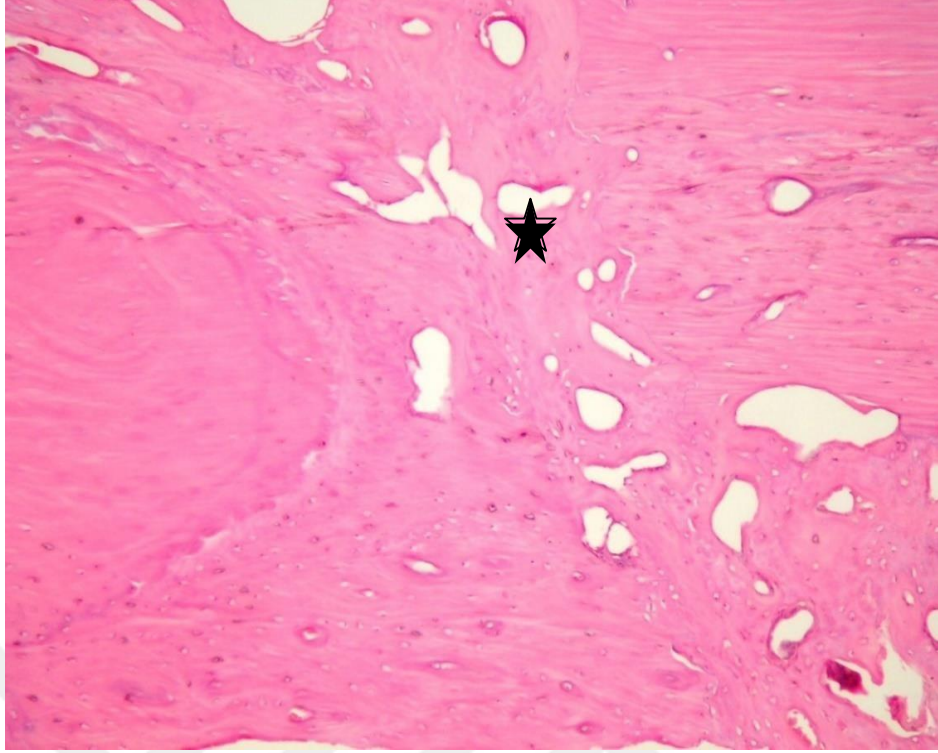
Kırık grubunun ortalama grade 7,0(minimum 5,0-maksimum 9,0) , kırık-edaravone grubunun ortalama grade 8,18(minimum 7,0-maksimum 10,0), kırık-iskemi-edaravone grubunun ortalama grade 6.5 (minimum 4,0-maksimum 8,0) , kırık-iskemi grubunun ortalama grade 5.3(minimum 2,0-maksimum 7,0) olarak bulundu. Histolojik gradelerde ikişerli karşılaştırmalar sonucunda kırık-edaravone grubunun hem kırık grubundan hem de kırık-iskemi-edaravone grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü.



Resim 24: Kırık-iskemi-edaravone grubunun histopatolojik görünümü. Tümüyle kartilaj dokusu ile iyileşmenin izlendiği Grade-IV ile uyumlu kırık iyileşmesi (HE, X20).

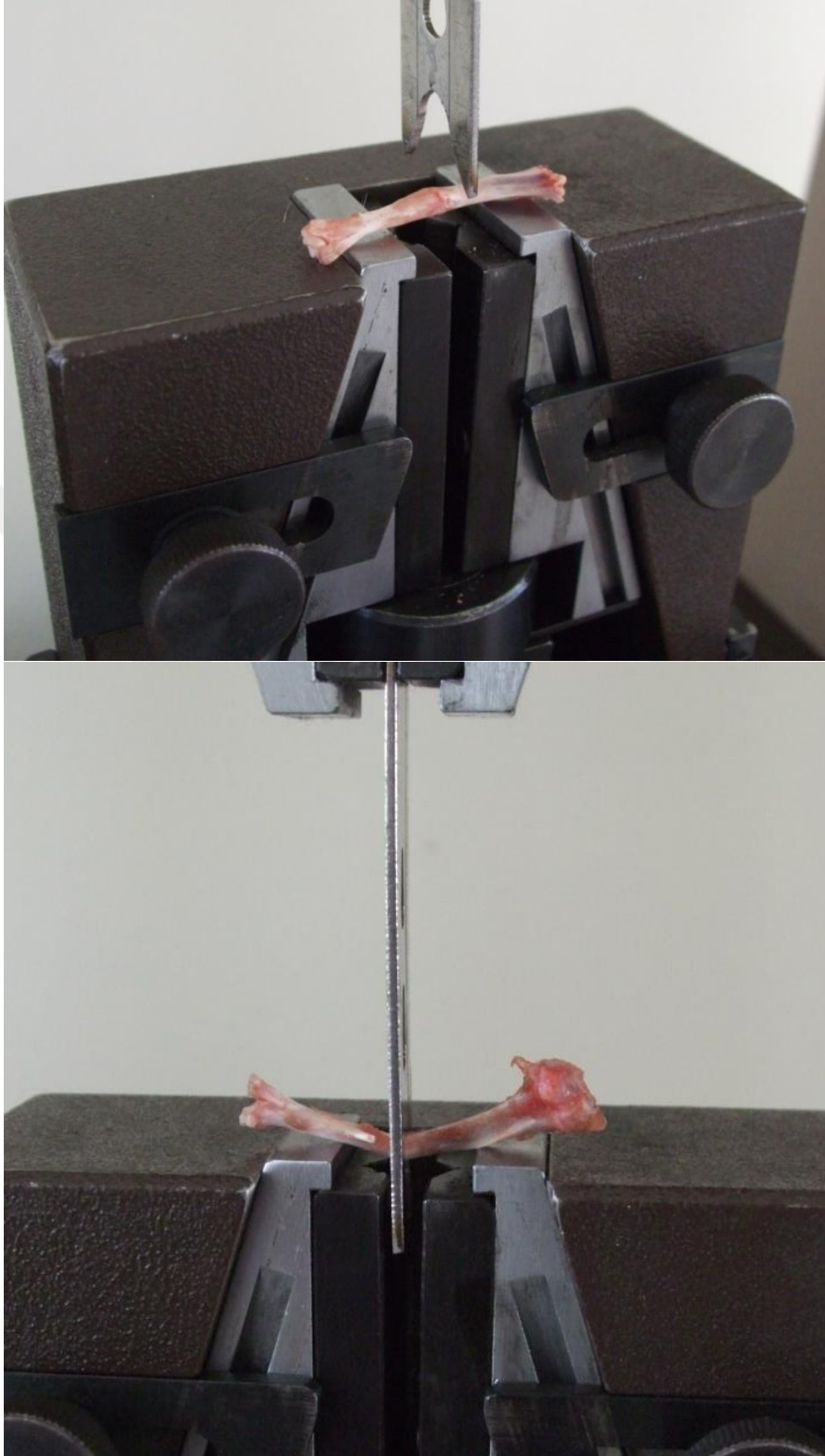


Resim 25: Kırık-iskemi grubunun histopatolojik görünümü. Fibröz ve kartilaj doku ile iyileşmenin izlendiği Grade-III ile uyumlu kırık iyileşmesi (HE, X20).



