



**T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KETEN TOHUMU YAĞI'NIN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Sinan GÖRMEZ

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sabri BALIK

RİZE 2018

**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KETEN TOHUMU YAĞI'NIN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Sinan GÖRMEZ

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sabri BALIK

Uzmanlık Tezi

RİZE 2018

ÖNSÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimi sürecimde, iyi bir uzman hekim olmam için her türlü desteği veren, geniş bilgi birikimi ile cerrahi ve klinik tecrübelerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız, Klinik Şefimiz ve Tez Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sabri BALIK ve kliniğimiz öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Yılmaz GÜVERCİN'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca yanımda olan ve bugüne gelmem için emek veren aileme sonsuz teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sırasında hayatıma giren ve asistanlık süreci boyunca destek veren eşim Esen GÜL GÖRMEZ ve hayatımızın neşesi oğlum Mehmet İlker GÖRMEZ'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında kendilerinden ve ailelerinden fedakârlık yaparak katkıda bulunan ve çalışmanın ortaya çıkmasında büyük emekleri olan Tez Danışmanı Hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sabri BALIK, Dr. Öğr. Üyesi Atilla TOPÇU, Doç. Dr. Levent TÜMKAYA ve Dr. Öğr. Üyesi Tolga MERCANTEPE'ye bu katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sürecinde beraber çalıştığım başta Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği asistanları olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Başhekimimiz ve yıllarca beraber çalıştığımız servis hemşire ve sekreterlerimize, ameliyathane hemşire, personel ve anestezi ekibine teşekkür ederim.

Dr. Sinan GÖRMEZ

ÖZET

Keten tohumu yağı'nın kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin sıçanlarda deneysel olarak değerlendirilmesi

Dr.Sinan GÖRMEZ

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
Tıpta Uzmanlık Tezi**

Dr. Öğr. Gör. Mehmet Sabri BALIK

Amaç : Kırık iyileşme sürecine etki eden faktörleri belirlemeye yönelik çalışmalar halen araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Biz de çalışmamızda keten tohumu yağının kırık iyileşmesi sürecine etkilerini belirlemeyi amaçladık. **Materyal ve Metod:** Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Uygulama ve Araştırma Merkezinde Nisan ile Haziran 2018 tarihleri arasında çalışma gerçekleştirildi. Çalışmada 64 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. 4 ayrı grup oluşturuldu. Sağlıklı kontrol Grup 1, femoral kırık+kontrol Grup 2, femoral kırık+keten tohumu yağı Grup 3, sağlıklı + keten tohumu yağı Grup 4 olarak isimlendirildi. Deneysel kırık oluşturulan grup 2 ve 3 kendi aralarında üç alt gruba ayrıldı. 2., 4., ve 6. haftalarda sakrifiye edilerek değerlendirme aşamalarına geçildi. Değerlendirme aşamasında bu gruplar arasında biyokimyasal, histolojik ve radyolojik olarak farkın olup olmadığı mukayese edildi. **Bulgular :** Kırık iyileşmesinin erken ve geç dönemlerinde MDA ve GSH düzeyi çalışma ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. 2. hafta keten tohumu yağı verilen grupta tüm sıçanlarda radyolojik olarak kallus ve köprüleşme mevcut idi. 4. hafta keten tohumu yağı verilen grupta 6 sıçanda, radyolojik olarak tam kaynama görüldü. Histolojik değerlendirmede, kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait kesitlerde yaygın ödematoz alanlar, yoğun infiltrasyon ve nekrotik osteositler, yer yer osteoblastik aktivite gözlemlenmekle beraber kırık dokusu gözlenmedi. Kırık oluşturulan ve keten tohumu yağı verilen 2. hafta tedavi grubuna ait femur kesitlerinde, az seviyede osteokalsin aktivitesi gözlemledik. Osteokalsin pozitivite skoru: 3.00 ± 0.54 olarak saptandı. **Sonuç :** Biyokimyasal analizler, kırık iyileşmesinde keten tohumu yağı antioksidan etki göstermektedir. Ayrıca histolojik olarak kırık iyileşme sürecinin tüm aşamalarına, radyolojik olarak ise erken döneminde olumlu etki gösterdiği belirlendi.

2018, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler : Keten tohumu yağı, kırık iyileşmesi, kırık, sıçan

SUMMARY

Evaluation Of Flax-Seed Oil Effects On Fracture Healing In Rats Experimentally

Dr. Sinan GÖRMEZ

Recep Tayyip Erdoğan University Medicine Faculty Orthopaedics And
Traumatology Department Specialty Thesis

Dr. Öğr. Gör. Mehmet Sabri BALIK

Aim: Studies aimed at detection of factors that affect fracture healing process still be interested by researchers. We aimed to detect effects of flax-seed oil on fracture healing at our study. **Material and Method:** A study was performed at Recep Tayyip Erdogan Animal Experiments Practice and Research center ain between dates of april-june 2018. At study, 64 spraque-dawley rats were used. 4 seperated groups were created. Group 1 was named of healty control, group 2 was named of femoral fracture+control, group 3 was named of femoral fracture+flax-seed oil, group 4 was named of healty+flax-seed oil. Group 2 and 3 that were created fracture experimentally were separated into 3 subgroups. They were sacrificed and skipped to evaluation phases at 2., 4., and 6. weeks. In evaluation phase, in between these groups were compared that whether or difference biochemically, histologically and radiologically. **Findings:** In early and late of periods of fracture healing MDA and GSH levels were found out significant difference in between working and control statistically. At 2. week, in group that flax-seed oil was given in all rats callus and bridging were present. At 4. week, group that flax-seed oil was given in 6 rats complete union was seen radiologically. İnhistologic evaluation, at sections belong to 2. week control group that were created a fracture, extensive oedematous areas, intensive infiltration and necrotic osteocytes, osteoblastic activity from place to place were observed but not cartilage tissue. We observed low levels of osteocalcin activity in femur sections belong to 2. week treatment group that created a fracture and given flax-seed oil. Determined that osteocalcin positive score as of 3.00 ± 0.54 . **Conclusion:** Biochemical analyses showed that flax-seed oil has antioxidant effect on fracture healing. Also, flax-seed oil was determined that it showed positive effects on all phases of fracture healing process histologically and in early period of fracture healing process.

2018, 72 pages

Key words: flax-seed oil, fracture healing, fracture, rat

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
ÖZET	II
SUMMARY	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
TABLolar LİSTESİ	XV
1. Giriş ve amaç	1
2. Genel bilgiler	2
2.1. Kemik Yapısı ve Hücresel Bileşenleri	2
2.1.1. Kemiğin yapısı ve gelişimi	2
2.1.1.1. Kemik şekilleri	2
2.1.1.2. Kortikal ve kansellöz kemik	2
2.1.1.3. Mineralize ve mineralize olmayan kemik matriks	3
2.1.1.4. Örgümsü ve lamellar kemik	3
2.1.1.5. Kemik doku gelişimi	3
2.1.2. Kemik hücreleri	4
2.1.2.1. Farklılaşmamış/Osteoprogenitör hücreler	4
2.1.2.2. Osteoblastlar	4
2.1.2.3. Osteositler	4
2.1.2.4. Osteoklastlar	4
2.1.3. Matriks yapısı	5

2.1.3.1. Organik matriks	5
2.1.3.2. İnorganik matriks	5
2.1.4. Kemik hücre aktivite kontrolü	5
2.1.4.1. Sistemik faktörler	6
2.1.4.2. Lokal faktörler	6
2.1.5. Kemiğin damarlanması	6
2.1.6. Kemiğin sınırları	6
2.1.7. Periost	7
2.1.8. Kemikleşme	7
2.1.8.1. İntramembranöz kemikleşme	7
2.1.8.2. Enkondral kemikleşme	7
2.2. Kırık İyileşmesi	7
2.2.1. İnflamasyon	8
2.2.2. Tamir	10
2.2.3. Yeniden Şekillenme	12
2.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler	13
2.3.1. Yaş	13
2.3.2. Periostun durumu	13
2.3.3. Hormonlar	13
2.3.4. Prostaglandinler ve büyüme faktörleri	14
2.3.5. Vitaminler	15
2.3.6. Elementler	15
2.3.7. Travmanın şekli ve şiddeti	15
2.3.8. Tedaviye bağlı etkenler	15

2.3.9. Enfeksiyon	15
2.3.10. Sigara kullanımı	16
2.3.11. Alkol kullanımı	16
2.3.12. Kemiğe özgü hastalıklar	16
2.3.13. Diabetes mellitus	16
2.3.14. Beslenme durumu ve protein yetmezliği	16
2.3.15. Kafa travması	17
2.3.16. Ekstremiteye özgü durumlar	17
2.3.17. Lokal tedavi yöntemleri	17
2.3.18. Kırık cerrahisinde kullanılan maddeler	17
2.3.19. Doğal maddeler	17
2.3.20. NSAİ ilaçlar	18
2.3.21. Antihiperlipidemik ilaçlar	18
2.3.22. Diğer ilaçlar	19
2.4. Keten Tohumu Yağı	19
2.4.1. Genel özellikleri	19
2.4.2. Antimikrobik etki	19
2.4.3. Antikarsinojenik etki	20
2.4.4. Antioksidan etki	20
2.4.5. Antiaterosklerotik ve antihiperlipidemik etki	20
2.4.6. Endüstriyel kullanımı	20
2.4.7. Kemik yoğunluğu üzerine etkisi	20
2.4.8. Hematolojik etkileri	21
2.4.9. Diğer etkileri	21

3. Gereç ve Yöntem	22
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	22
3.2. Anestezi	23
3.3. Kırık Modeli Oluşturulması ve Tespit Şekli	23
3.4. Keten Tohumu Yağı Uygulanması	25
3.5. Deneyin Sonlandırılması	25
3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi	26
3.6.1. Radyolojik değerlendirme	26
3.6.2. Biyokimyasal değerlendirme	26
3.6.3. Histolojik değerlendirme	26
3.6.3.1. Histopatolojik analiz prosedürü	26
3.6.3.2. İmmunohistokimyasal Analiz Prosedürü	27
3.6.3.3. Semi-Kantitatif Analiz	27
3.6.3.4. İstatistiksel Analiz	28
4- Bulgular	29
4.1.Radyolojik Bulgular	29
4.2. Biyokimyasal Bulgular	31
4.3. Histopatolojik Bulgular	34
4.3.1. Kontrol grubuna ait bulgular	34
4.3.2. Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait bulgular	35
4.3.3. Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait bulgular	36
4.3.4. Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait bulgular	36

4.3.5. Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait bulgular	37
4.3.6. Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna ait bulgular	37
4.3.7. Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna ait bulgular	38
4.3.8. Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna ait bulgular	38
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	39
4.4.1. Osteopontin	39
4.4.1.1. Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	39
4.4.1.2. Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait immunohistokimyasal bulgular	40
4.4.1.3. Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	41
4.4.1.4. Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	42
4.4.1.5. Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	43
4.4.1.6. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	44
4.4.1.7. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	45
4.4.1.8. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	46
4.4.2. Osteokalsin	47
4.4.2.1. Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	47
4.4.2.2. Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait immunohistokimyasal bulgular	48
4.4.2.3. Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	

bulgular	49
4.4.2.4. Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	50
4.4.2.5. Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	51
4.4.2.6. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	52
4.4.2.7. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	53
4.4.2.8. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular	54
4.5. Semi-Kantitatif Bulgular	55
4.5.1. Histopatolojik kemik iyileşmesi skoru	55
4.5.2. Osteopontin pozitivite skoru	57
4.5.3. Osteokalsin pozitivite skoru	58
5. Tartışma	60
6. Sonuç	63
7. Kaynaklar	64
Ek-1 : Tez Onay Sayfası	

KISALTMALAR

KTY	: Keten tohumu yağı
BMP	: Bone morfogenetic protein
b-FGF	: Basit fibroblast büyüme faktörü
TGF- β	: Transforming growth faktör β
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1	: İnterlökin 1
PDGF	: Plateled derived growth faktör
IL-6	: İnterlökin 6
PGE ₂	: Prostoglandin E 2
EGF	: Epidermal growth faktör
FDGF	: Fibroblast derived growth faktör
PGF	: Prostoglandin F
CDGF	: Cartilaj derived growth factor
MDGF	: Mesenchyme derived growth factor
COLIA	: Kollojen tip 1 alfa geni
USG	: Ultrasonografi
NSAİ	: Steroid olmayan anti inflamatuvar
COX – 2	: Siklooksijenaz 2
LDL	: Low density lipoprotein
AST	: Aspartat amino transferaz
ALT	: Alanin amino transferaz
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör alfa

IL-1 β	: İnterlökün 1 beta
MCHC	:Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (Ortalama eritrosithemoglobin konsantrasyonu)
MCH	: Mean Corpuscular Hemoglobin (Ortalama hemoglobin miktarı)
RBC	: Kırmızı kan hücresi
GSH	: Glutasyon
MDA	: Malondialdehit
H&E	: Hemotoksilen- Eozin
HKİS	: Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 : Kırık iyileşmesi aşamaları	8
Şekil 2 : Kırık sonrası meydana gelen başlangıç aşaması	9
Şekil 3 : Kırık iyileşmesinde erken tamir basamağı	10
Şekil 4 : Kırık kallusu oluşumu	12
Şekil 5 : Oluşturulan grup ve alt gruplar	22
Şekil 6 : Steril koşullarda, delikli steril örtü kullanılarak işlemler öncesi hazırlık yapıldı	23
Şekil 7 : İnsizyon ve kırık oluşturulması	24
Şekil 8 : Proksimal kırık fragmanının, intramedüller tespit için hazır hale gelmesi	24
Şekil 9 : Proksimal parçadan, K telinin intramedüller olarak geçmiş hali	25
Şekil 10 : İntramedüller tespit sonrası femurun görünümü	25
Şekil 11 : 2. hafta kırık+KTY grubu	29
Şekil 12 : 2. hafta kırık kontrol grubu	29
Şekil 13 : 4. hafta kırık+KTY grubu	30
Şekil 14 : 4. hafta kırık kontrol grubu	30
Şekil 15 : 6. hafta kırık+KTY grubu	30
Şekil 16 : 6. hafta kırık kontrol grubu	30
Şekil 17 : GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı	32
Şekil 18 : GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel olarak karşılaştırılması	32
Şekil 19 : MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı	33

Şekil 20 : MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel olarak karşılaştırılması	34
Şekil 21 : Kontrol grubu femur kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	35
Şekil 22 : Sağlıklı ve KTY verilen grup femur kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	35
Şekil 23 : Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	36
Şekil 24 : Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	37
Şekil 25 : Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	37
Şekil 26 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	38
Şekil 27 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	38
Şekil 28 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	39
Şekil 29 : Kontrol grubuna ait femur kesiti	40
Şekil 30 : Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait femur kesiti	41
Şekil 31 : Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti	42
Şekil 32 : Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti	43
Şekil 33 : Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti	44
Şekil 34 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti	45

Şekil 35 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti	46
Şekil 36 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti	47
Şekil 37 : Kontrol grubuna ait femur kesiti	48
Şekil 38 : Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait femur kesiti	49
Şekil 39 : Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti	50
Şekil 40 : Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti	51
Şekil 41 : Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti	52
Şekil 42 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti	53
Şekil 43 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti	54
Şekil 44 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti	55

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1 : Çalışma grupları	23
Tablo 2 : Beş noktalı radyolojik skorlama sistemi	26
Tablo 3. Huo ve arkadaşlarının Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru (HKİS)	27
Tablo 4 : İmmunohistokimyasal pozitivite skorlaması	28
Tablo 5: Radyolojik değerlendirme verileri	31
Tablo 6 : Biyokimyasal analiz sonuçlarının gruplara göre dağılımı	31
Tablo 7 : Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru (HKİS) Analiz Sonuçları	56
Tablo 8 : Osteopontin pozitivite skorlama bulguları	57
Tablo 9 : Osteokalsin pozitivite skorlama bulguları	59

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kırıklar ülkemizde ve dünyada sık görülen sağlık sorunlarından. Bu sorunlar ekonomik ve kişiye ait olarak karşımıza çıkabilmektedir. Kırıkların tedavisi ülkelerin sağlık harcamalarında ciddi bir yer tuttuğu gibi bireylerin de günlük yaşam aktivitesini ve iş hayatını etkilemektedir. Bu nedenle kırık iyileşmesi önem arz etmektedir.

Tedavi süreci ağrı ve fonksiyon kaybı gibi nedenlerle kişide yaşam kalitesini azaltıp ruhsal etkiler oluşturabilir. Bu durum kırığın tedavi sürecinin önemini arttıran diğer bir nedendir.

Kırığın tedavi şeklini belirlemede birçok faktör etkilidir. Bu faktörlere travmanın şiddeti, kırık yeri ve şekli, hastanın yaşı örnek verilebilir. Kırığın yeri ve şekli hastadan bağımsız olup kırık anında kırığa etki eden faktörlere bağlıdır. Hastaya ait faktörler ise hastanın kullandığı ilaçlar, kronik hastalıkları, beslenme, sigara kullanımı, alkol kullanımı gibi geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır.

Kırıklar cerrahi ve konservatif olarak iki şekilde tedavi edilir. Kırık sonrası kaynamada tedavi yönteminin yanı sıra hastanın normal bir sağlığa sahip olması da etkilidir.

Kırık sonrası kemiğin kaynama sürecini etkileyen hastaya ait birçok etken vardır. Bu etkenlerden en önemlisi hastanın doku ve organlarının normal kapasiteye sahip olmasıdır. Kırık tedavi sürecinde beslenme, sigara ve alkol gibi vücudun iyileştirme kapasitesine etki eden birçok faktör vardır. Bu faktörlerin kırığın kaynama sürecini etkilediğini belirten birçok çalışma yapılmıştır. Bu sonuç alışkanlıklar kadar beslenmenin de iyileşme sürecinde önemli olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda gıda takviyelerinin iyileşme sürecine etkileri araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

KTY, antioksidan, antikarsinojenik, hematolojik ve kardiyovasküler sisteme olumlu etkileri gösterilmiş doğal bir bitkisel moleküldür. Bu molekülün kırık iyileşmesi üzerine etkisini araştıran literatürde yeterli çalışma yoktur. Bu nedenle iyileşme sürecinde gıda takviyesi güncel bir konu olması nedeniyle çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan kırık modeli üzerinde, KTY'nın kırık iyileşme sürecine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Yapısı ve Hücresel Bileşenleri

Kemik, lökomotor sistemin temel elemanıdır. Vücut postürünü korur ve hareketliliği sağlar (1). Aynı zamanda hayati organları korur, kan yapımı ve elektrolit dengesinde rol oynar (2). Vücudun diğer hücrelerinde olduğu gibi kemikte de ekstraselüler matriks bulunur. Bu yapı kemik dokuda mineralize olur (3).

2.1.1. Kemik yapısı ve gelişimi

2.1.1.1. Kemik şekilleri

Kemikler çok sayıda şekil, biçim ve boyut gösterir. Uzun kemik, yassı kemik, kısa kemik gibi gruplandırmalar yapılabilir (1). Uzun kemikler uçlarda epifiz, orta kısımlarında diafiz ve epifiz ile diafiz arasında metafiz olmak üzere üç kısmı bulunur. Kısa kemiklerin her açıdan hemen hemen aynı boyda sahiptir (2). Skapula ve iliak kemik ise yassı kemiklere örnektir. Ethmoid ve sfenoid kemik, düzensiz kemiklere örnektir. Patella ise sesamoid kemiğe örnektir (3).

2.1.1.2. Kortikal ve kansellöz kemik

Kemik kesit incelemesinde dışta korteks içte kansellöz kemik yapısı görülür (1). Kortikal kısım, kemiğin %80'ini oluşturur (2). Uzun kemiklerde diafiz bölgede kortikal kemik, kemik iliğini çevreler. Metafiz bölgede kortikal kemik inceler. Kansellöz kemik diafizden metafize doğru artarak medüller kaviteyi doldurur (3). Hormon gibi biyolojik, yüklenme gibi mekanik etkilerle kansellöz ve kortikal kemik yapıları değişebilir (4). Kortikal kemik daha dayanıklıdır ve daha yoğundur (5).

Organizasyon, içerik ve yoğunluk farklılıklardan dolayı kortikal ve kansellöz kemiğin özellikleri mekanik açıdan farklıdır (1).

Kortikal kemikte, nörovasküler yapılar içeren havers kanalı, havers kanalı çevresinde lakünalar ve bu lakünalarda osteositler yer alır. Bu sistem osteon (Havers sistemi) adını alır (2). Haversian kanalları birbirine bağlayan yapılara volkman kanalı adı verilir (3). Kansellöz kemikte trabeküler yapı daha geniştir. Arada boşluklar vardır ve kemik iliği bu boşluklarda bulunur (4). Epifiz ve metafiz esas olarak spongios kemikten oluşur (5).

2.1.1.3. Mineralize ve mineralize olmayan kemik matrisi

Kemik şekillenmesi ve iskelet maturasyonu sırasında osteoblastlar mineralize olmayan osteoidleri, mineralize kemik üzerinde oluşturur. Osteoid oluştuktan hemen sonra mineralize olur. Bu siklus nedeniyle kemik çok az miktarda mineralize olmamış kemik içermektedir (1).

2.1.1.4. Örgümsü ve lamellar kemik

Mineralize kemik, örgümsü (olgunlaşmamış, lifsi veya primer) ve lamellar (olgun veya sekonder) olmak üzere iki şekildedir (1).

Primer kemik, embriyolojik iskelette büyüme plaklarının metafizyel kısmında yer alır. Büyümeyle birlikte sekonder kemik, primer kemiğin yerini alır (1). İskelet maturasyonu tamamlandığında vücutta tendon ve ligamanların kemiğe tutunduğu yerler gibi bazı bölgelerde az miktarda primer kemik kalır. Bu durumlar dışında 4-5 yaşlarından sonra nadiren primer kemik görülür. Fakat kırık iyileşmesi evrelerinde, ilk kemikleşme zamanında, metabolik, enfektif, neoplastik ve inflamatuvar hastalıklar gibi durumlarda kemik döngüsü ve yapımı artar ve primer kemik görülebilir (6).

Primer ve sekonder kemiğin mekanik ve yapısal özellikleri farklılık gösterir. Primer kemikte, hücre ve su içeriği daha fazladır, mineralizasyon düzensizdir. Ayrıca esnek ve zayıf olmasından dolayı daha kolay deforme edilebilir. Bu nedenle kırık dokusu daha az serttir (6).

Sekonder kemikte osteosit sayısı daha fazla, kemik yoğunluğu daha azdır (1).

2.1.1.5. Kemik doku gelişimi

Columna vertebralis, notokord ve nöral tüpün her iki yanındaki, somit yapı olarak adlandırılan mezodermden kaynaklanır. Bu mezodermiler daha sonra myotom, sklerotom ve dermatom olmak üzere üç kısma ayrılır. Columna vertebralis sklerotomdan gelişirken myoblastlar myotomdan gelişir. İnsan ekstremitesi 4-8. haftalar arasında oluşur. Ektoderm ve mezoderm katmanlarından ekstremitte tomurcukları meydana gelir. Bu tomurcuklarda 6. haftada kondroid doku, 7. haftada ise bu kondroid doku üzerinde kemik doku oluşma süreci başlar. Bunlar primer kemikleşme merkezleridir. Sekonder kemikleşme merkezleri ise uzun kemik uçlarında bulunur (2).

2.1.2. Kemik hücreleri

Kemik doku, hücre ve matriksten meydana gelmiştir (1). Kemiğin oluşması ve canlılığının devamı, kemiği oluşturan farklı hücrelerin birbirleriyle uyumlu çalışmalarına bağlıdır (2). Kemik hücreleri osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler olmak üzere dört grupta incelenir (5).

2.1.2.1. Farklılaşmış/Osteoprogenitör hücreler

Tek çekirdekli, küçük, az sayıda organeli olan ve şekilleri düzensiz olan hücrelerdir. Kemik dışı dokularda da bulunabilirler. Osteoblastlar uyarı alana kadar bu formda bulunurlar (1).

2.1.2.2. Osteoblastlar

Mezenkim kaynaklı farklılaşmamış hücrelerin farklılaşması sonucu oluşurlar. Matriks mineralizasyonu ve kemik rezorbsiyonunda rol oynarlar. Kemik yüzeyinde bulunurlar (1). Ekzantrik ve tek çekirdekli, kuboidal, endoplazmik retinakulum ve golgiden zengin hücrelerdir. Tip 1 kollojen, osteopontin, kemik siyaloproteini ve osteokalsin üretimini gerçekleştirirler. Uyarıldıkları zaman organik matriks sentezler ve parathormon reseptörleri içerirler (5). Osteoid doku oluştururlar ve osteositler ile temas halindedirler. Daha sonra aktivitelerini azaltabilir veya osteosit haline dönüşebilirler. Osteoblast hücre membranında alkalin fosfataz reseptörleri vardır (7). Yeni kemik oluşumu esnasında alkalin fosfataz serum seviyeleri yükselir (8).

2.1.2.3. Osteositler

Osteositler, olgunlaşan kemiğin %90'ını oluşturur (1). Matriks ve yüzey arasında hücre ağı oluşturup tüm mineralize matriks yüzeyine ulaşabilirler (6). Ayrıca kemik ve kan arasında mineral dengesi ve kemik sıvı dengesinin sağlanmasında rol oynarlar (8).

2.1.2.4. Osteoklastlar

Monosit/makrofaj kaynaklı, büyük, çok çekirdekli, düzensiz şekilli, mitokondriden zengin hareketli hücrelerdir. Periosteal, endosteal ve havers kanal yüzeylerinde bulunurlar (1). Buldukları matriks yüzeyinde kıvrım oluşturarak kemik rezorbsiyonunda kritik rol oynarlar. Rezorbsiyonla howship lakunası adı verilen tipik

çukurları oluştururlar (5). Kemik rezorbsiyonu sonrası tekrar bölünerek mononükleer hücre şekline dönebilir veya apoptozise uğrarlar (8).

2.1.3. Matriks yapısı

Kemik doku organik makro moleküller, inorganik moleküller ve sıvıdan oluşan matriks yönünden zengindir (2). Bunlar su, mineral, lipid, protein, tuz ve glikoproteini içerir. Kemik yaş ağırlığının yaklaşık %70'ini inorganik matriks, %20'sini ise organik matriks oluşturur. Geriye kalan kısmı ise su içeriğidir (9).

Organik matriks kemik şeklini ve gerilme gücünü sağlar. İnorganik matriks ise kemiğin kompresyona karşı dayanıklılığını sağlar (4).

2.1.3.1. Organik matriks

Organik matriks, annulus fibrozis ve menisküs benzeri fibröz bir dokudur (7). Organik matriksin %90'ını tip I kollajen, geriye kalan kısmı ise osteonektin, proteoglikan ve tip V kollajen oluşturur (9).

Mineralizasyon sonrası organik matriksin yapısı değişir ve stabil hale gelir. Osteoide kıyasla daha fazla kollajen içerir. Mineralizasyon sonrası rezorbsiyona kadar geçen zaman diliminde yapısal olarak stabil kalır (1). Organik matrikste oluşabilecek anormal durumlar kemikte zayıflama ile sonuçlanır (2). BMP, osteokalsin, b-FGF, TGF- β , fibronektin, vitronektin, IGF kemiğin mineralize olmayan matriksinde yer alır (3).

2.1.3.2. İnorganik matriks

Mineralizasyon kemiğin sertlik ve dayanıklılığını artırıp mineral deposu olarak görev yapmasını sağlar (4). Kemik matrikste vücutta bulunan kalsiyumun %99'u, fosfatın %88'i ve bunlara ek olarak magnezyum, sodyum ve karbonat bulunur (9).

Olgunlaşan kemikte inorganik matriks kristal hidoksiapatit formundadır (2). Florid, magnezyum sitrat ve sodyum ayrı olarak bulunur. (6)

2.1.4. Kemik hücre aktivite kontrolü

Kemik matriks fizyolojisi, osteoblast ve osteoklastlar arasındaki denge ile sürdürülür (2). Kemiğin mekanik özellikleriyle birlikte kütlelerinin de korunabilmesi için osteoblast ve osteoklast arasındaki bu denge zorunludur. Bu durum farklı uyarılarla değiştirebilir (4).

2.1.4.1. Sistemik faktörler

Egzersiz, beslenme ve hormonal faktörler kemik rezorpsiyonunu etkiler (1). Ayrıca D vitamini, büyüme hormonu, tiroid hormonu, insülin, kalsitonin, testosteron ve östrojen de kemik döngüsü üzerine düzenleyici etkilere sahiptir (6).

Kemik rezorpsiyonunu artıran durumların başında diyet anormallikleri, hormonal dengede bozulma ve sedanter yaşam gelir (5). Kemik olgunlaşma sürecinde, protein eksikliğinin olması bu süreci olumsuz etkiler (9).

Kortikosteroidler, osteoblastların sentezleme fonksiyonunu azaltır (1). Farklılaşmamış osteoprogenitor hücrelerin osteoblastlara dönüşümünü engeller (1). Kalsiyum dengesinde anormalliklere neden olabilir (7).

Östrojen de kemik döngüsü üzerine etki eder ve eksikliği menopoz sonrası kemik kütlelerinin azalmasından sorumludur (1,6).

2.1.4.2. Lokal faktörler

Kemik hücre döngüsünü etkileyen birçok lokal faktör vardır. Bunlara; hücreler arası etkileşim (1), besleyici ve yıkım ürünlerinin konsantrasyonları, oksijenlenme durumu (4), lokal iyon konsantrasyonları ve pH, elektrik akımı, yük verme (5), IL-1, romatoid artrit ve TGF- β örnek verilebilir (8).