Resim 26: Kırık-edaravone grubunun histopatolojik görünümü. Tümüyle lameller kemik doku ile iyileşmenin izlendiği Grade-X ile uyumlu kemik iyileşmesi (HE, X20)

4.3 Biyomekanik Bulgular



Resim 27: Biyomekanik test

Kontrol grubu	Kırılma kuvveti (N)	Sertlik (N/mm)
1	111	2,3
2	101	1,75
3	80	1,9
4	87	1,8
5	87	1,85
6	130	1,45
7	107	1,45
8	108	1,25
9	90	1,7
10	74	2
11	115	1,1
Ortalama değer	99.09 N	1.69 N/mm

Tablo 5: Kontrol grubu kırılma kuvveti ve sertlik değerleri

Kırık- İskemi grubu	Kırılma kuvveti (N)	Sertlik (N/mm)
1	100	1,05
2	82	0,85
3	32	0,3
4	51	1,4
5	52	1,15
6	123	1
7	111	1,6
8	124	1,15
Ortalama değer	84.38 N	1.06 N/mm

Tablo 6: Kırık-iskemi grubu kırılma kuvveti ve sertlik değerleri

Kırık grubu	Kırılma kuvveti (N)	Sertlik (N/mm)
1	165	1,3
2	101	0,85
3	109	1,35
4	98	1,1
5	146	1,6
6	123	0,9
7	65	0,55
8	115	1,2
9	74	1
10	108	1,3
Ortalama değer	110.3 N	1.12 N/mm

Tablo 7 : Kırık grubu kırılma kuvveti ve sertlik değerleri

Kırık-Edaravone grubu	Kırılma kuvveti (N)	Sertlik (N/mm)
1	116	1,5
2	129	1,5
3	123	1,65
4	96	1,2
5	145	1,2
6	76	1,7
7	96	1
8	103	1,25
9	133	1
Ortalama değer	113 N	1.33 N/mm

Tablo 8 : Kırık-Edaravone grubu kırılma kuvveti ve sertlik değerleri

Kırık-iskemi-Edaravone grubu	Kırılma kuvveti (N)	Sertlik (N/mm)
1	54	1,15
2	111	1,7
3	86	1,3
4	141	0,9
5	59	1,15
6	121	1,05
7	70	1,1
8	52	1,15
9	120	1
10	79	1,15
Ortalama değer	89.3 N	1.17 N/mm

Tablo 9: Kırık-İskemi-Edaravone grubu kırılma kuvveti ve sertlik değerleri

	Kontrol Grubu	Kırık İskemi Grubu	Kırık Grubu	Kırık-Edaravone Grubu	Kırık-İskemi-Edaravone Grubu	F	p
Kırılma Kuvveti (N)	99,09±16,93	84,38±35,71	110,3±29,8	113±21,9	89,3±31,86	1,864	0,134
Sertlik (N/mm)	1,69±0,35	1,06±0,39	1,12±0,3	1,33±0,26	1,17±0,22	6,959	<0,001

Tablo 10: Değişkenlerin Gruplara Göre Dağılımı

			Fark	p
Kırılma kuvveti (N)	Kontrol Grubu	Kırık İskemi Grubu	14,71591	0,780
		Kırık Grubu	-11,20909	0,884
		Kırık-Edaravone Grubu	-13,90909	0,795
		Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	9,79091	0,926
	Kırık-İskemi Grubu	Kontrol Grubu	-14,71591	0,780
		Kırık Grubu	-25,92500	0,293
		Kırık-Edaravone Grubu	-28,62500	0,225
		Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	-4,92500	0,996
	Kırık Grubu	Kontrol Grubu	11,20909	0,884
		Kırık İskemi Grubu	25,92500	0,293
		Kırık-Edaravone Grubu	-2,70000	1,000
		Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	21,00000	0,444
	Kırık-Edaravone Grubu	Kontrol Grubu	13,90909	0,795
		Kırık İskemi Grubu	28,62500	0,225
		Kırık Grubu	2,70000	1,000
		Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	23,70000	0,349
	Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	Kontrol Grubu	-9,79091	0,926
		Kırık İskemi Grubu	4,92500	0,996
		Kırık Grubu	-21,00000	0,444
		Kırık-Edaravone Grubu	-23,70000	0,349

Tablo 11:Kırılma kuvvetinin gruplar arasındaki analizi

Maksimum kırılma kuvvetleri karşılaştırıldığında, en düşük değer, iskemi-kırık grubunda gözlemlenirken, en yüksek değer kırık-edaravone grubunda gözlemlenmiştir. Kırılma kuvveti düşükten yükseğe doğru; iskemi-kırık<kırık-iskemi-edaravone<kontrol<kırık<kırık-edaravone olarak tespit edilmiş olup, aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

			Fark	P
Sertlik (N/mm)	Kontrol Grubu	Kırık İskemi Grubu	0,62386	0,001
		Kırık Grubu	0,57136	0,001
		Kırık-Edaravone Grubu	0,35303	0,096
		Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	0,52136	0,003
	Kırık-İskemi Grubu	Kontrol Grubu	-0,62386	0,001
		Kırık Grubu	-0,05250	0,996
		Kırık-Edaravone Grubu	-0,27083	0,378
		Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	-0,10250	0,954
	Kırık Grubu	Kontrol Grubu	-0,57136	0,001
		Kırık İskemi Grubu	0,05250	0,996
		Kırık-Edaravone Grubu	-0,21833	0,538
		Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	-0,05000	0,996
	Kırık-Edaravone Grubu	Kontrol Grubu	-0,35303	0,096
		Kırık İskemi Grubu	0,27083	0,378
		Kırık Grubu	0,21833	0,538
		Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	0,16833	0,755
	Kırık-iskemi-Edaravone Grubu	Kontrol Grubu	-0,52136	0,003
		Kırık İskemi Grubu	0,10250	0,954
		Kırık Grubu	0,05000	0,996
		Kırık-Edaravone Grubu	-0,16833	0,755

Tablo 12:Sertlik derecesinin gruplar arasındaki analizi

Sertlik değerleri düşükten yükseğe doğru; iskemi-kırık<kırık<kırık-iskemi-edaravone<kırık-edaravone <kontrol olarak tespit edildi.