2.1.5. Kemik damarlanması

Uzun kemiklerin metafiz ve diafizinin kanlanması nütrisyonel arterler, periosteal arterler ve epifizyal-metafizyel arterlerden sağlanır. Nütrisyonel arterler esas olarak diafizi besler. Distal ve proksimal medüller arter sistemi olarak da dallara ayrılır. Proksimal ve distal dalları metafizyel ve periosteal arterlerle bağlantılıdır (1). Normal durumlarda medüller sistem periostu besler (6). Epifizler, epifizyal arterlerden beslenirler. Epifizin kapanmasından sonra ise epifizler medüller sistem anastomozları ile beslenirler (7).

2.1.6. Kemik sinirleri

Kemik doku içerisinde sinir olmayıp, kan akış kontrolü ile ilgili olduğu düşünülen sinir lifleri bulunur (1).

2.1.7. Periost

Kemik dokusu, eklem yüzeyi hariç dışta periosteum yapısında kılıf, içte ise endosteum yapısında hücre ve fibroz yapıyla kaplıdır (1). Periosteum içerisinde, mezenkim kaynaklı hücreler vardır. Bu hücreler kırık iyileşmesi ve yeni kemik oluşumunda rol alır (3). Periost, dışta fibröz, içte ise hücre ve damardan zengin tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur (4). Hücre ve vasküler içerik, yeni kemik oluşturma gücü yaşla azalır. Fakat travmaya yanıt olarak ileri yaşta bile yeni kemik oluşturma yeteneğini korurlar. (5) Sharpey lifleri, kemik matriks ve periosteum tabakası arasında bağlantı sağlayan kollajen yapıdır (8).

2.1.8. Kemikleşme

2.1.8.1. İntramembranöz kemikleşme

Mezenkimal dokuda oluşan ve özellikle yassı kemiklerde görülen ossifikasyon şeklidir. Mezenkimal hücreler osteoblastlara dönüşür, kemik matriksi oluşur ve kalsifikasyona uğrar (8).

2.1.8.2. Enkondral kemikleşme

Uzun ve kısa kemiklerin kemikleşme şekli olan enkondral ossifikasyon iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamadakondrositlerin hipertrofiye olur ve kondrosit kaybı oluşur. İkinci aşamada ise kondrosit kaybının olduğu bölgeler farklılaşmamış hücreler tarafından doldurulur ve osteoblastlara dönüşerek kemik matriksi sentezlenir (8).

2.2. Kırık İyileşmesi

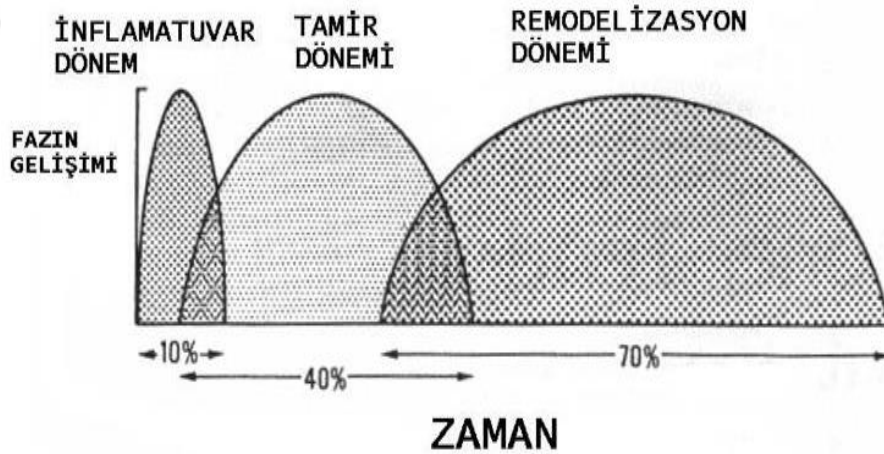
Kemiğe dışarıdan veya içeriden uygulanan kuvvetin dokunun gücünü aşması sonrası kortikal bütünlük kaybı oluşmasına kırık denir. Kuvvetin miktarı ve yoğunluğu, yaralanma şeklini belirler (2). Kırıklar, enfeksiyon, metabolik kemik hastalıkları ve neoplastik nedenler gibi kemiği zayıflatan etkenler sonrasında düşük enerjili travmalarla oluşabilir (10).

Özetle; kırık meydana geldikten sonra ilk oluşan durum kırık etrafındaki kanamadır. Kanama bölgesine makrofajlarla birlikte trombositler de göç eder. İnflamasyon evresi bu şekilde başlamış olur. Bu bölgede PDGF, TGF- β , IL-1, IL-6 ve PGE₂ salınımı olur. Bunlar kırık iyileşmesi üzerine kritik etkiye sahip sitokinlerdir. FGF

yeni damar oluşumu ve mezenkimal hücre artışını başlatır. Kırık hematomu yerini fibroblast ve mezenkim kaynaklı hücelere bırakır. Bu hücreler ve çevre periosttan BMP salınımı olur. BMP ailesi, hücre büyümesi/farklılaşması ve bu hücrelerin apoptozundan sorumludur. Kırık hematomu arttıkça kollajen içeriği de artar. Mezenkimal hücreler kondrositlere dönüşerek kırıkta doku sentezler ve kırıkta kallus oluşur. Daha sonra bu kırıkta kallus kemik dokuya dönüşür. Yeniden şekillenme süreci, onarım süreci devam ederken başlar ve yıllarca devam edebilir (2).

Kemik doku, kırık sonrası tamamen eski haline gelerek iyileşebilir. Bu süreç bir dizi olaylar serisini içerir. Bu süreçler; inflamasyon, tamir ve yeniden şekillenmeyi içerir. Kırık ile inflamasyon başlar. Bunu tamir fazı takip eder. Tamir sonrası hücreler ve matriks oluşumu, yeniden şekillenme fazı ile normal kemik fonksiyon ve yapısının sağlanması ile devam eder. Bu üç aşamanın birbirinden net ayrılabilir sınırları yoktur (1,2).

Kırık iyileşmesinin fazları gün olarak; inflamatuvar faz (1-4. gün), onarım/tamir fazı (2-40. gün) ve yeniden şekillenme fazı (25-100. gün) sürelerini içerir (Şekil 1) (10).

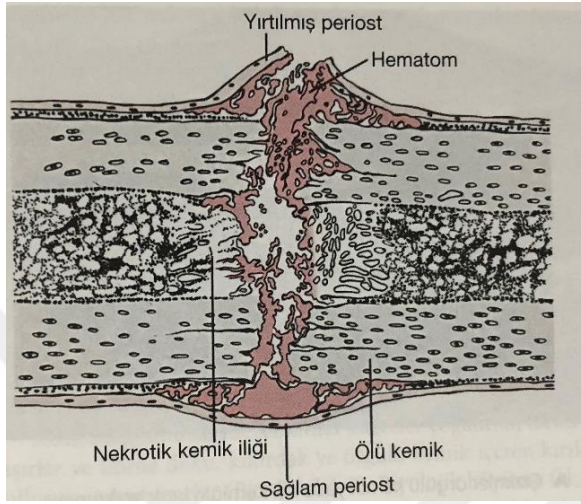


Şekil 1 : Kırık iyileşmesi aşamaları (10)

2.2.1. İnflamasyon

Kırık sonrası, sadece kemikte değil, çevre yumuşak doku ve periostta da hasar oluşur (10). Bu süreçte travmaya vücudun verdiği ilk cevap, inflamasyondur (11).

Kırık uçları, çevre yumuşak dokuda yer alan kan damarları ve periost tabakasında hasar oluşturur. Kan damarları ve lenfatiklerden sızan kan, periost altında birikerek periostun kalkmasına neden olur. Kanamayı durdurmak için trombosit kaynaklı uyarılar bölgeye salınır. Kanamayla oluşan hematoma, çevre yumuşak dokular tarafından sınırlanır (Şekil 2) (12).



Şekil 2 : Kırık sonrası meydana gelen başlangıç aşaması (12)

Kırık hematoma, kırığın iyileşme sürecinde kritik bir öneme sahiptir. Hem kırık uçlarının birbirinden ayrılmasını engeller hem de osteojenik uyarıda rolü vardır. Açık kırıklarda, hematoma kırık uçlarından dağılması ve dış ortama çıkması iyileşmeyi olumsuz etkiler (10). Kırık hematoma yer alan hücrelerden ve özellikle trombositlerden salınan bazı sitokin ve büyüme faktörleri gibi uyarıların kemik iyileşmesinde önemli bir rolü vardır (12).

Kırık bölgesinde arteriollerde vazokonstriksiyonu takiben arteriol, venül ve kapiller damarlarda vazodilatasyon gelişir. Bunun nedeni mast hücrelerinden ortama salınan histamindir. Kapiller damar permeabilitesi artar (1). Oluşan eksuda ile ilk 24 saatte ödem meydana gelir. PMNL, makrofaj ve lenfositler bu eksuda özelliğindeki sıvı bölgesine göç eder (10,11).

Haversian sistemler arası bağlantılar zayıftır. Bu yüzden kırık sonrası dolaşım kırık bölgesinde durma noktasına gelir. Osteositler bir araya gelir ve piknozis ile boşluk bırakacak şekilde lizise uğrarlar. Kırık uçlarında nekrotik alanlar bu lizis sonucunda oluşur (10). Prostaglandinler, kırık uçlarının ve çevresinin salgıladığı önemli bir parametredir. Prostaglandinlerin salınımı, akut inflamasyonun başlatılmasında çok kritik

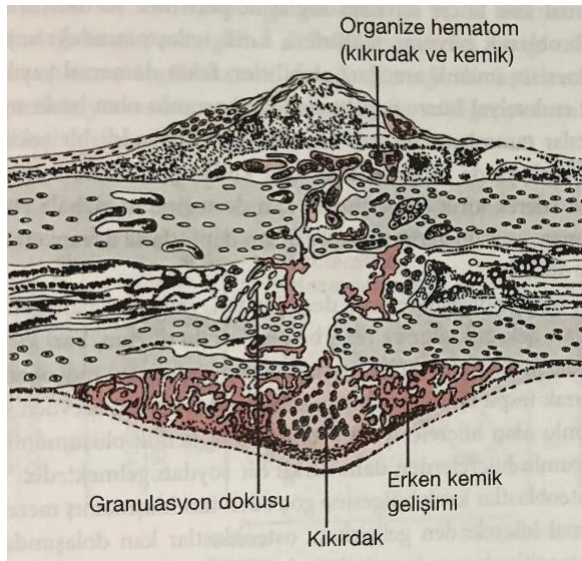
bir öneme sahiptir. Etraf nekrotik doku da yine akut inflamasyonun başlatılmasında rol oynar (10,12).

Hematom oluşuktan yaklaşık 48 saat sonra organize olmaya başlar. Fibrin bir iskelet yapı oluşturur. Bazı aminoasitler fibrinojenle fibrin haline gelir ve bu bölgeye hücre göçü ile fibrin matriks denilen yapı oluşur. Ayrıca makrofaj ve fibroblastlar tarafından sentezlenen kollajen de bu fibrin yapıya katkıda bulunur. Fibrin yapının önemi, yeni kemiği üretecek hücreleri barındırmasıdır. Kırık çevresinde pH değeri asidikken, fibrin yapı sayesinde nötrale döner. İlerleyen süreçte alkali bir ortam oluşur (10,13).

Monosit ve makrofajlardan IL-1 salgılanır. IL-1, sistemik etkileri olan bir sitokindir (10). Kırık sonrası ateş oluşumundan sorumludur (11). PMNL göçü, kemik rezorpsiyonu ve PGE₂ salınımını da gerçekleştirir (12).

2.2.2. Tamir

Kırık hematomunun organize olmasıyla başlayan iyileşmenin önemli aşamalarındandır (9). Prekürsör hücrelerin farklılaşmış hücrelere dönüşmesi, karmaşık olaylar zinciri olup elektriksel, mekanik ve en önemlisi kimyasal bileşenlere sahiptir (11). Tamir sürecinde elektriksel uyarı, hücresel aktivitenin başlangıç basamağını oluşturur. Kırık bölgede maksimum olan bu durum takip eden süreçte yavaşça azalır (Şekil 3) (13).



Şekil 3 : Kırık iyileşmesinde erken tamir basamağı (12)

Tamir sürecinde mezenkimal kökenli hücreler etkilidir. Kırık etrafında yer alan granülasyon dokusu, endosteum ve periosteumdan köken alır (1). İlk farklılaşmaya başlayan hücre grubu fibroblastlardır. Kırık uçları arasında oluşturdukları granülasyon dokusu yumuşaktır. Granülasyon dokusunun oluşumuna endosteum ve periost kaynaklı osteojenik hücreler de katkıda bulunur (10). Osteoblastlar, osteoid salgılar. Fibroblastlar, kollajen salgılar. Kondroblastlar ise kollajenin yanı sıra glikozaminoglikan salgılar. Oluşan yeni kemiğin gerilme kuvvetlerine karşı dayanıklılık durumu içerdiği kollajenle doğru orantılıdır (11). Oluşan kallus miktarı kırık hattındaki hareket ile doğru orantılıdır. Periosteumda oluşabilecek zayıflıklar bu süreci yavaşlatır ve zayıflatır (13).

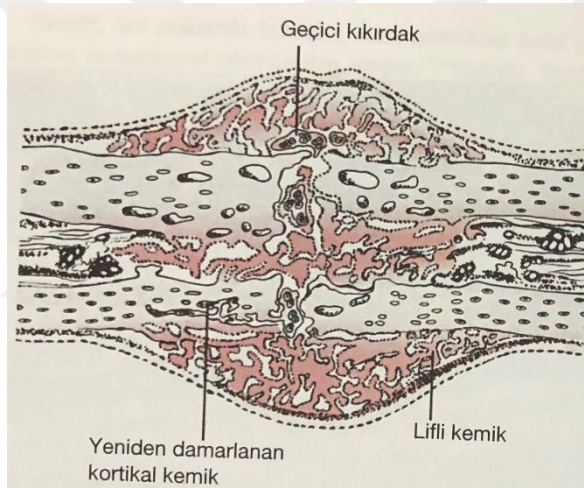
Kırık uçları arasında yer alan mezenkim kaynaklı hücrelerin çoğalması ilk 16 saatte görülür. 36. saatte en yüksek seviyeye ulaşır. Yeni damar oluşumu 48-72. saatlerde ışık mikroskopunda görünebilecek seviyededir. Özellikle ilk hafta sonunda yeni damar oluşumu belirgindir. Periost kaynaklı damarlar ilk zamanlarda yeni damar oluşumuna katkıda bulunurken, nütrisyonel damarlar daha geç evrede katkıda bulunur. Kırığa yakın hücreler osteoblastlara, uzak olanlar ise kondroblastlara farklılaşır. Osteoblastlar kan dolaşımının yeterli seviyede olduğu alanlarda trabekülleri, kondroblastlar ise kırık dokuyu oluştururlar. En üst kısımda osteojenik hücre katmanı, ortada kondroid katman ve en derinde ise kemik trabekülleri yer alır. Zaman geçtikçe kırık uçları arası kitleler bir araya gelerek kallus oluşmasını sağlar. Oluşan kallus dış kallus olarak adlandırılır. Gelişim sürecinin en önemli belirleyicisi kemik hücrelerin proliferasyonu ve ortada yer alan kondroid dokunun büyümesidir. İç kısımda da endosteal ve kemik iliği kaynaklı osteojenik hücreler iç kallusu oluşturur. Böylece oluşan kallus yumuşak kallus olup, fibröz doku ve kırıkdaktan meydana gelir. Bu süreç kırık sonrası 7-12. gündür (10,11).

Tamir evresinin ilk aşamalarında kırık dokunun oluşumu ön plandadır. Kallus vaskülarizasyonu arttıktan sonra, kemik doku oluşmaya başlar (10). Kallus kanlanması yeterli seviyede olursa, normal kemik oluşumu için gereken matriks sağlanmış olur. Kemik kallus oluşumu için osteoid mineralizasyonu gereklidir (10,12).

Osteoid mineralizasyonu kemik kallusunun hem oluşmasından hem de yapısal olarak stabilitesinden primer sorumlu olaydır. Osteoid mineralizasyonu sonrası tropokollajen, osteoblastlar tarafından sentezlenir. Tropokollajen, kollajen tellere dönüşür. Bu oluşan kollajen teller arasında hole zones denilen boşluklar yer alır. Bu boşluklarda kalsiyum hidroksiapatit birikimi olur. Kalsifikasyon denilen durum ise bu teller üzerine

kalsiyum fosfat birikmesidir (1). Kalsifikasyon, proteoglikan ve osteonektin tarafından uyarılır. Kıkırdak matriksi kalsifikasyona uğrar ve kalan kondrositler nekroza gider. Bu nekroz alanlarında lakünalar oluşur. Bu lakünaların içerisinde damarlanma ve damarlanma sonrası kemik hücre birikimi olur (10). Kalsifikasyon olmazsa yeni damar oluşum süreci sekteye uğrar. Nihayetinde süngerimsi kemik oluşur ve trabeküller arasında kıkırdak doku görülür (11,12).

Nekrotik olan kırık uçları, yeterli kanlanmaya sahip değildir. Bu nekrotik kısım rezorbe olur (1). Osteoklastik aktivite sonrası oluşan boşlukların etrafını osteoblastlar çevreler. Canlı ve yeni kemik oluşumu meydana gelir. Nekrotik alan tamamen canlı kemikle dolar. İç ve dış kallus oluşumu sonrası sağlam bir yapı meydana gelmiş olur. (Şekil 4) (10).



Şekil 4 : Kırık kallusu oluşumu (12)

Kallus oluşumu ile birlikte kaynama varlığından söz edilir. Kaynama tam gerçekleşmemiştir. Çünkü kallusun bazı kısımlarının etkili olmaması ve gerekli olmaması nedeniyle rezorbe olması gerekir. Yeniden şekillenme fazının önemi ortaya çıkar (10).

2.2.3. Yeniden Şekillenme

En uzun kırık iyileşme basamağıdır (1). Bu dönemde düzensiz, sert ve kuvvetli kallus düzenli ve normal kemiğe dönüşür. Tamir evresinin ortasında başlar ve 4-16 hafta sürer. Kırık iyileşme gecikmesi durumunda süre; aylar hatta yıllar boyunca devam edebilir (10). Yeniden şekillenme, büyüme plağı ve kırık hattından kaynaklanır. Kırık hattından meydana gelen yeniden şekillenme %25 kadar olup geriye kalanı büyüme plağından olur (13). Yeniden şekillenme süreci wolf kanunu prensiplerine göre

olmaktadır. Bir kemik etki eden kuvvetlere cevaben uzar veya remodele olur. Konveks taraf stresi azaltma eğilimindedir ve osteoklastik etkidedir. Konkav taraf ise stres altındadır ve osteoblastik aktivite etkisindedir(14). Kemik çapı artarsa ve uzarsa oluşan deformite, periost ve fizis hattının asimetrik bir şekilde fonksiyonuyla düzelir (15).

Kalsifiye kırıkta osteoid dokuya dönüşür ve ardından primer trabeküler doku meydana gelir (1). Lamellar kemik trabeküler dokunun yerini alır (10). Osteonlar oluşur. Medüller kanal yeniden oluşur (13).

2.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler;

2.3.1. Yaş

Kemik dokunun, yeniden şekillenme kapasitesi ve yenilenme yeteneği yaşla ters orantılıdır. Çünkü çocuklarda hücrelerin mitoz yeteneği daha fazladır. Bu nedenle çocuklarda kırıklar hızlı iyileşir (16,17).

2.3.2. Periostun durumu

Periost, kırık iyileşmesinde önemlidir. Çünkü periostun hasarlanması kırık iyileşmesini radyolojik ve histolojik olarak azaltır (18). Periostun kalın olması iyileşme sürecini olumlu etkiler. Yaşla birlikte periostta incelme meydana gelir (19).

2.3.3. Hormonlar

Kortizon, kırık iyileşmesini negatif yönde etkiler. Kallus oluşumunu, osteoblast hücrelerinin gelişimini bozarak azaltır. EGF, FDGF ve PDGF gibi kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olan büyüme faktörlerine antagonist gibi davranarak kırık iyileşmesini baskılar (20).

Parathormon, kalsiyum ve fosfor metabolizmasında rol oynayan bir hormondur. Kırık iyileşmesini artırıcı bir etkisi vardır (21). Kırık görülme riskini de azaltır (22).

Growth hormon, anabolik bir hormon olup kırık iyileşmesini artırır (21). Troid ve insülin benzeri hormonun da kırık iyileşmesini arttırıcı yönde etkileri bildirildi (23).

Leptin, yağ doku kaynaklı bir hormondur. Kemik büyümesi, gelişimi ve kemik oluşumu üzerine etkilidir. Leptinin, doz ile doğru orantılı olarak kırık iyileşmesini

arttırdığı deneysel olarak gösterilmiştir (24). Testosteron, kırık iyileşmesi üzerine olumlu yönde etki eder. (25) İnsülin hormonu, anabolik bir hormon olup kırık iyileşmesini olumlu yönde etkiler (21,23).

Kalsitonin hormonu, vücutta tiroid bezinde yer alan parafoliküller hücrelerden sentezlenir. Polipeptit yapılı bu hormon, kalsiyum ve fosfor dengesinde rol oynar (21). Kalsiyum ve fosforun serum düzeylerini düşürür. Ayrıca osteoblastik aktiviteyi artırarak kırık iyileşmesine olumlu katkıda bulunur (26).

Östrojen hormonu, postmenopozal osteoporozdan sorumlu olmasının yanı sıra kırık iyileşmesini azaltıcı bir etkiye sahiptir (27).

2.3.4. Prostaglandinler ve büyüme faktörleri

Araşidonik asit türevi olan prostoglandinler, kırık iyileşmesi sürecinde önemlidirler. Kemotaktik etkileri vardır. Akut iltihabi durumlarda önemli bir sitokin görevi görür. PGF, kemik gelişimini hızlandırırken PGE₁ ve PGE₂ kemik yapımını arttırıcı etkilere sahiptir. TGF- β , iltihap oluşumu ve hasarlı dokuların onarımında görev alır. Kemik hücrelerinin matriksi ve trombositler, TGF- β kaynağıdır. Kemotaktik etkileri olup granülasyon dokusunun oluşmasına katkıda bulunurlar. BMP, kemik kaynaklı morfogenetik proteindir. Mitojenik etkileri ve farklılaşmayı sağlayıcı etkileri vardır. FGF, kallusu, kırık oluşumu aşamasında genişletir. PDGF, trombosit kemotaksisini arttırırlar ve kallus oluşumu ve hacmine katkıda bulunurlar. IL-1, kollajenaz enzimini sentezler ve fibroblast proliferasyonuna etki ederler. PGE₂ sentezini de uyarırlar. EGF, kemik absorpsiyonunu artırır. CDGF, tip 2 kollajen düzenleyicisidir. MDGF'nin osteoblast ve kırık hücreleri üzerine deneysel olarak etkili olduğu gösterilmiştir (28,29).

COLIA1(Tip 1 alfa geni) geni ile yapılan deneysel bir çalışmada bu genin kırık iyileşmesini arttırdığı saptanmıştır (30).

Kemik morfogenetik proteinler ailesinden BMP-9, kemik oluşumunda rolü olan bir proteindir. Deneysel çalışmalarda kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediği ve kallusun biyomekanik gücünü arttırdığı gösterilmiştir (31).

MikroRNA-218, osteogenez düzenleyicisidir. Mezenkimal hücrelerin osteogenezini artırır. Femur kırığında lokal olarak uygulandığında yeni kemik oluşumunu arttırdığı ve kırık iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (32).

2.3.5. Vitaminler

D vitamini eksikliğinde kalsiyum düzeyi düşer ve kemiğin kalsifikasyon yapma yeteneği azalır (33). D vitamini, normal dozda kırık iyileşmesini artırırken düşük ve yüksek dozlarda kırık iyileşme sürecinde olumsuz etkiye yol açar (34,35). E vitamini ve C vitamin alımı bozukluğunda, K vitamini ve B6 vitamini eksikliğinde kırık iyileşme süreci olumsuz etkilenir (36,37). Hücre farklılaşmasında rolü olan A vitamini, normal dozlarda kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkiye sahipken yüksek dozlarda olumsuz etkiye sahiptir (20).

2.3.6. Elementler

Çinko ve selenyum eksikliği, kırık iyileşmesinin yavaşlamasına neden olur (36,37). Kemik metabolizmasında kritik öneme sahip kalsiyum eksikliğide benzer şekilde kırık iyileşmesini azaltır (35).

2.3.7. Travmanın şekli ve şiddeti

Açık kırıklarda, çevre yumuşak dokunun hasarının fazla olması ve enfeksiyon nedeniyle kırık iyileşmesi daha zor gerçekleşir. Yumuşak dokunun, kırık uçları arasında sıkışması kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Kırık hematomunun dış ortama çıkması da açık kırıkların geç kaynama nedenlerinden biridir. Yüksek enerjili bir travma, kırık iyileşmesini geciktiren kırığa bağlı faktörlerden biridir (38).

Eklem içi kırıklarda da kaynama daha zor gerçekleşir. Bunun nedeni eklem sıvısında yer alan kollajenaz enzimidir (16).

2.3.8. Tedaviye bağlı etkenler

Sık redüksiyon yapılması kırık iyileşmesini geciktirir. Yine aralıklı yapılan redüksiyonlar sonrası her defasında kanama olması ve oluşan yeni kalluslar, kaynamayı geciktirir (39).

2.3.9. Enfeksiyon

Kırık bölgesinde var olan eski veya yeni bir enfeksiyon, kırık iyileşmesi sürecinde olumsuz etkiye neden olur (40). Kırık hattında mikroorganizmaya karşı ortaya çıkan inflamatuvar yangısal durum, çevre kemik dokuda nekroza, kallus yetersizliğine ve kırık

uçları arasında mesafede artışa yol açar. Böyle bir durumda kırık uçları hareketi artar. Böylece kırık iyileşmesi gecikir (41).

2.3.10. Sigara kullanımı

Sigarada yer alan nikotin, kırık bölgesine olan kan akımını, vazokonstrüksiyon yapıcı etkisi ile azaltır (42). Karboksihemoglobin düzeyi, sigara içenlerde daha fazladır (43). Sigara trombosit agregasyonunu artırır (44). Kan vizkozitesini artırır (45). Kollajen sentezini azaltır (46). Prostosiklinin kan düzeylerini azaltır (47). Tüm bu etkileri kırık iyileşmesi sürecini olumsuz etkiler (42-48).

2.3.11. Alkol kullanımı

Kronik alkol kullanımı, osteoblastik aktiviteyi azaltır (49). Kemik mineral yoğunluğu da alkol kullanımının etkisiyle azalır (50,51). Etanol kullanımı sonrası kırık iyileşmesinin azaldığını gösteren birçok deneysel ve klinik çalışma vardır (52,53).

2.3.12. Kemiğe özgü hastalıklar

Metabolik kemik hastalıkları da kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etki eder. Bunlar arasında osteomalazi, rikets, paget, osteogenezis imperfekta, Gaucher hastalığı ve osteopetrozis sayılabilir (54).

Osteoporozda kemik metabolizması yavaşlar (55). Bu yavaşlamanın kırık iyileşme aşamasında kallus oluşumunu azalttığı düşünülmektedir. Sonuç olarak osteoporotik kemiklerde kırık iyileşmesi daha zor olur (56).

2.3.13. Diabetes mellitus

Diabetes mellitusun anjiopatik ve nöropatik etkileri ile kırık iyileşmesi üzerine yavaşlatıcı bir etkisi vardır. Kollajen sentezi azalır. Kırık iyileşmesinde görevli hücrelerde belirgin bir düşüş meydana gelir (57).

Kontrollü bir glisemiye sahip insülin tedavisi alan diyabet hastalarında, kaynamama riski azalmaktadır (58).

2.3.14. Beslenme durumu ve protein yetmezliği

Beslenme eksikliği bulunan ve protein yetmezliği olan hastalarda kırık iyileşmesi daha güçtür (59,60).

Protein eksikliği, büyük kemik kırıklarında artan katabolizma ve idrarla protein kaybı azot dengesini bozar. Bu durumda oluşan kallusun, biomekanik olarak kalitesi azalır (61).

Protein desteği sonrası kırık iyileşmesi olumlu yönde etkilenir (62).

2.3.15. Kafa travması

Kafa travması geçiren hastalarda, kırık iyileşme süreci, kafa travması olmayan hastalara göre daha hızlıdır (63).

2.3.16. Ekstremiteye özgü durumlar

Lenfödemi olan ekstremitelerde, kırık iyileşmesinin olumsuz yönde etkilenir. Kırık iyileşmesi sonrası kallus yerine fibrötik karakterli bir skar dokusu oluşur (64).

Kırık bölgesinde var olan bir tümöral oluşum, kırık iyileşmesinde gecikmeye neden olabilir (40).

Egzersiz, doku kan akımını artırarak kırık iyileşme sürecini olumlu etkiler (16).

2.3.17. Lokal tedavi yöntemleri

Ekstrakorporal şok dalgası(18), elektromanyetik tedavi(65), hiperbarik oksijen tedavisi(28,29), S.aureus tarafından sentezlenen stafilokokal enterotoksin C2 (66) ve siyaloglikoprotein(67), kırık iyileşmesini artırır.

Radyoterapi, hücre çoğalmasını azaltan bir tedavi şekli olup kırık bölgesinde de bu etkisinden dolayı iyileştirmeyi geciktirir (68).

2.3.18. Kırık cerrahisinde kullanılan maddeler

Kırık cerrahisinde kullanılan maddelerden kemik grefti uygulaması (19), hidroksilapatit (69), demineralize kemik tozu (70) kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkiye sahiptir.

2.3.19. Doğal maddeler

Propolis, bitkisel kaynaklı yapışkan bir maddedir. Arılar tarafından bitkilerden toplanarak kovan içerisinde kullanılır. Bal içerisinde bulunması nedeniyle tıbbi olarak dikkat çeken propolis, plazmada olduğu gibi kemik dokuda da antioksidan belirteçler üzerine olumlu etki yapar. Kullanım süresine bağlı olarak kırık iyileşmesi üzerine olumlu

etkileri deneysel olarak gösterilmiştir. Kırık iyileşmesinde hem radyolojik açıdan hem de kallusun kalitesi açısından olumlu katkıda bulunmuştur (71).