Sadece kontrol grubunda en yüksek olmakla birlikte kırık, kırık-iskemi-edaravone, kırık-edaravone gruplarının sertlik dereceleri, iskemi-kırık grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. ($p<0.001$).

5-TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Vasküler yaralanmalar ve kompartman sendromu ile beraber olan yüksek enerjili kırıklarda ekstremitte iskemiye maruz kalmakta ve iskemi süresi bittikten sonra reperfüzyon meydana gelmektedir. Reperfüzyon sonrasında oluşan serbest oksijen radikalleri kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir (136).

İskemi sonrasında reperfüzyonla ve serbest oksijen molekülünün etkisini araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır.

Serin ve ark. yaptığı çalışmada ameliyat esnasında kanamayı durdurmak amacıyla yapılan turnike uygulamalarında, uygulama esnasında ve sonraki dönemde dokularda iskemi-reperfüzyon ve serbest oksijen radikallerinin arttığı bulunmuştur (137).

Yine yapılan diğer çalışmalarda kırık meydana geldiğinde kırık lokalizasyonunda arteriyel vazokonstriksiyon meydana geldiği, bu süreç sonunda geçici iskemik periyot, arteriyel vazodilatasyon ve kırık bölgesinde reperfüzyonda bir artış meydana geldiği bulunmuştur (138-141).

İskemi doku hasarı oluşturduğu gibi reperfüzyonun kendisi de “reperfüzyon hasarlanması” olarak adlandırılan patofizyolojik bir duruma yol açmaktadır (142).

Reperfüzyon ile iskemik dokularda nötrofillerin toplanması ve endotel hücrelerinde ksantin oksidaz aktivitesinin yükselmesi meydana gelir ve böylece serbest oksijen radikallerinin üretimi hızlanır. Serbest oksijen radikallerinin aşırı yükselmesi kırık metabolizmasını olumsuz yönde etkiler. Oluşan serbest radikaller hücreleri oksidatif strese maruz bırakır ve bu olumsuz durumun doku hasarına neden olduğu bilinmektedir (143-144).

Genellikle iskemi sonrasında reperfüzyon sırasında doku hasarı oluşur(145).

Kırık kaynamasının enflamasyon aşamasında serbest oksijen radikallerinin arttığı birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir. Çetinus ve ark. yaptığı iskemi ve reperfüzyon modeli tibia kırıklarında serbest oksijen radikallerinin miktarının kırık kaynamasının enflamasyon döneminde oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (146).

Garrett ve ark. 1990 yılında; Koveshnikov ve Pikaliuk, 1993 yılında; Turek ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin meydana gelişi, etki mekanizmaları ve kırık kaynaması üzerinde olumsuz etkileri bulunmuştur (55-57).

Yapılan birçok çalışmada ise oksidatif stress artışının kemik dansitesini azalttığı bulunmuştur.

Göktürk ve ark. 1997 yılında polimorfonükleer lökositlerdeki NADPH oksidaz enzimini etkileyerek serbest oksijen radikali üretimini arttıran, zymosan isimli bir ilaç kullandıkları deneysel çalışmada, artan radikal üretiminin kırık iyileşmesini bozduğunu göstermişler; serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesinde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (59).

Yine Norazlina ve ark. yaptığı bir çalışmada ise serbest oksijen radikallerin osteoblastlar üzerinde sitotoksik etki meydana getirdiği bulunmuştur (147).

Osteoklast hücreleri üzerine Collin-Osdoby ve ark. yaptığı çalışmada kemik rezorpsiyonu süresince, serbest oksijen radikallerinden olan superoksit anyonu üretilir ve süperoksit anyonun, kemik yıkımında etkili olduğu gösterilmiştir (148).

Lipid peroksidasyonunun osteoklastlar üzerine etkisini araştıran birçok çalışmada kemik rezorpsiyonunu artırdığı sonucu çıkmıştır (149-150).

Literatürdeki çeşitli çalışmaların sonucunda; iskemi-reperfüzyon sonrasında serbest oksijen radikallerinin arttığı, bunun sonucunda kırık iyileşmesine olumsuz etki ettiğini görmekteyiz. Bizim çalışmamızda da iskeminin eşlik ettiği iskemi-kırık grubunda kırılma kuvveti, sertlik derecesi, histopatolojik iyileşme ve radyolojik iyileşme diğer tüm gruplara göre düşük bulunmuştur. Bu bulgularımız literatürle uyumludur.

Literatür incelendiğinde kırık iyileşmesine yardımcı olmak için yazarlar değişik antioksidan moleküller kullanarak birçok çalışma yapmışlardır.

Bu çalışmalardan Sarısözen ve ark. ile Durak ve ark."nın yaptığı bir çalışmada antioksidanların kırık hematoma bulunan serbest oksijen radikallerinin etkisini minimize ettiğini ve kırık kaynamasına olumlu etkisini vurgulanmıştır (58,136).

Durak ve ark. önemli bir antioksidan olan alfa-tokoferolün tavşanlarda kırık hematomunda oluşan serbest oksijen radikallerinin etkisini azalttığı bulunmuştur (151).

Alfa-tokoferol ile yapılan başka bir deneysel çalışmada ise Durmuş ve ark. kırık oluşumundan sonraki alfatokoferol tedavisinin ilk 15 günlük erken dönemde kemik kaynamasına olumlu etkisini serbest oksijen radikalleri üzerine antioksidan etkiliği ile ilişkilendirilmiştir (152).

Bir başka önemli antioksidan olan vitamin E ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda ise trabeküler kemik gelişimini stimüle ettiğini, vitamin E'nin osteoprotektif etki gösterdiği bulunmuştur.

E vitamini ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda ise antioksidan özelliğinden dolayı kemik rezorpsiyonu ve kaybını azalttığı bulunmuştur (153-155).

Yetersiz vitamin E ile beslenen farelerde Sergeev ve ark. kalsiyum absorpsiyonunun ve kemik kalsiyum depolarının azaldığını bulunmuşlardır (156).

Serbest radikal toplayıcısı olan vitamin C üzerine Morton ve ark. yaptığı başka bir çalışmada ise kemik mineral dansitesinde yararlı etkiler gösterdiği vurgulanmıştır. (157)

Antioksidan sistemin düşük aktivitesiyle ilgili Avitable ve ark. yaptığı çalışmada kemik demineralizasyonun ve serbest oksijen radikalleri miktarı arttığı görülmüştür (158).

Erdem M. ve ark. yaptığı çalışmaya göre ise kompartman sendromu veya vasküler yaralanma ile komplike hale gelmiş tibia kırıklarında, iskeminin kırık iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkilerinin CAPE ve melatonin tarafından engellendiği görülmüştür. CAPE'in bu olumlu etkisini serbest oksijen radikallerini etkisizleştirme, RANKL'e bağlı NFKb'i inhibe ederek ve osteoklastların aktivasyonunu engelleme mekanizması ile gerçekleştirdiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada melatoninin iskemide oluşan serbest oksijen radikallerinin inhibisyonunda önemli bir katkısı olduğu düşünülmüştür (97).

Literatürdeki çeşitli çalışmaların sonucunda; iskemi-reperfüzyon sonrasında oluşan serbest oksijen radikallerinin kemik ve kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerinin antioksidan moleküller yardımı ile önlendiğini görmekteyiz.

Biz de kırık iskemi-reperfüzyon modeli uyguladığımız çalışmamızda 2001 yılında Japonya'da iskemik stroke tedavisinde ilk defa kullanıma girmiş olan serbest oksijen radikali temizleme etkisi gösteren Edaravone antioksidan molekülünü kullandık.(100,101,159).

Çalışmamızda iskemi-kırık-edaravone modelinde serbest oksijen radikalleri temizleyicisi olan Edaravone'nun etkisi ile kemik sertlik derecesinde ve histopatolojik olarak anlamlı olmakta birlikte, kırılma kuvveti ve radyolojik puanlamanın daha yüksek olduğu görüldü. Bu bulgularımızın literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü.

Çalışmada kullandığımız Edaravone serbest oksijen radikali temizleme etkisini hidroksil bağımlı veya bağımlı olmayan lipit peroksidasyonunu inhibe ederek gerçekleştirir (159). Edaravone'un daha önce yapılan çalışmalarda kas ve iskelet sistemi üzerine birçok etkisi gösterilmiştir. Bu etkileri şöyle sıralanabilir:

Huang ve ark. tarafından osteoartrit üzerine koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur (105).

İrie ve ark. tarafından ekstremitelerde iskemi-reperfüzyon hasarı önlenmesinde etkili olduğu bulunmuştur (106).

Kazuichiro ve ark. yaptığı çalışmada edaravonun iskemik reperfüzyon hasarına karşı doğrudan iskelet kaslarında lipidi peroksidasyonu önleyerek koruyucu etki sağladığını, ikincil ödem ve dokunun inflamatuvar infiltrasyon insidansını azalatabileceği sonucuna ulaşılmıştır (133).

Ratlarda alt ekstremitede yapılan immunohistokimyasal çalışmaya göre preoperatif 9 mg/kg Edaravone tedavisinin postoperatif reperfüzyon hasarını önlediği bulunmuştur (108).

Yamamura ve ark. yaptığı çalışmada Edaravone'un alt ekstremitte kaslarında glikojen granülleri odaklanarak reperfüzyon hasarını önlemedeki

etkinliği transmisyon elektron mikroskobu kullanarak bulunmuştur (109).

Naritomi ve ark. tarafından akut inme sonrasında kas atrofi ilerlemesini önlemede Edaravone tedavisinin etkili olduğu bulunmuştur (111).

Guang Yi Lii ve ark. tarafından osteonekroz üzerine olumlu etkileri bulunmuştur (133).

Literatürde kas ve iskelet sistemi üzerine yapılmış çalışmalar olmasına rağmen intraperioneal olarak verilen Edaravone'un iskemi-reperfüzyon-kırık modelinde kırık iyileşmesine etkileriyle ilgili bir çalışma bulunamamıştır.

Çalışmamıza Edaravone'un lipid peroksidasyonu önleyerek gerçekleştirdiği serbest oksijen radikallerini temizleme etkisinin kırık iyileşmesine olumlu yönde etkilediği varsayılarak başlamıştık.

Çalışmamızda tibiada standart kırık oluşturmak amacı ile giyotin cihazı ile kullanılmıştır. Bu yüzden oluşan kırık modeli ve periost defekti bütün hayvanlarda aynı şekilde oluşturuldu. Ratlara yapılan 0,3mg/kg/gün dozunda intraperioneal enjeksiyonlar her gün aynı saatte ve aynı kişi tarafından yapılmıştır. Bu şekilde yapılan uygulanmanın da hayvanlar üzerindeki stres faktörünü standartize ettiği görüşündeyiz.

Çalışmamızda radyolojik bulgularının değerlendirilmesi Lane ve Sandhu'nun (134) yaygın olarak kullanılan skorumlama sistemi göre yapıldı. Bulgular daha objektif hale getirmek için çalışma dışında iki ortopedi ve travmatoloji uzmanı tarafından değerlendirilmiştir.

8. haftada yapılan radyolojik değerlendirmede gözlemciler arasında radyografik skorlar arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Edaravone verilen iskemi-kırık-edaravone grubunda radyolojik puan yüksek bulunmuştur.

Kırık iyileşmesinin histopatolojik değerlendirilmesinde daha iyi ve kesin sonuç verebileceğini düşündüğümüz Huddlestone ve ark. tarafından kullanılan skorumlama sistemini kullandık. (135)

8. hafta sonunda yapılan histopatolojik değerlendirmede ortalama en düşük olarak iskemi-kırık grubunda, en yüksek olarak kırık-edaravone grubunda bulundu. Histolojik gradelerde ikişerli karşılaştırmalar sonucunda istatistiksel analizde kırık-edaravone grubunun hem kırık hem de kırık-iskemi

edaravone grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü.

Çalışmamızda, 8. hafta sonunda biyomekanik değerlendirme 5 grupta “üç noktadan bükme” makinesi ile yapıldı.