Antioksidan, hemostatik, antiaterosklerotik, antitümoral, antiinflamatuvar ve vazodilatator etkileri olan ankaferd, doğal bitkilerin karışımı olarak elde edilir. Kırık iyileşmesinin erken zamanlarında, iyileşmeyi artırıcı etkisi vardır (72).

Taurin nörotransmitter etkiye sahip, vücutta osmotik denge kontrolünde rol alan önemli bir aminoasittir. Antioksidan etkisi vardır. Ateroskleroz oluşumunu engellediği bilinir. Kalsiyumun hücre içi düzenlenmesinde de rol alan bu maddenin, kırık iyileşmesi üzerine etkileri sıçanlarda deneysel olarak incelenmiştir. Hem radyolojik hem de histolojik olarak kırık iyileşmesi ve oluşan kallus üzerine olumlu etkileri olan bir aminoasittir (73).

Bitkisel kaynaklı bir madde olan ginkgo biloba kullanımı, kırık iyileşmesi üzerine radyolojik ve histolojik olarak olumlu katkıda bulunur (74).

2.3.20. NSAİ ilaçlar

NSAİ ilaçlar yeni kemik oluşumunu ve kırık sonrası iyileşmeyi geciktirir (75). Tam mekanizması bilinmemekle birlikte osteoblastik aktivite azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (76). Kullanım süresi dört hafta üzerine çıktığı zaman veya operasyon sonrası kullanıldıkları zaman kaynamamaya yol açtığı gösterilmiştir (77). Non steroidal antiinflamatuvar etkili ilaçların, kırık iyileşmesinin inflamasyon evresinde olumsuz etki göstererek kırık iyileşmesini geciktirdiğine dair yayınlar mevcuttur (78).

COX-2 selektif inhibisyonu yapan grupta kırık iyileşme gecikmesi, non-spesifik gruba göre daha fazladır (79).

2.3.21. Antihiperlipidemik ilaçlar

Statinler, genel olarak kemik rezorbsiyonunu azaltırlar. Bu etki HMGKo-A redüktaz aracılığı ile olur. Bu enzim inhibe edilir ve kemik rezorbsiyonu azalır. Simvastatin, antihiperlipidemik ajan olarak günümüzde sık kullanılmaktadır. Simvastatinin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı deneysel bir çalışmada simvastatin, kırık bölgesine transdermal olarak uygulanmış ve kırık iyileşmesi üzerine belirgin olumlu etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (80).

2.3.22. Diğer ilaçlar

Teofilin (81), L-dopa, klonidin, kondroitin sülfat, kumaral ve hyalürinidaz kırık iyileşmesini artırır (20,28,29). Bazı etken maddeler ise doza bağlı olarak kırık iyileşmesi üzerine etki ederler. Örnek olarak indometazin yüksek dozlarda kırık iyileşmesini baskılar (20,28,29). Nitrik oksit ise bazal düzeyde kırık iyileşmesini artırırken yüksek dozlarda azaltır (82).

2.4. Keten Tohumu Yağı

2.4.1. Genel özellikleri

KTY, latince çok faydalı iplik anlamına gelen *Linum usitatissimum* olarak bilinir. Keten bitkisi 300 tür ve 13 cinsi kapsayan *Linaceae* familyasına ait bir bitkidir. *Linum* cinsinin ise tek ve çok yıllık türleri olup dünyada bu sayı 100, ülkemizde 38'dir. Lif ve yağ üretiminde kullanılır. Yağ elde edilen formu kısa boylu olan türüdür (83).

Keten tohumları, protein ve yağ açısından zengin olup, yağ oranı %35 ile %45 arasındadır. KTY, çoklu doymamış yağ asidi olup esas yağ bileşeni alfa-linolenik asittir. Ayrıca omega-3 ve lif açısından zengindir (83,84).

KTY, Mısır, Yunan ve Romalılarda tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Tarihte ve günümüzde laksatif, antiinflatuar, kaşıntıya karşı ofisinal olarak, apse de ağrının azaltılmasında, lupus nefritis tedavisinde, hiperlipidemili hastalarda aterojenik riski azaltmada, obez bireylerde arteriyel fonksiyonları geliştirmede kullanılmıştır (84).

Keten bitkisinden izole edilen flavanoit sayısı 17 olup bunların çoğunluğu C-glikozil flavanoittir. İzole edilen antosiyan sayısı ise 18'dir. Müsilajın majör bileşeni olarak galaktoz, ksiloz, ramnoz, galakturonik asit ve minör olarak da glukoz, arabinoz izole edilmiştir. Ayrıca linustatinaz ve linamaraz olmak üzere iki enzim izole edilmiştir (84).

2.4.2. Antimikrobik etki

KTY'nin kloroform ve hekzan ile karışımı sonrası ve içerdiği alfa-linolenik asitin anti mikrobik etkileri bulunur (83,84).

2.4.3. Antikarsinojenik etki

Günümüzde kronik hastalık ve kanser gelişiminde diyetin en önemli çevresel faktör olduğu düşünülmekte olup kolon kanserinde yüksek lif ve düşük yağlı diyetlerin riski azalttığı belirtilmiştir. Keten tohumunda yer alan lignanların özellikle sekoizolarisirezinol diglukozitin antioksidan ve hormonal etkileri vardır. İnsan barsağında enterodiol ve enterolakton bileşiklerine dönüşerek antikarsinojenik etki gösterir (83,84).

2.4.4. Antioksidan etki

KTY içerisinde izole edilen herbasetin ve herbasetin-3,8-O-diglukopiranozitin aglikonun KTY'nin antioksidan aktivite basamağıdır (84).

2.4.5. Antiaterosklerotik ve antihiperlipidemik etki

Omega-3 yağı içeriğinin bir somon balığı kadar fazla olan KTY, kalp sağlığı ve hormonal nedenlerle oluşan kanserlerde koruyucudur (83). Yüksek doz KTY'nin karaciğerde depo kolesterol ve kolesterol esteri miktarını, LDL kolesterol seviyesini, kan trigliserit düzeyini ve serum total kolesterol seviyesini azaltmaktadır (84). Yine tavşanlarda yapılan deneylerde, aterosklerotik plaklarda %73 oranında azalma göstermiştir (85).

KTY'nin, alkolik karaciğer üzerine etkilerinin incelendiği bir deneysel çalışmada, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β azalmasına bağlı olarak anormal derecede yüksek olan AST ve ALT değerlerini azaltmıştır (86).

2.4.6. Endüstriyel kullanımı

KTY, kuruyan yağlardan olma özelliğinden dolayı sabun, boya, matbaa mürekkebi, muşamba, cila, cam macunu, vernik, dokumacılık ve ipek sanayisinde kullanılmaktadır (83).

2.4.7. Kemik yoğunluğu üzerine etkisi

KTY'nin, sıçanlarda kemik özellikleri üzerine etkisinin deneysel olarak incelenmesinde, KTY'den izole edilen sekoizolarisirezinol diglukozitin olumlu etkileri tespit edilmiştir. Elde edilen bu verilerle, KTY'nin özellikle kemik yoğunluğuna pozitif etkisi vurgulanmıştır (87).

2.4.8. Hematolojik etkileri

Hemodiyaliz hastalarında, renal anemi ciddi bir komplikasyondur. 38 hemodiyaliz hastasından oluşan bir seride, KTY'nin hematolojik etkileri araştırılmış. KTY'nin hepcidin konsantrasyonunu ciddi derecede azalttığı, hemoglobin, hematokrit, MCHC, MCH ve RBC değerlerini ise artırdığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (88).

2.4.9. Diğer etkileri

KTY, kozmetikte de kullanılmaktadır. Ciltte özellikle antioksidan, hücre yenileme etkisi, ultraviyole ışınlarından koruma ve antiinflamatuvar olarak kullanılan moleküllerle beraber kullanılmaktadır (84).

Sıçanlarda arsenik trioksitin oluşturduğu kardiyotoksositeye karşı doğal bir molekül olan KTY'nin kardiyoprotektif etkisini değerlendirmek için yapılan bir deneyde, KTY'nin olumlu etkileri saptanmıştır. Arsenik trioksitin lösemi türlerinde tedavi amacıyla kullanıldığı, bu molekülün kardiyak dokularda patolojik etkilerinin KTY ile azaldığı bildirilmiştir (89).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

KTY'nin sıçanlarda kırık iyileşmesi üzerine etkisini araştırmak için deneysel çalışma planlandıktan sonra Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu'ndan 24/01/2018 tarih ve 2018/6 karar no ile hayvan deneyi etik kurul onayı alındı. Üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nden TTU-2018-838 nolu proje ile çalışma desteği alındıktan sonra Nisan-Haziran 2018 tarihleri arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çalışma yürütüldü.

Çalışmada ortalama ağırlığı 280-340 ±15 gr olan 64 adet Sprague-Dawley cinsi erkek erişkin sıçanlar kullanıldı. Çalışma grupları rastgele oluşturuldu. Her grupta sekiz sıçan olacak şekilde kafeslerde ayrıldı. Kafesleri üzerine grupları belirten etiketlendirme yapıldı (Şekil 5).



Şekil 5 : Oluşturulan grup ve alt gruplar aynı koşullarda farklı kafeslerde çalışmaya alındı.

Sıçanlar, laboratuarda optimal koşullarda, 22⁰C sıcaklık, %55-60 nem ve kontrollü ışık olarak tanımlanan 12 saat aydınlık/12 saat karanlık olacak şekilde tutuldu. Sıçanlar deney boyunca tek tip yem ve uygun kaynak suyu ile beslendi. KTY, sıçanlara oral yoldan verildi.

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışma grupları tabloda belirtildiği şekilde oluşturuldu. (Tablo 1)

Tablo 1 : Çalışma grupları

Grup 1 (n=8)	Sağlıklı kontrol grubu	
Grup 2 (n=24) Femoral kırık grubu	Grup 2a (n8)	Femoral kırık ve 2. hafta
	Grup 2b (n8)	Femoral kırık ve 4. hafta
	Grup 2c (n8)	Femoral kırık ve 6. hafta
Grup 3 (n=24) Femoral kırık ve KTY verilen grup	Grup 3a (n8)	Femoral kırık+ KTY ve 2. hafta
	Grup 3b (n8)	Femoral kırık+ KTY ve 4. hafta
	Grup 3c (n8)	Femoral kırık+ KTY ve 6. hafta
Grup 4 (n=8)	Sağlıklı ve KTY verilen grup	

3.2. Anestezi

Deneylerde kullanılan sıçanlara işlem öncesi profilaktik antibiyoterapi amaçlı 50 mg /kg sefazolin sodyum (Cezol 1 g 1m/1v 1 flakon Deva İlaç A.Ş. İstanbul, Türkiye) intraperitoneal olarak verildi. Operasyon anestesizi olarak ketamin hidroklorit (Ketalar®, 50 mg/kg, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve sedatif olarak ksilazin hidroklorid (Rompun®, 10 mg/kg, Bayer, ABD) intraperitoneal olarak uygulandı. Anestezi uygunluğu, sıçan derisine uygulanan sıkıştırmaya sıçanların verdiği yanıtı göre değerlendirildi. İşlem sonrası analjezik olarak Sanofi-Aventis'den metamizol sodyum (Novalgine 1g/2 ml IM/IV ampul) verildi.

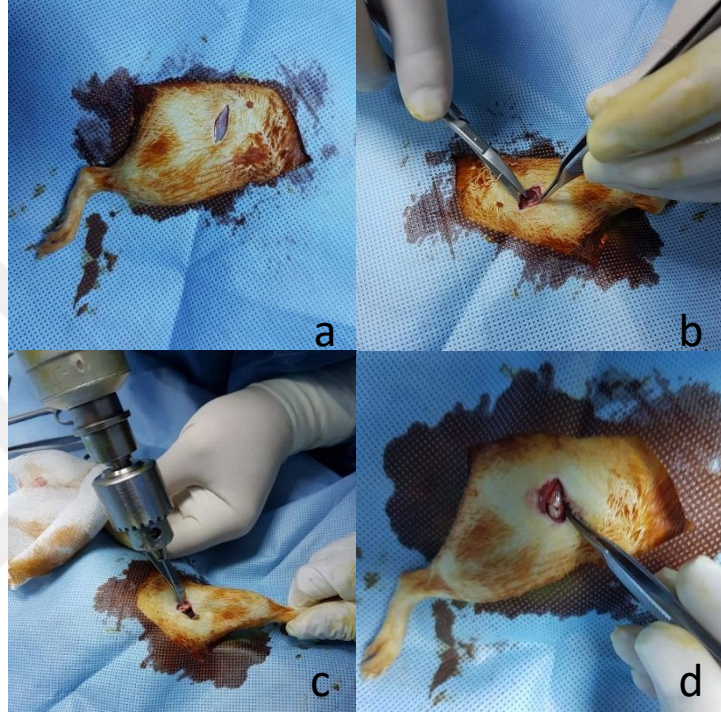
3.3. Kırık Modeli Oluşturulması ve Tespit Şekli

Anestezi sağlandıktan sonra işlemin uygulanacağı cilt bölgesi traş edildi. %10 povidon iyot çözeltisi (Poviiodeks %10 1000 mL, Kimpa Fatih, İstanbul) ile operasyon sahası boyandı ve steril delikli örtü ile örtüldü (Şekil 6).



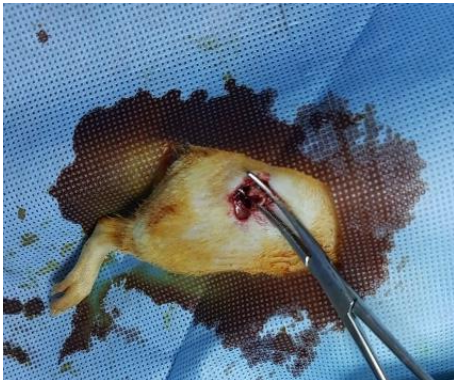
Şekil 6 : Steril koşullarda, delikli steril örtü kullanılarak işlemler öncesi hazırlık yapıldı.