Kırılma kuvveti düşükten yükseğe doğru; iskemi-kırık<kırık-iskemi-edaravone<kontrol<kırık<kırık-edaravone olarak tespit edilmiş olup, aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Kontrol grubunda en yüksek olmakla birlikte kırık, kırık-iskemi-edaravone, kırık-edaravone gruplarının sertlik dereceleri, iskemi-kırık grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. ($p<0.001$)

Çalışmamızın eksik yönleri olarak iskeminin meydana getirdiği doku nekrozunun büyüklüğünün ölçülmemiş olması, denek hayvanlarının 6. ve 12. haftada değilde tek seferde kırık iyileşmesine bakılmaksızın 8. haftada sakrifiye edilmesi, iskemi-reperfüzyon hasarında ilacın kırık iyileşmesi üzerine etkisinin başka bir ilaçla karşılaştırılmamış olması sayılabilir.

Sonuç olarak iskemi ve sonrasında reperfüzyon ile komplike kemik kırıklarında, iskeminin kırık iyileşmesini olumsuz etkilediğinin görüldüğü çalışmamızda, kırık iyileşmesinde reperfüzyon sonrasında Edaravone verilen grubun biyomekanik, histopatolojik ve radyolojik olarak daha iyi olduğu görüldü. Bu sonuçlar bize iskemi–reperfüzyon ile birliktelik gösteren kırıklarda Edaravone’un kırık iyileşmesine faydalı olduğunu göstermektedir.

Ortopedik pratikte, vasküler yaralanma veya kompartman sendromu ile komplike hale gelmiş kırıklarda, iskeminin kırık iyileşmesi üzerine olan muhtemel olumsuz etkilerinin Edaravone ile ortadan kaldırılabileceğini düşünmekteyiz.

6-KAYNAKLAR

1. Jungueria CL, Carnerio J, Kelley O: Bone. In: Basic Histology. Appleton and Lange, New Jersey, 1995, pp. 132-151.
2. Michael H.Ross, Wojciech Pawlina Histology atext and atlas (218-220).
3. Junqueira LC andCarneiro J: Temel Histoloji (Çev. Aytekin Y, Solakoğlu S). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006, s. 141-159.
4. Gartner LP, Hiatt JL: Color Textbook of Histology. W.B. Saunders Company,.
5. Kierszenbaum AL: Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Çev. Demir R). Palme Yayıncılık, Ankara, 2006, s. 118-145.
6. Buckwalter JA, GlimcherMJ, CooperRR, Recker R: Bone biology-I.In Pritchard DJ(ed).Instructional Course Lectures Volume 45,AAOS,1996 ve 371-86.
7. Schenk RK: Biology of fracture repair. In Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG(ed).Skeletal Trauma Vol 1.Third edition. SaundersCo, Philadelphia 2003 ve 29-73.
8. Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh JL: Bone and joint healing. In Bucholz RW, HeckmanJD (ed). Fractures in Adults Vol 1. Fifth edition. Lippincott Co, Philadelphia 2001 ve 245-71.
9. Mark D. Miller MD (Author), Stephen R. Thompson MD MEd FRCSC (Author), Jennifer Hart PA-C ATC (Author). Review of Orthopaedics, 6e (Miller, Review of Orthopaedics) 6th Edition
10. Gil FTH, Gracia MAA, Pingarron MC, Jerez LB: Physiologicalbases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 11: 47-51, 2006.
11. Tachdjian OM. Fractures and Dislocations. In: Pediatric Orthopedics. Saunders, Philadelphia, Vol 2: 1532-44, 1972.
12. Muscler FG. Bone Healing and Grafting. In: Orthopaedic Knowledge Update 8, Rosemont, 29-37, 2005.
13. McKibbin B: The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg, 60B:150- 162, 1978. 2.
14. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop Rel Res. 1998 ve S82-S89, 355 Suppl:.
15. Yetkin H, Yazıcı M, (ed).Miller'm Ortopedi Kitabı.Ankara:Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006: 5.
16. Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. Curr Opin Orthop, 2000 ve 11:403412.
17. Bioom and Fawcett.: A Textbook of Histology, 11 th. Ed. Sounders Comp., Philadelphia, 1986.

18. Erbenli T ve ark.: Histoloji 1. Beta Basın Yayın Dağıtım, İstanbul, 1987.
19. Erkoçak, A.: Genel Histoloji; Ankara Üniversitesi yayınları, Ankara, 1980.
20. Kurt, E. Johnson: Histology and Cell Biology. 2 nd. ed. Harwall Pub. Pennsylvania 1991.
21. Boonen Steven, Vanderschueren Dirk. Implications of bone microarchitecture. A Closer At Bone Osteoporosis Risk, Prevention and Therapy .2002 ve 11-20.
22. Ünlü A. Kalsiyum metabolizması .MEÜ Tıp ve 21(4):498-504.
23. Andreoli E. Thomas, Bennett J. Claude. Cecil Essential of Medicine .Ed: Tuzcu M. 3rd ed. 1995 ve 530-55.
24. Yürekli V., Akkuş S. Uzun Süreli Antiepileptik Tedavisine Bağlı Osteomalazi. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2005 ve 12(2):34-37.
25. Hatemi Hüsrev .Osteoporoz tanı ve ayırıcı tanı. Endokrinolojide Yönelimler ve 7(2):76-80.
26. Rowe N L, Williams J L. (1985) Maxillofacial Injuries. Edinburgh London Melbourne and New York: Churchill Livingstone. 50-52.
27. Alturfan A K, Akalın Y. (2002). Ortopedik Travmatoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. 10-14.
28. Kılıçoğlu SS. (2002) Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ve 143-150, 55(2):.
29. Brand RA. Fracture Healing. In Evarts CM, (ed). Surgery of Musculoskeletal System. New York: Churchill Livingstone, 1983: 65-71 Turck C W, Dohlman J G, Goetzl E J. Immunological mediators of wound healing and fibrosis. J Cell Physiol (Suppl 5), 89-93, 1987.
30. Hulth A, Johnell O, Klareskog L, Henricson A: Appearance of T-cell and Ia-expressing cells in fracture healing in rats. Int J Immunother, 1: 103-6, 1985.
31. Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res, 355: 7-21, 1998.
32. Cornell CN and Lane JM: Newest factors in fracture healing. Clin Orthop Relat Res, 277:297-311, 1992.
33. Barnes GL1, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. Barnes GL1, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair.
34. Kon T1, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing.
35. Brand AR and Rubin TC. Fracture Healing. In: Surgery of the Musculoskeletal System. Churchill Livingstone, New York 1: 93-114, 1990.
36. Hulth A, Johnell O, Klareskog L, Henricson A: Appearance of T-cell and Ia-expressing cells in fracture healing in rats. Int J Immunother, 1: 103-6, 1985.

37. Orhan İ, Hayıt H, D00uksal İ, Özeran İH, Fırdolaş F, Semerciöz A: Tek taraflı testis torsiyonunda PAF antagonistinin karşı taraf testisin iskemik hasarındaki koruyucu etkinliği. *Türk Üroloji Dergisi*, 30:11-16, 200.
38. Yılmaz C, Erdemli E, Selek H, Kınık H, Arıkan M: The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. *Arch Trauma Surg* 121: 426–428, 2001.
39. Khan SN: Bone growth factors. *Orthop Clin North Am*, 31: 375–388, 2000.
40. Schenk RK: Biology of fracture. In: Browner B, Jupiter J, Levine A, Trafton P (eds).
41. Sierpina VS, Wollschlaeger B, Blumenthal M: Ginkgobiloba. *Am Fam Physician*, 68: 42..
- Brond AR, Rubin TC: Fracture Healing. In: *Surgery of the Musculoskeletal*.
43. Us AK: Kırıklar hakkında genel bilgiler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi Ve Travmatoloji Bölümü Ders Notları, Ankara, 2005.
44. Castillo RC1, Bosse MJ, MacKenzie EJ, Patterson BM; LEAP Study Group. Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia.
- 45 Schmitz MA1, Finnegan M, Nataraja R, Champine J. .Effect of smoking on tibial shaft fracture healing.
46. Macey LR1, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes.
47. Kayal RA1, Alblowi J, McKenzie E, Krothapalli N, Silkman L, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Graves DT. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment.
48. Brinker MR, O' Connor Dp, Monla YT Metabolic and endocrine abnormalities in patients with nonunion.
49. Brown KM1, Saunders MM, Kirsch T, Donahue HJ, Reid JS. Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur.
50. Kurmis AP1, Kurmis TP, O'Brien JX, Dalén T. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drug administration on acute phase fracture-healing: a review.
51. Waters RV1, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, Bostrom M. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model.
52. Bogoch ER, Ouellette G, Hastings DE, Intertrochanteric fractures of the femur in rheumatoid arthritis.
53. McDonald MM1, Dulai S, Godfrey C, Amanat N, Szynda T, Little DG. Bolus or weekly zoledronic acid administration does not delay endochondral fracture repair but weekly dosing enhances delays in hard callus remodeling.
54. Goldhahn J1, Féron JM, Kanis J, Papapoulos S, Reginster JY, Rizzoli R, Dere W, Mitlak B, Tsouderos Y, Boonen S. Implications for fracture healing of current and new osteoporosis treatments: an ESCEO consensus paper.

55. Garrett I.R., Boyce B.F., Oreffo R.O.C., Bonewald L., Poser J. and Mundy G.R. 1990. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest.*, 85: 632-639.
56. Koveshnikov V.G. and Pikaliuk V.S. 1993. The proliferative processes in the skeleton of white rats administered dipal experimentally and after antioxidant therapy with tocopherol. *Morfologia*, 104: 34-39.
57. Turek J.J., Watkins B.A., Schoenlein I.A., Allen K.G.D., Hayek M.G. and Aldrich C.G. 2003. Oxidized lipid depresses canine growth, immune function, and bone formation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 14: 24-31.
58. Durak K, Bilgen OF, Kaleli T ve ark. Antioxidant effect of alpha-tocopherol on fracture haematoma in rabbits. *J Int Med Res.* 1996 ve 5:419-24.
59. Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, Günel I, Seber S, GülbasZ. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1995 ve 66:473-5.
60. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery.* 2004 ve 24:468-75.
61. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Temel patoloji (Basic Pathology)*, 6. edisyon, Temmuz 2000 (6-10, 30-36).
62. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, et al. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1989 ve 257:299-307.
63. Önal A, Astarcioglu H, Örmen M, Atilla K, Sarioglu S. Sıçandaki renal iskemireperfüzyon hasarında L-Karnitinin koruyucu etkisi. *Ulus Travma Derg* 2004 ve 10(3):160-167.
64. Pepine CJ. The therapeutic potential of carnitine in cardiovascular disorders 1991. *Clin Ther* ve 13(1):2-21.
65. Surg, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J*, May ve 81(5):637-47.
66. Nuh Zafer Cantürk, İskender Sayek. *Cerrahi araştırma kitabı. 2005 nobel tıp kitabevleri.*
67. Boldyrev A, Bulygina E, Leinsoo T, Petrushanko I, Tsubone Shiori, Abe H. Protective of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.* 2004 ve 137:81-88.
68. White MJ, Heckler FR. Oxygen free radicals and wound healing. *Clin Plast Surg.* 1990 ve 473-84., 17:.
69. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans. *Free Rad Res* 1996, 25:57-74.
70. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J Physiol* 1996 ve 46:15-32.
71. Ufuk E: Deferoksaminin iskemik deri fleplerinde serbest oksijen radikali hasarını önleyici etkisi, vazodilatasyonun rolü. *Uzmanlık tezi, İstanbul, 1992.*

72. Dolunay O, L-karnitin'in rat aortik iskemi-reperfüzyon modelinde akciğer ve endotel hasari üzerin etkisi Uzmanlık tezi, Ispart0a , 2006.
73. Karakaya A. Akut alt ekstremite iskemi reperfüzyon sonrasında gelişen böbrek hasarına iloprost ve levosimendanin etkilerinin araştırılması. Uzmanlık tezi Eskişehir 2009.
74. O'Brien BM, Morrison WA, Gumley GJ. Principles and Techniques of Mikrovascular Surgery. McCarty JG, May JW eds. Plastic Surgery, Vol 1 General Principles. New York: W.B Saunders Company 1990:412-73.
75. Kılınç K., Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002 ve 110-118, 33:.
76. Akkus. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. I.Baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1995.
77. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1999.
78. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. J Invest Surg 2009 ve 46-55., 22:.
79. Jarasch ED, Bruder G, Heid HW. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. Acta Physiol Scand Suppl 1986 ve 39-46., 548:.
80. Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: FREI B.Editor. Natural antioxidants in human health and disease. San Diego: Academic Press 1994 ve 25-62.
81. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen kosullar. Klinik Gelisim 1998 ve 11:336-41.
82. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. Acta Physiol Scand Suppl 1986:548:87-99.
83. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. Med Hypotheses 2007 ve 1363-1370., 68:.
84. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. J Neuroimmunol 1999 ve 101:148-160.
85. Montalto, MC., Hart, ML., Jordan, JE., Wada, K., Stahl, GL., Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression, Am J Physiol., 285, 197-206, 2003.
86. Kubes, P., McCafferty, DM., Nitric oxide and intestinal inflammation, Am J Med., 109, 150-158, 2000.