Sağ uyluk lateral orta kısımdan, cilt ve cilt altını içeren yaklaşık 1 cm'lik insizyonla girildi. (Şekil 7a) Künt diseksiyonla vastus lateralis kası anteriore kaldırıldı. (Şekil 7b) Femur diafiz bölgesi ortaya kondu. 0.5 mm'lik kirschner teli kullanılarak önce lateralden mediale, sonra lateral giriş yeri kullanılarak anteriore ve posteriore transverse hatta delikler açıldı. Sonra üç nokta bükme prensibi ile femur diafiz kırığı oluşturuldu. (Şekil 7c,d)



Şekil 7 : İnsizyon ve kırık oluşturulması, a) Cilt insizyonu, b) Cilt altı diseksiyon, c) Kırık modeli oluşturulması, d) Kırık sonrası görünüm

Femur medullasından proksimale doğru kirschner teli intramedüller olarak yerleştirildi. (Şekil 8) Kırık redükte edildikten sonra cilt dışına çıkan kısmı kullanılarak distale intramedüller olarak kırık distaline yerleştirilerek kırık tespit edildi. (Şekil 9) İnsizyon hattı, 4/0 ipek suture ile primer suture edildi. (Şekil 10)



Şekil 8 : Proksimal kırık fragmanının, intramedüller tespit için hazır hale gelmesi



Şekil 9 : Proksimal parçadan, K telinin intramedüller olarak geçmiş hali



Şekil 10 : İntramedüller tespit sonrası femurun görünümü

3.4. Keten Tohumu Yağı'nın Uygulanması

Sağlıklı ve KTY verilen grup 4 ile kırık oluşturulan ve kırık sonrası KTY verilen grup 3'e işlemden 1 gün sonra oral olarak 1000mg/kg KTY verildi. Analjezik olarak metamizol sodyum, ilk üç gün intraperitoneal olarak yapıldı. İnsizyon sahası günlük batikon solüsyonu ile pansuman edildi.

3.5. Deneyin Sonlandırılması

İki, dört ve altıncı haftalarda KTY verilen ve kontrol grubu sıçanlara 50 mg/kg ketamin hidroklorit ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid intraperitoneal uygulanarak anestezi sağlandı. Sıçanlardan kan örnekleri alındı. Uygun tüplere alınarak laboratuvara yollandı. Sıçanlar ötenazi edildi. Femur röntgenleri çekildi. Kemik doku örneği alındı. Tam kan örnekleri 4000 RPM'de, 10 dakika, +4°C'de santrifüj edildi ve serum örnekleri -80 °C'de, histopatolojik analiz için ise ilgili doku % 10 formalin içine alınarak depolandı. Böylece deneyler sonlandırılmış oldu. Histolojik, biyokimyasal ve radyolojik değerlendirme sürecine geçildi.

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

3.6.1. Radyolojik değerlendirme

Femur radyografileri, x-ışını tüpü kasete 29 cm olacak şekilde ekstremitelere dozunda çekildi. Kırık kontrol ve kırık sonrası KTY verilen grupların radyografileri değerlendirildi. Radyografik değerlendirmede 5 noktalı radyografik skorlama sistemi kullanıldı (90). (Tablo 2)

Tablo 2 : Beş noktalı radyolojik skorlama sistemi

0 değeri	İyileşmesi olmayan
1 değeri	Kallus oluşumu olan ancak başka iyileşme bulgusu olmayan
2 değeri	Kallus oluşumu ve kırık uçları arasında köprüleşmesi olan ancak kırık hattı belirgin olan
3 değeri	Kallus ve köprüleşmesi olan kırık hattı görünmeyen
4 değeri	Tam kaynama olan

Radyolojik verilerin analizi Mann-Whitney testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2. Biyokimyasal değerlendirme

Elde edilen serum örneklerinden manuel olarak MDA ve GSH analizleri yapıldı. MDA ve GSH değerleri dökümanete edildi.

Biyokimyasal verilerin istatistiksel analizi Kruskal wallis testi, Mann-Whitney testi, One Way Anova testi ve Post-Hoc LSD analizi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.3. Histolojik değerlendirme

3.6.3.1. Histopatolojik analiz prosedürü

Sıçanların femurdan elde edilen kemik doku materyalleri 10%'luk formalin ile 48 saat boyunca fikse edildi. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fiksasyon işleminin ardından Morse's solusyonunda 48 saat boyunca dekalsifikasyon işlemi uygulandı. Dekalsifikasyon işlemini takiben kemik dokusu örnekleri, artan etil alkol serileri (Merck, Darmstadt, Germany) ve ksilol (Merck, Darmstadt, Germany) ile mordanlandıktan sonra

sert ve yumuşak parafin (Merck, Darmstadt, Germany) inklüzyonu yapılarak bloklandı. Parafin bloklarından mikrotom (Leica, RM2125RT, Germany) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kemik dokusu kesitlerine, hematoxilen (Harris hematoxilen, Merck, Germany) ve Eosin (H&E) (Eosin G, Merck, Germany) boyaları uygulandı. Preparatlar, ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) incelendi. Gözlemlenen bulgulara ait fotoğraflar, Olympus DP71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) fotoğraf makinası ile çekildi.

3.6.3.2. İmmunohistokimyasal Analiz Prosedürü

Çalışmamızda kemik rejenerasyon biyobelirteçleri olan osteopontin (rabbit polyclonal, ab63856, abcam, İngiltere) ve osteokalsin (rabbit polyclonal, ab125227, abcam, İngiltere) primer antikorlarını içeren immunohistokimya kitlerini kullandık. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT, Germany) ile kesilen 1-3 µm'lik kesitler, pozitif şarjlı lamalar (Patolab, China) üzerine alındı. Bir sonraki aşamada kesitler 10 dakika boyunca %3'lük H₂O₂ solusyonunun ardından 15 dakika boyunca sekonder blok solusyonunda inkube edildi. Kesitler, endojen peroksidaz işleminin ardından primer antikor solusyonları ve ardından sekonder antikor solusyonunda 60 dakika boyunca inkube edildi. Son olarak görüntüleme için diaminobenzidine chromogen solusyonunda inkube edildikten sonra dokular Harris Hematoxilen ile (Merck, Darmstadt, Almanya) boyandı.

3.6.3.3. Semi-Kantitatif Analiz

H&E boyalı femur kemik dokusuna ait preparatlarda gözlemlenen histopatolojik değişiklikler Huo ve arkadaşlarının histopatolojik kemik iyileşmesi skorlama metoduna göre Tablo 3'de gösterildiği gibi skorlandı (91). Bu skorlama metodunda, her bir preparat da çakışma olmayacak şekilde, her bir preparatta rastgele belirlenmiş on farklı alan iki bağımsız histopatolog tarafından kör bir şekilde yapıldı. Histopatologlar, çeşitli deney gruplarının içeriklerinden, doku takip çalışmaları ve histopatolojik derecelendirmeler tamamlanmaya kadar haberdardı. Histopatolojik preparatlarını sınıflandıran araştırmacı da tedavi grupları için körleştirildi.

Tablo 3. Huo ve arkadaşlarının Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru (HKİS)

Skor	Bulgu
1	Fibroz doku

2	Esas olarak fibröz doku ve az miktarda kıkırdak dokusu
3	Eşit miktarda fibröz ve kıkırdak dokusu
4	Ağırlıklı olarak kıkırdak dokusu
5	Esas olarak kıkırdak dokusu ve küçük miktarlarda olgunlaşmamış (dokunmuş) kemik eşit
6	Eşit miktarda kıkırdak dokusu ve olgunlaşmamış kemik
7	Önemli olgunlaşmamış kemik ve küçük miktarlarda kıkırdak
8	Tamamen olgunlaşmamış kemik
9	Olgunlaşmamış kemik ve az miktarda olgun kemik
10	Olgun (lamellar) kemik

Osteopontin ve osteokalsin pozitivitesi gösteren kemik dokularının değerlendirilmesi Tablo 4’de gösterildiği gibi analiz edildi. İmmun pozitif kemik dokularının skorlaması, her bir preparatta 15 farklı alan olacak şekilde iki kör histopatolog tarafından değerlendirildi.

Tablo 4 : İmmunohistokimyasal pozitivite skorlaması.

Yüzde	Açıklama	İmmunohistokimyasal pozitivite Skoru
<%5	Yok	0
<%5-25	Hafif	(+)
<%25-50	Orta	(++)
>%50	Şiddetli	(+++)

3.6.3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda tüm veriler, SPSS 18.0 (IBM, Armonk, NJ, USA) istatistik programı kullanılarak hesaplandı. Semikantitatif analizler sonucu elde edilen veriler, maksimum ve minimum değerler göz önüne alınarak median±standart sapma şeklinde hesaplandı. Gruplar arasındaki farklar kullanılarak non-parametrik Kruskal Wallis testi ve bunu takiben bir Tamhane testi uygulanarak analizler yapıldıktan sonra, grupların sayısal verileri analize tabi tutuldu (P değeri <0.05 anlamlı olarak seçildi).

4. BULGULAR

4.1. Radyolojik Bulgular

2. hafta KTY verilen grupta tüm sıçanlarda kırık hattında radyolojik olarak kallus ve köprüleşme mevcut idi. 3 sıçanda kırık hattı belli belirsiz seçilmekteydi 5 sıçanda kırık hattı belirgin bir şekilde görülmekte idi (Şekil 11). 2. hafta kontrol grubunda tüm sıçanlarda kırık hattı belirgin olarak seçilmekteydi. İki sıçanda köprüleşme oluşmamıştı ve kontrol grubunda tüm deneklerde kallus oluşumu mevcut idi (Şekil 12).



Şekil 11 : 2. hafta kırık+KTY grubu



Şekil 12 : 2. hafta kırık kontrol grubu

4. hafta KTY verilen grupta tüm sıçanlarda kırık hattında radyolojik olarak kallus ve köprüleşme mevcut idi. 2 sıçanda kırık hattı belli belirsiz seçilmekte idi. Kalan 6 sıçanda ise radyolojik olarak tam kaynama görüldü. (Şekil 13) 4. hafta kontrol grubunda tüm sıçanlarda kallus ve köprüleşme mevcut idi. 4 sıçanda kırık hattı belli belirsiz seçilmekte idi. (Şekil 14) Diğer 4 sıçanda ise radyolojik olarak tam kaynama görüldü.



Şekil 13 : 4. hafta kırık+KTY grubu



Şekil 14 : 4.hafta kırık kontrol grubu

6. hafta KTY verilen grupta radyolojik olarak 1 sıçanda kırık hattında belli belirsiz seçilmekte idi. Gruptaki diğer 7 sıçanda ise radyolojik olarak tam kaynama görüldü. (Şekil 15) 6. hafta kontrol grubunda tüm sıçanlarda kırık hattı kallus ve köprüleşme mevcut idi. 4 sıçanda kırık hattı belli belirsiz seçilmekte idi. Diğer 4 sıçanda ise radyolojik olarak tam kaynama görüldü. (Şekil 16) Radyolojik değerlendirme sonucu tablo 5 de verilmiştir.



Şekil 15 : 6. hafta kırık+KTY grubu



Şekil 16 : 6. hafta kırık kontrol grubu

Tablo 5: Radyolojik değerlendirme verileri

	Grup 2a	Grup 3a	Grup 2b	Grup 3b	Grup 2c	Grup 3c
Sıçan 1	1	2	3	3	4	4
Sıçan 2	2	3	3	4	3	4
Sıçan 3	2	2	3	4	3	4
Sıçan 4	2	2	3	4	3	4
Sıçan 5	1	2	4	4	4	4
Sıçan 6	2	3	4	4	4	3
Sıçan 7	2	2	4	3	4	4
Sıçan 8	2	3	4	4	3	4

2. hafta KTY verilen grup ve kontrol grupları radyolojik verileri için Mann-Whitney testi uygulandı. Test sonrası 2. hafta KTY verilen grup ve kontrol grubu arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. (p=0,029)

4. hafta KTY verilen grup ve kontrol grupları radyolojik verileri için Mann-Whitney testi uygulandı. Test sonucu 4. hafta KTY verilen grup ve kontrol grubu arasındaki farkın, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. (p=0,143)

6. hafta KTY verilen grup ve kontrol grupları radyolojik verileri için Mann-Whitney testi uygulandı. Test sonucu 6. hafta KTY verilen grup ve kontrol grubu arasında, istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı anlaşılmıştır. (p=0,117)

4.2. Biyokimyasal Bulgular

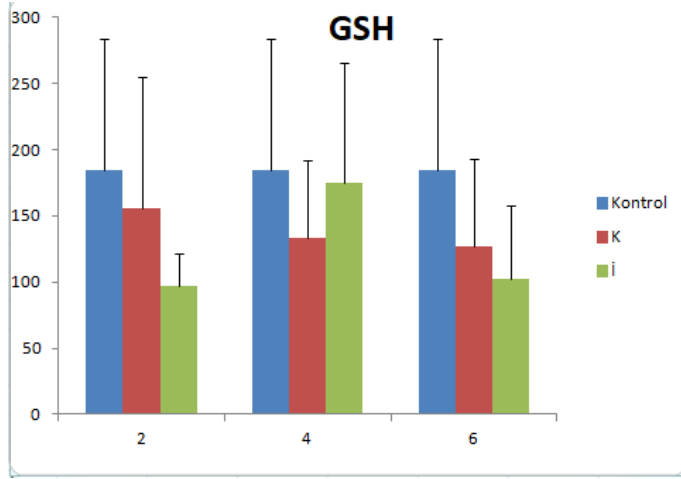
Tüm grupların GSH ve MDA sonuçları Tablo 6’de verildi.

Tablo 6 : Biyokimyasal analiz sonuçlarının gruplara göre dağılımı

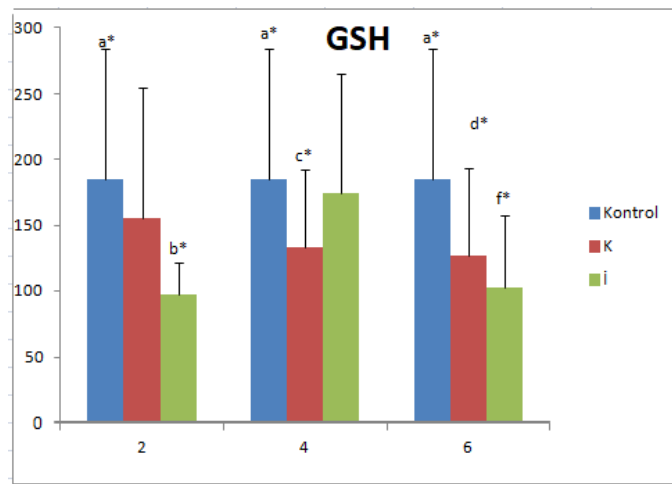
Çalışma Grupları	GSH (nmol/mL)	MDA(nμ/mL)
Kontrol	184 (223)	73±4,4
2 haftalık kırık kontrol grubu	156 (95)	67±3
2 haftalık KTY verilen grup	97(25)	50±0,13

4 haftalık kırık kontrol grubu	133(59)	65±3,5
4 haftalık KTY verilen grup	175(90)	65±3,5
6 haftalık kırık kontrol grubu	127(66)	69(11,5)
6 haftalık KTY verilen grup	102(56)	70(5,25)

Tedavi ve kontrol gruplarında GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı şekil 17’de verildi. Ayrıca GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel karşılaştırılması şekil 18’de verildi.



Şekil 17 : GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı



a* ile b*, a* ile c*, a* ile d* ve f*, p<0,05.

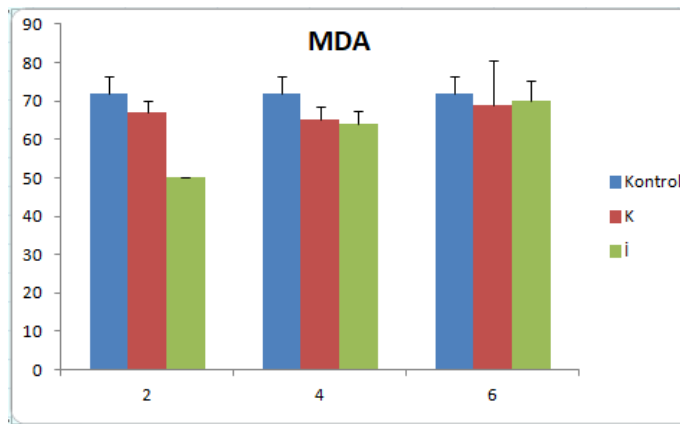
Şekil 18 : GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel olarak karşılaştırılması

Çalışma gruplarının GSH miktarları analiz edildiğinde sağlıklı kontrol, 2 haftalık kırık kontrol ve 2 haftalık KTY verilen grupların sonuçları Kruskal wallis testine ($p=0,008$) göre değerlendirildi. Gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi. Ardından yapılan Mann-Whitney testi sonucuna göre kontrol grubu ile 2 haftalık KTY verilen gruplar ($p=0,03$) arasında anlamlı bir farklılık olduğu sonucuna varıldı.

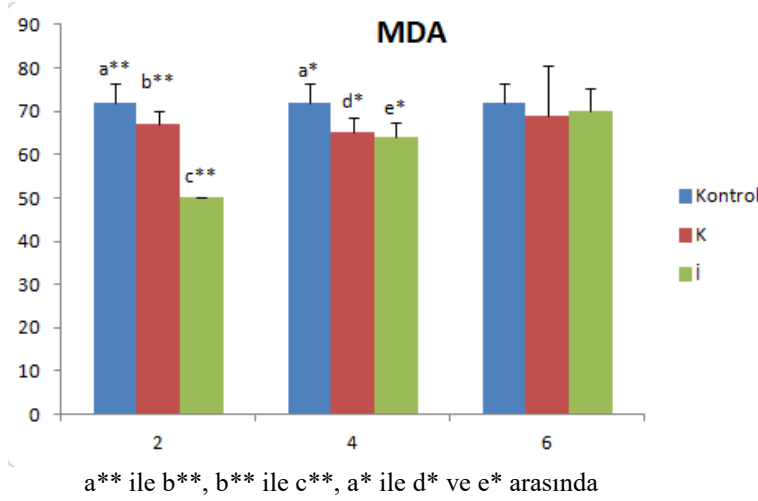
Sağlıklı kontrol, 4 haftalık kırık kontrol ve 4 haftalık KTY verilen grupların GSH miktarları analiz edildi. Kruskal wallis testine ($p=0,045$) göre değerlendirildi. Gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi. Ardından yapılan Mann-Whitney testi sonucuna göre kontrol grubu ile 4 haftalık kırık kontrol grupları ($p=0,06$) arasında anlamlı bir farklılık olduğu sonucuna varıldı.

Sağlıklı kontrol, 6 haftalık kırık kontrol ve 6 haftalık KTY verilen grupların GSH miktarları analiz edildi. Kruskal wallis testi sonucuna ($p=0,008$) göre gruplar arasında bir farklılık olduğu tespit edildi. Ardından yapılan Mann-Whitney testi sonucuna göre kontrol grubu ile 6 haftalık kırık kontrol grubu ($p=0,03$) ve 6 haftalık KTY verilen ($p=0,021$) grup arasında anlamlı bir farklılık olduğu sonucuna varıldı.

Tedavi ve kontrol gruplarında MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı Şekil 19’de verildi. Ayrıca MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel karşılaştırılması Şekil 20’de verildi.



Şekil 19 : MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 20 : MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel olarak karşılaştırılması

Çalışma gruplarının MDA miktarları analiz edilmiş ve sağlıklı kontrol grubu ile 2 haftalık kırık kontrol ve 2 haftalık KTY verilen grupların sonuçları arasında, One Way Anova testine ($p=0,00$) göre anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi. Post-Hoc LSD analizi yapıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi.

Sağlıklı kontrol, 4 haftalık kırık kontrol ve 4 haftalık KTY verilen grupların MDA miktarları analiz edildi. One Way Anova testi sonucuna ($p=0,012$) göre anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi. Post-Hoc LSD analizi yapıldığında sağlıklı kontrol grubu ile 4 haftalık kırık kontrol ($p=0,035$) ve 4 haftalık KTY verilen ($p=0,03$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi.

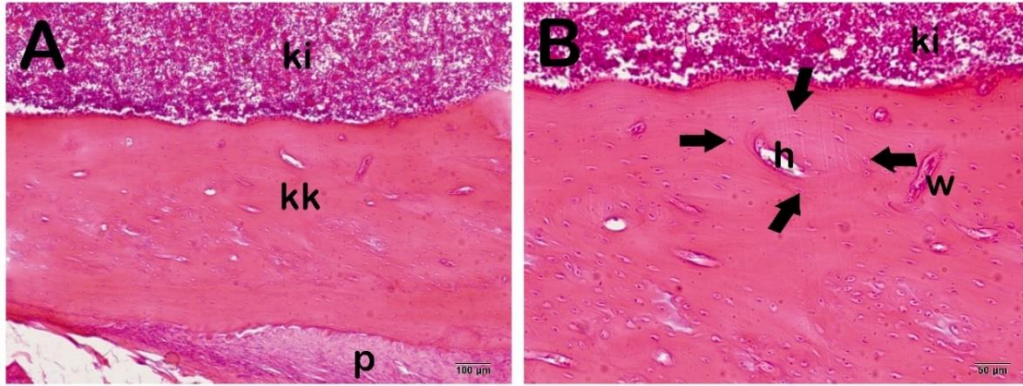
Sağlıklı kontrol, 6 haftalık kırık ve 6 haftalık KTY verilen gruplar arasında MDA miktarları analiz edildi. Kruskal wallis testi sonucuna ($p=0,543$) göre gruplar arasında bir fark olmadığı sonucuna varıldı.

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Kontrol grubuna ait bulgular

Kontrol grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde, femur kemik dokusunun normal yapıda olduğunu gözlemledik. Havers kanalı etrafında lamellaları

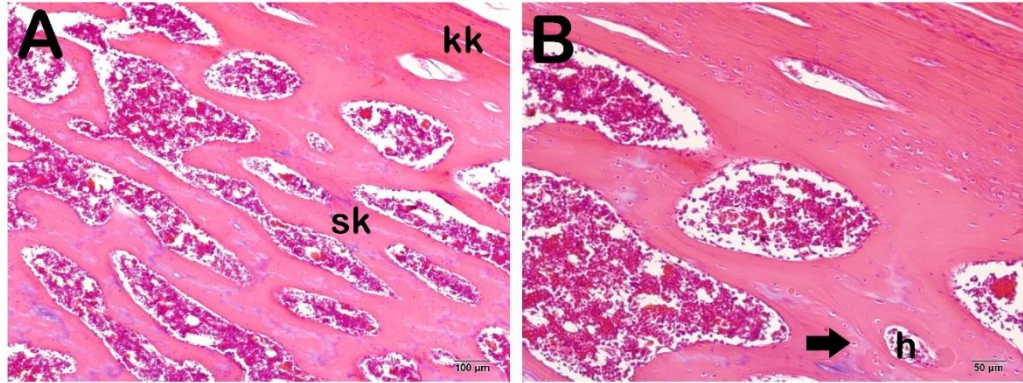
oluşturan osteositlerin, tipik yapıda olduğu gözlemledik. Bunun yanında periosteum ve Volkmann kanalları normal yapıda olduğunu izledik. (Şekil 21)



Şekil 21 : Kontrol grubu femur kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. (Havers kanalı (h) etrafında osteositlerin (ok) oluşturduğu lamellaların normal yapıda olduğu izlenmekte (HKİS: 10.00 ± 0.35). Kemik iliği (ki). Kompakt kemik (kk). Periosteum (p). H&E boyaması.)

4.3.2. Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait bulgular

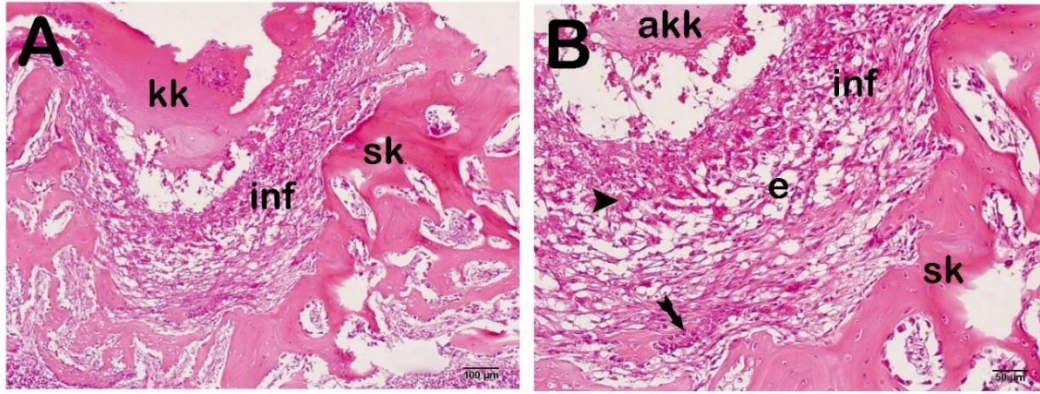
Sağlıklı ve KTY verilen grup femur kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsünde normal lamellar yapılar görülmektedir (Şekil 22)



Şekil 22 : Sağlıklı ve KTY verilen grup femur kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Havers kanalı (h) etrafında osteositlerin (ok) oluşturduğu lamellaların normal yapıda olduğu izlenmekte (HKİS: 10.00 ± 0.35). Kemik iliği (ki). Kompakt kemik (kk). Periosteum (p). H&E boyaması.

4.3.3. Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait bulgular

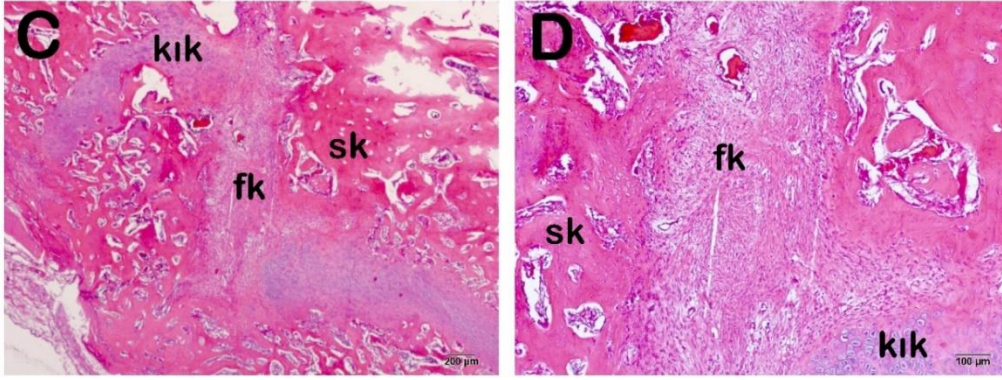
Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde, yaygın ödematoz alanlar ve yoğun infiltrasyon olduğunu izledik. Bunun yanında nekrotik osteositler mevcuttu. Yer yer osteoblastik aktivite gözlemlemekle beraber kırık dokusu gözlenmemesi dikkat çekiciydi (Şekil 23 A-B)(HKİS: 1.00±0.35).



Şekil 23 : Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. (Kırık bölgesinde ödematoz (e) alanlar ve yoğun infiltrasyon (inf) izlenmekte. Osteoblastik aktivasyon gösteren hücreler (kuyruklu ok). Nekrotik osteositler (ok başı). Nekrotik atipik kompakt kemik (akk). Kompakt kemik (kk). Süngerimsi kemik (sk) (HKİS:2.00±0.54). H&E boyaması.)

4.3.4. Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait bulgular

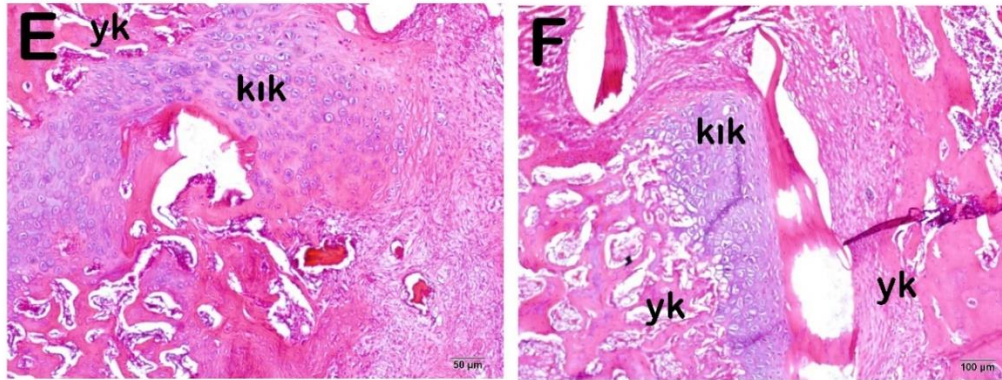
Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde, kırık bölgesinde yaygın kırık dokusu (kık) ve fibröz kallus (fk) yapısı izlenmekte (Şekil 24 C-D)(HKİS: 5.00±0.84).



Şekil 24 : Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü.(Kırık bölgesinde yaygın kıkırdak kallus (kık) ve fibröz kallus (fk) yapısı izlenmekte. Süngerimsi kemik (sk). (HKİS: 5.00±0.84). H&E boyaması.)

4.3.5. Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait bulgular

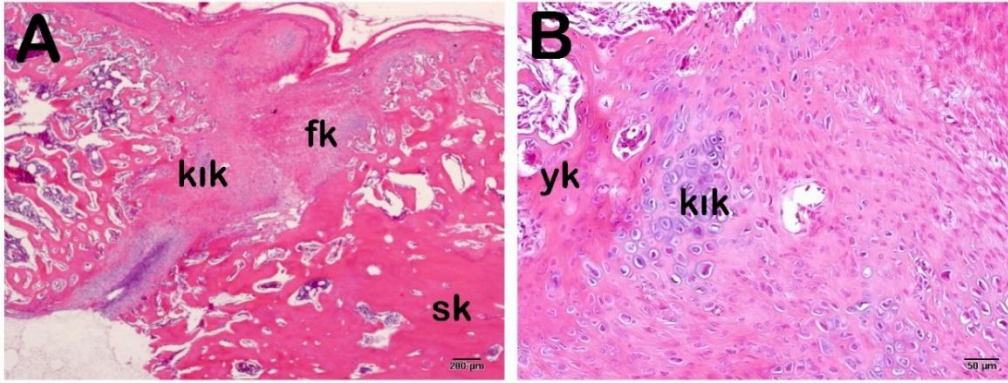
Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde, kırık bölgesinde yaygın kıkırdak kallus (kık) yapısını gözlemledik. Bunun yanında lamellasız yeni kemik oluşumları gözledik. (Şekil 25 E-F)(HKİS:5.00±0.84).