87. King, AJ., Pfeffer, JM., Pfeffer, MA., Brenner, BM., Systemic hemodynamic effects of endothelin in rats, *Am J Physiol.*, 258, 787-792, 1990.
88. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia reperfusion injury. *Br J Surg* 1996 ve 162-170., 83
89. Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991 ve 326-334., 53:.
90. McNeil JJ, Robman L, Tikellis G, Sinclair MI, McCarty CA, Taylor HR. Vitamin E supplementation and cataract: randomized controlled trial. *Ophthalmology* 2004 ve 75-84., 111:.
91. Baskin SI, Salem H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, 1997, pp 79-120.
92. Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 2000 ve 349-354., 87:.
93. Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: prooxidant effect in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ve 535-540., 277:.
94. Garewal HS. Antioxidants and disease prevention. Florida: CRC Press LLC, 1997, pp3-19.
95. Marklund S. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* ve 8., 79:7634.
96. Göksel Şener, Berrak Ç. Yeğen İskemi Reperfüzyon Hasarı. *J. Pineal Res.* 2002 Mar: 32(2):12.
97. Erdem M, Gulabi D, Ascı M, Bostan B, Gunes T, Koseoglu R. D.Melatonin ve kafeik asit esterlerinin kırık iyileşmesine olan etkisi *Acta Orthop Traumatol Turc* 2014.
98. Hoehn B, Yenari MA, Sapolsky RM and Steinberg GK: Glutathione peroxidase overexpression inhibits cytochrome C release and proapoptotic mediators to protect neurons from experimental stroke. *Stroke* 34: 2489-2494, 2003.
99. Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito KI and Kogure K: Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res* 762: 240-242, 1997.
100. Okatani Y, Wakatsuki A and Kaneda C: Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res* 28: 89-96, 2000.
101. Adams HP Jr, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA and Wijndicks EF: Guidelines for the early management of adults with ischemic.

102. Paul A. Lapchak, A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy? *Expert Opin Pharmacother.* Jul 2010 ve 1753–1763, 11(10):.
103. Yamamoto Y1, Kuwahara T1, Watanabe K2, Watanabe K2 Antioxidant activity of 3- methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one.
104. Higashi Y, Jitsuiki D, Chayama K, et al. Edaravone (3-Methyl-1-Phenyl-2-Pyrazolin-5- One), A Novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 2006 ve 1:85-93.
105. Huang C1, Liao G2, Han J2, Zhang G2, Zou B2. Edaravone suppresses degradation of type II collagen.
106. Irie H1, Kato T, Ikebe K, Tsuchida T, Oniki Y, Takagi K. Antioxidant effect of MCI-186, a new Free-Radical scavenger, on ischemia-reperfusion injury in a rat hindlimb amputation model.
107. Tsujii*, Takahiro Iino, Haruhiko Satonaka, Takeshi Uemura, Koji Akeda, Masahiro Hasegawa, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo Protective effect of edaravone for tourniquet- induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in murine hindlimb.
108. Yamamura M1, Miyamoto Y, Mitsuno M, Ohata T, Tanaka H, Kobayashi Y, Ryomoto M, Yoshioka Y Edaravone suppresses postoperative reperfusion injury in rat lower extremity: An immunohistological study.
109. Yamamura M1, Miyamoto Y, Mitsuno M, Tanaka H, Ryomoto M, Fukui S, Yoshioka Y.
110. Yamamura M1, Miyamoto Y1, Mitsuno M1, Tanaka H1, Ryomoto M1, Fukui S1 Edaravone Suppresses Reperfusion Injury following Leg Ischemia in Rats: A Transmission Electron Microscopic Study.
111. Naritomi H1, Moriwaki H, Metoki N, Nishimura H, Higashi Y, Yamamoto Y, Yuasa H, Oe H, Tanaka K, Saito K, Terayama Y, Oda T, Tanahashi N,.
112. Guang-Yi Li, Yong Feng, Tak S. Cheng, Ji-Min Yin, Chang-Qing Zhan .Edaravone, a novel free radical scavenger, prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits.
113. Iida H1, Nagasaka T, Shindo K, Shiozawa Z. Effect of the free radical scavenger edaravone on peripheral nerve ischemia–reperfusion injury.
114. Halliwell, B. Gutteridge J.M.C Free radical in biology and medicine.
115. Nakamoto N1, Tada S, Kameyama K, Kitamura K, Kurita S, Saito Y, Saito H, Ishii H. A free radical scavenger, edaravone, attenuates steatosis and cell death via reducing inflammatory cytokine production in rat acute liver injury.
116. Tsujita K, Shimomura H, Kawano H, Hokamaki J, Fukuda M, Yamashita T, et al. (2004) Effects of edaravone on reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 94:481–484.

117. Ninomiya M, Shimada M, Harada N, Shiotani S, Hiroshige S, et al. (2002) Beneficial effect of MCI-186 on hepatic warm ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 74:1470.
118. Wen Y, Yang S, Liu R, Perez E, Yi KD, Koulen P, et al. (2004) Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1008:147–154.
119. Minhaz U, Tanaka M, Tsukamoto H, Watanabe K, Koide S, Shohtsu A, et al. (1996) Effect of MCI-186 on postischemic reperfusion injury in isolated rat heart. *Free Radic Res* 24:361–367.
120. Wu TW, Zeng LH, Wu J, Fung KP (2002) Myocardial protection of MCI-186 in rabbit ischemia-reperfusion. *Life Sci* 71:2249–2255.
121. Suzuki K, Kazui T, Terada H, Umemura K, Ikeda Y, Bashar AH, Y et al. (2005b) Experimental study on the protective effects of edaravone against ischemic spinal cord injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:1586–1592.
122. Hayashi T, Mori T, Sohmiya K, Okada Y, Inamoto S, Okuda N, et al. (2003) Efficacy of edaravone, a free radical scavenger, on left ventricular function and structure in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 41:923–929.
123. Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, Maeda H (2003) Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability.
124. Tsujimoto I, Hikoso S, Yamaguchi O, Kashiwase K, Nakai A, Takeda T, et al. (2005) The antioxidant edaravone attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 45:921–926.
125. Doi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Noiri E (2004) Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia reperfusion injury in rat kidney. *Kidney Int* 65:1714–1723.
126. Tahara M, Nakayama M, Jin MB, Fujita M, Suzuki T, Taniguchi M, Shimamura T, et al. (2005) A radical scavenger, edaravone, protects canine kidneys from ischemia-reperfusion injury after 72 hours of cold preservation and autotransplantation. *Transplant*.
127. Tajima S1, Bando M, Ishii Y, Hosono T, Yamasawa H, Ohno S, Takada T, Suzuki E, Gejyo F, Sugiyama Y. Effects of edaravone, a free-radical scavenger, on bleomycin-induced lung injury in mice
128. Abe T, Unno M, Takeuchi H, Kakita T, Katayose Y, Rikiyama T, et al. (2004) A new free radical scavenger, edaravone, ameliorates oxidative liver damage due to ischemia- reperfusion in vitro and in vivo..
129. Masaki Y, Kumano K, He N, Suyama I, Endo T (1996) Protective effects of MCI-186 on cold kidney preservation/reperfusion injury in the rat. *Transplant Proc* 28:1885–1886.
130. Tamamura M1, Saito M, Kinoshita Y, Shimizu S, Satoh I, Shomori K, Dimitriadis F, SatohK. Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis.

- 131.Skjeldal S, Grøgaard B, Reikerås O, Müller C, Torvik A, Svindland A. Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb: evaluation of reperfusion and necrosis. *Eur Surg Res* 1991 ve 23:355-65.
- 132.An Y, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA. Production of a standard closed fracture in the rat tibia. *J Orthop Trauma* 1994 ve 8:111-.
- 133.Kazuichiro Hori, Protective effect of edaravone for tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in murine hindlimb.
- 134.Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987 ve 18:21325.
- 135.Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 2000 ve 82:161-73.
- 136.Sarisözen B, Durak K, Dinçer G, Bilgen OF. The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats. *J Int Med Res.* 2002 ve 309-13., 30:.
- 137.Serin E., Yılmaz E., Yılmaz S., Ünsaldı E. ve Durmuş A.S. 1998. İskemi-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri (ratlarda deneysel çalışma). *Artroplasti Artroskopik Cerrahi*, 9(1): 36-39.
- 138.Durak K., Bilgen Ö.F., Kaleli T., Tuncel P., Özbek R. and Turan K. 1996. Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbit. *J. Int. Med. Res.*, 24: 419-424.
- 139.Göktürk E. 1997. Sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine etkisi. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.*, 31: 353-356.
- 140.Pres.Gurley A.M. and Roth S.I. 1992. Bone. In: Sternberg S.S. (Ed.). *Histology for Pathologists*. New York: Raven.
- 141.Keskin D., Karsan O., Ezirmik N. ve Çiftçioğlu A. 1999. Tavşanlarda kırık iyileşmesi üzerine alfa-tokoferolün etkisi. *Artroplasti-Artroskopik Cerrahi*, 10(2): 207-210.
- 142.Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after.
- 143.Sheweita SA, Koshhal K. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Current Drug Metabolism* 2007 ve 519–525, 8:.
- 144.Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing, *Nature* 2000 ve 147-239., 408:.
- 145.Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/ reperfusion. *Ann Transplant* 2004 ve 9:81-3.
- 146.Cetinus E, Kiliç M, Uzel M, Inanç F, Kurutaş EB, BilgicE, et al. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* 2005 ve 125:376- 80.

147. Norazlina M., Ima-Nirwana S., Gapor M.T.A., and Khalid B.A.K. 2002. Tocotrienols are needed for normal bone calcification in growing.
148. Collin-Osdoby P, Li L, Rothe L, Anderson F, Kirsch D, Oursler MJ, Osdoby P. Inhibition of avian osteoclast bone.
149. Key L.L., Ries W.L., Taylor R.G., Hays B.D. and Pitzer B.L. 1990. Oxygen-derived free radicals in osteoclasts: the specificity and location of the nitroblue tetrazolium reaction. *Bone*, 11: 115-119.
150. Suda N. 1991. Role of free radicals in bone resorption. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 58: 603- 612.
151. Durak K., Bilgen Ö.F., Kaleli T., Tuncel P., Özbek R. and Turan K. 1996. Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbit. *J. Int. Med. Res.*, 24: 419-424.
152. Durmuş A.S., Akpolat N. ve Ünsaldı E. 2002. Köpeklerde deneysel radius kırıklarında dl- alfa-tokoferol asetat'ın kırık iyileşmesi üzerine olan etkisi. VIII. Ulusal Veteriner Cerrahi Kongresi. 136-137. 3-6 Temmuz 2002, Van.
153. Xu H., Watkins B.A. and Seifert M.F. 1995. Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage. *Calcif. Tissue Int.*, 57: 293-300.
154. Ima-Nirwana S., Kiftiah A., Sariza T., Abd. Gapor M.T. and Khalid B.A.K. 1999. Palm vitamin E improves bone metabolism and survival rate in thyrotoxic rats. *General Pharmacology*, 32: 621-626.
155. Yee J.K. and Ima-Nirwana S. 1998. Palm vitamin E protects against ferricnitrilotriacetate- induced impairment of bone calcification. *Asia Pacific J Pharmacol.*, 13: 1-7.
156. Sergeev I.N., Arkhapchev I.P. and Spirichev V.B. 1990. The role of vitamin E in metabolism and reception of vitamin D. *Biokhimiia*, 55: 1989-1995.
157. Morton D.J., Barret-Connor E.L. and Schneider D.L. 2001. Vitamin C supplement use and bone.
158. Avitabile M., Rasa R., Campagna N.E., Ferlito S., Rasa A., Priolo R., Aredia F. and Strano M. 1996. Calcium release from the mineral matrix of the mandibular bone due to hydrogen peroxide exposure. *Minerva Stomatol.*, 45: 401-403.
159. Watanabe T, Yuki S, Egawa M and Nishi H: Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1597-1604, 1994.