Şekil 25 : Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. (Kırık bölgesinde yaygın lamellasız yeni kemik dokusu ve kıkırdak kallus (kık) yapısı izlenmekte. (HKİS: 5.00±0.84). H&E boyaması.)

4.3.6. Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna ait bulgular

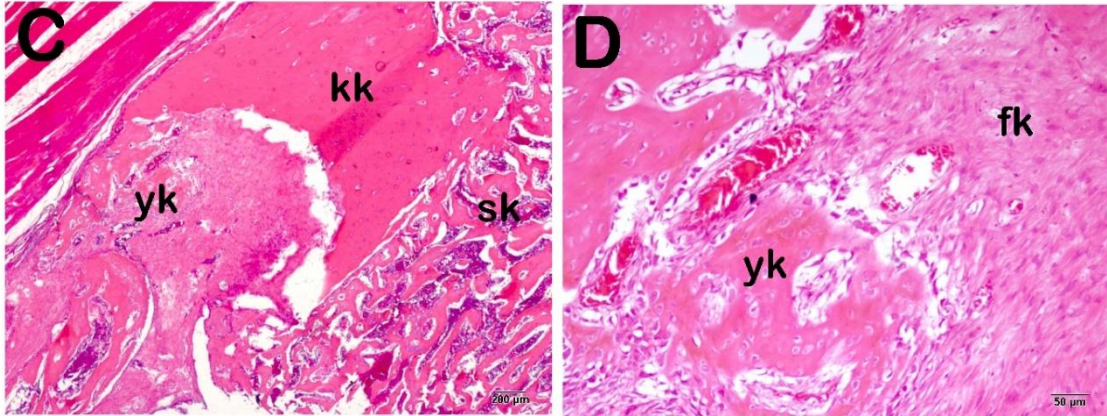
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde, kırık bölgesinde yaygın kıkırdak kallus ve fibröz kallus yapısını gözlemledik. Bunun yanında az miktarda lamellasız yeni kemik oluşumları gözledik. (Şekil 26 A-B)(HKİS: 3.00±0.54).



Şekil 26 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. (Kırık bölgesinde yaygın fibröz kıkırdak (fk) ve kıkırdak kallus (kık) yapısı izlenmekte. Yer yer yeni kemik dokusu oluşumu gözlenmekte (yk).süngerimsi kemik (sk). (HKİS: 3.00±0.54). H&E boyaması.)

4.3.7. Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna ait bulgular

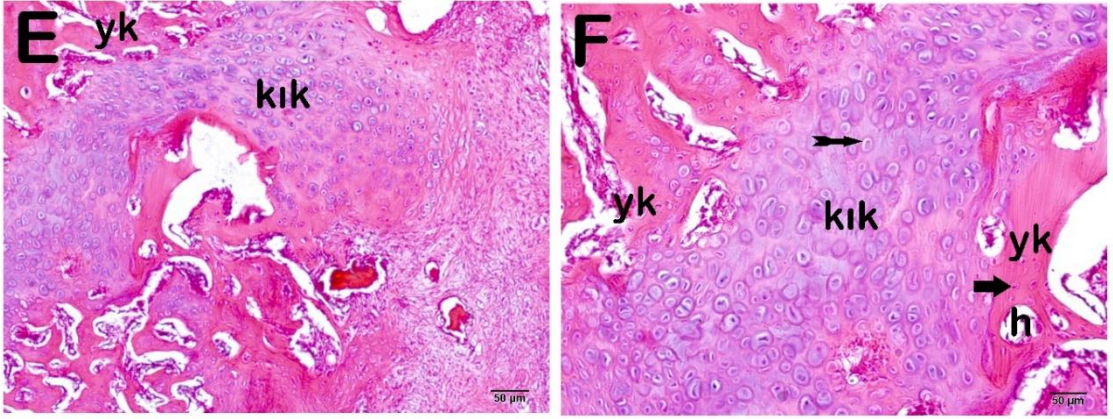
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde, kırık bölgesinde yaygın kıkırdak kallus, fibröz kallus ve lamellasız yeni kemik oluşumları gözledik. (Şekil 27 C-D)(HKİS: 4.50±0.99).



Şekil 27 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. (Kırık bölgesinde yaygın fibröz kıkırdak (fk), kıkırdak kallus (kık) yapısı ve yeni kemik dokusu oluşumu gözlenmekte (yk). Kompakt kemik (kk). Süngerimsi kemik (sk). (HKİS:4.50±0.99). H&E boyaması.)

4.3.8. Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna ait bulgular

Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde, kırık bölgesinde yaygın kıkırdak kallus, fibröz kallus ve lamellasız yeni kemik oluşumları gözledik. (Şekil 28 E-F)(HKİS: 7.00±0.53).



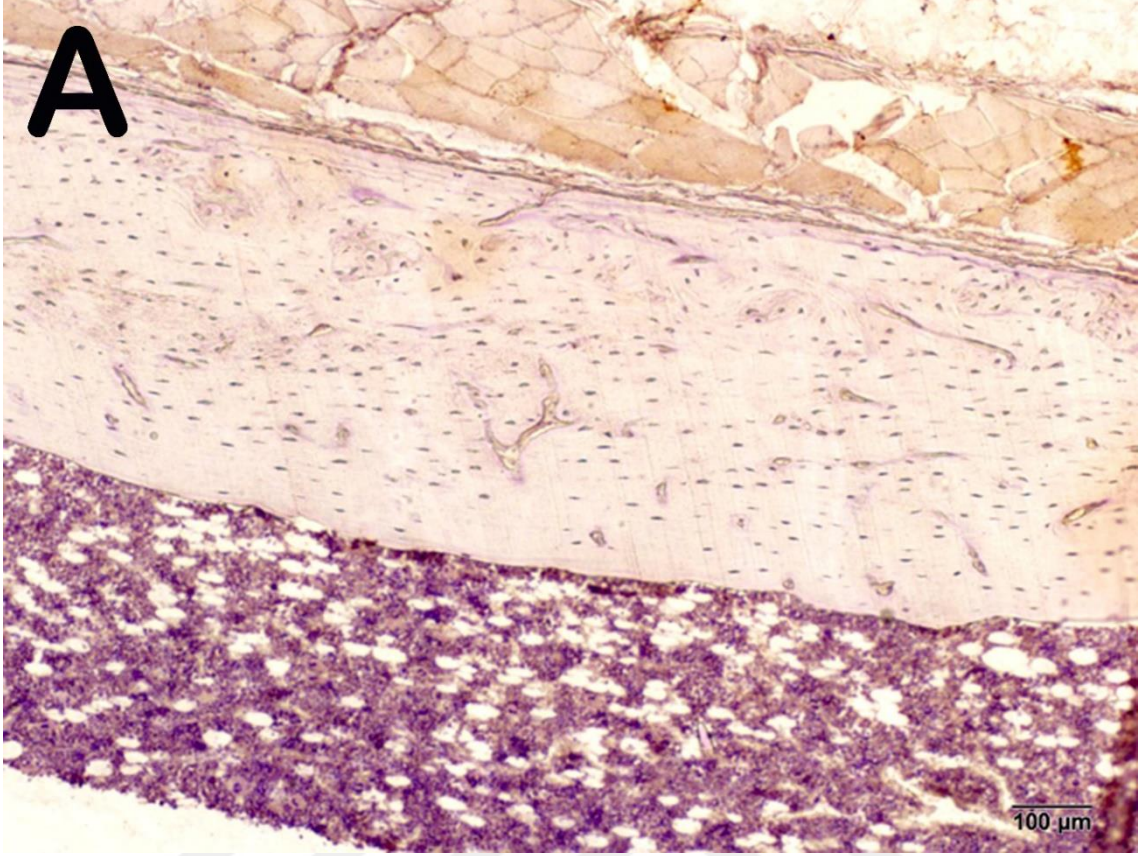
Şekil 28 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubu kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Kırık bölgesinde yaygın kıkırdak kallus ve lamellasız yeni kemik oluşumları gözlenmekte. (Resim 5E-F)(HKİS: 7.00 ± 0.53).

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.4.1. Osteopontin

4.4.1.1. Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

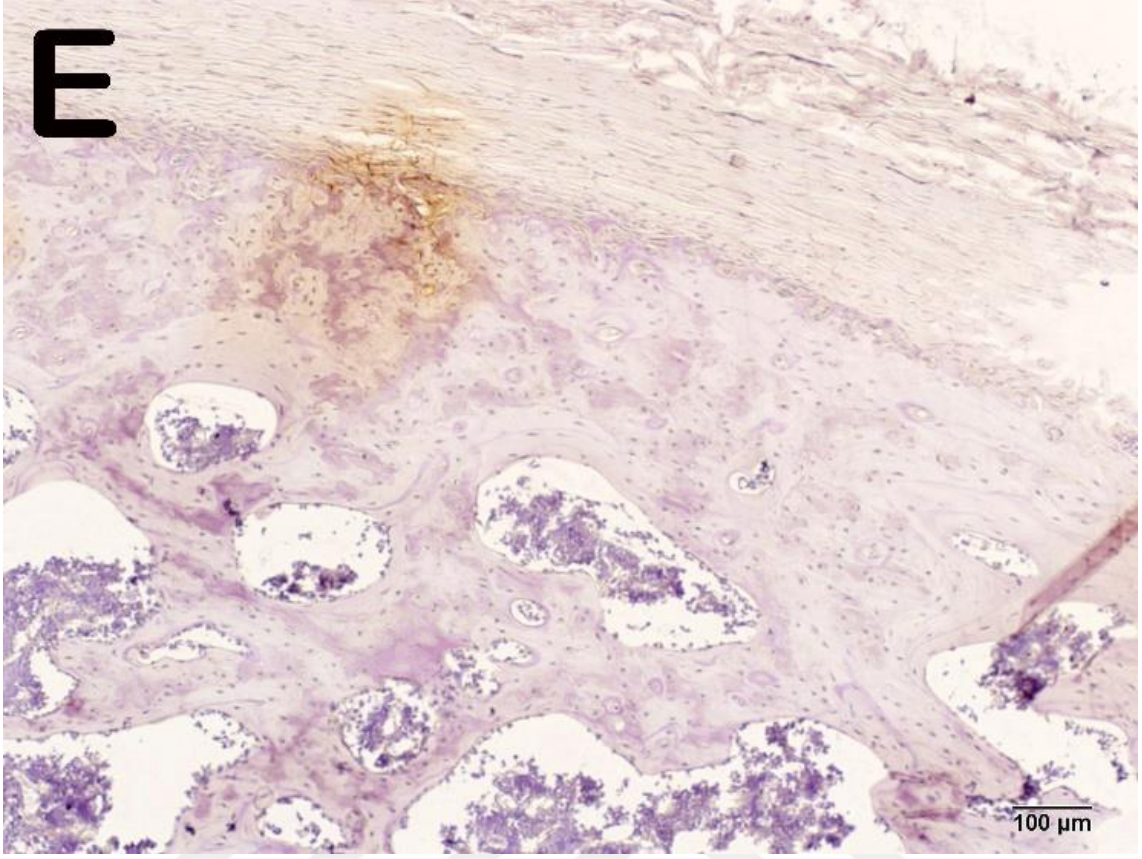
Kontrol grubuna ait femur kesitlerinde kemik dokusunun normal yapıda olduğunu gözlemledik (Osteopontin pozitivite skoru: 0.00 ± 0.46 ; Şekil 29).



Şekil 29 : Kontrol grubuna ait femur kesiti. (Normal yapıdaki kemik dokusu izlenmekte, x10 (Osteopontin pozitivite skoru: 0.00 ± 0.46 .)

4.4.1.2. Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait immunohistokimyasal bulgular

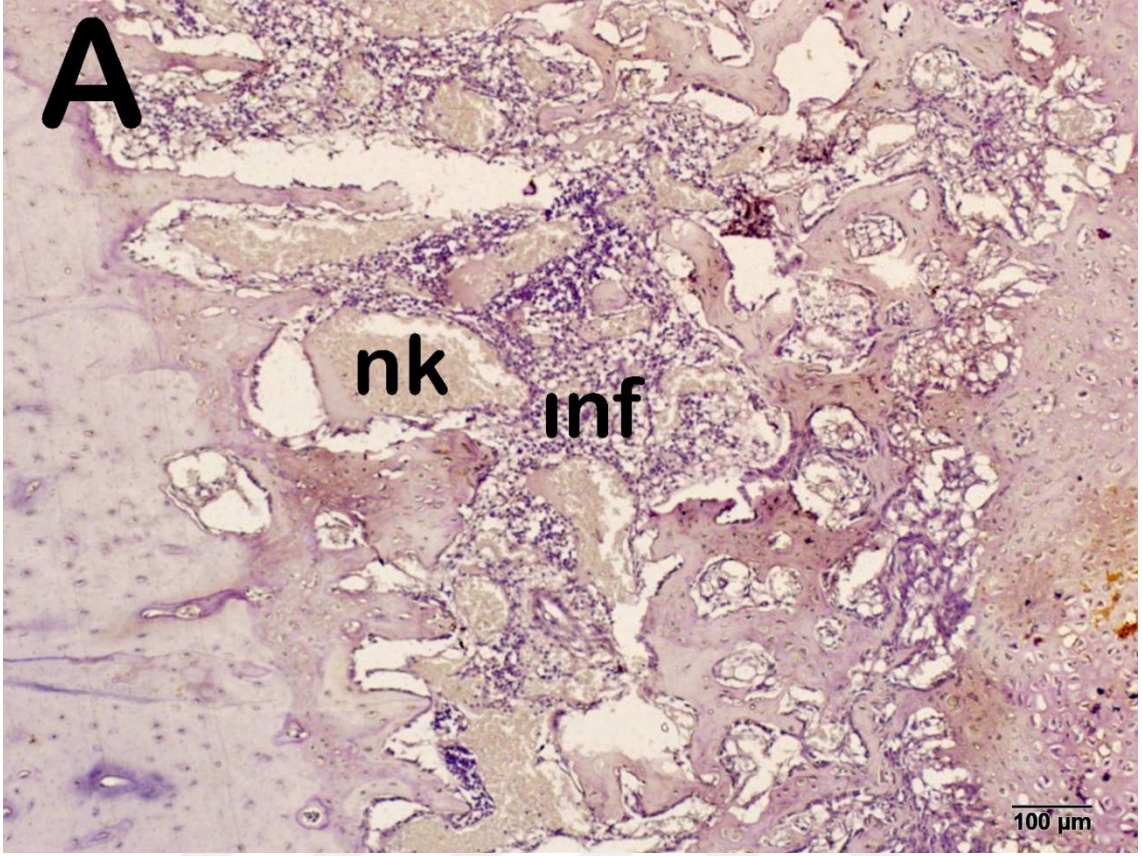
Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait femur kesitlerinde normal osteopontin pozitivitesi izlenmekte (Şekil 30).



Şekil 30 : Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait femur kesiti. Osteopontin pozitifitesi izlenmekte x20 (Osteopontin pozitifite skoru: 0.50 ± 0.2).

4.4.1.3. Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

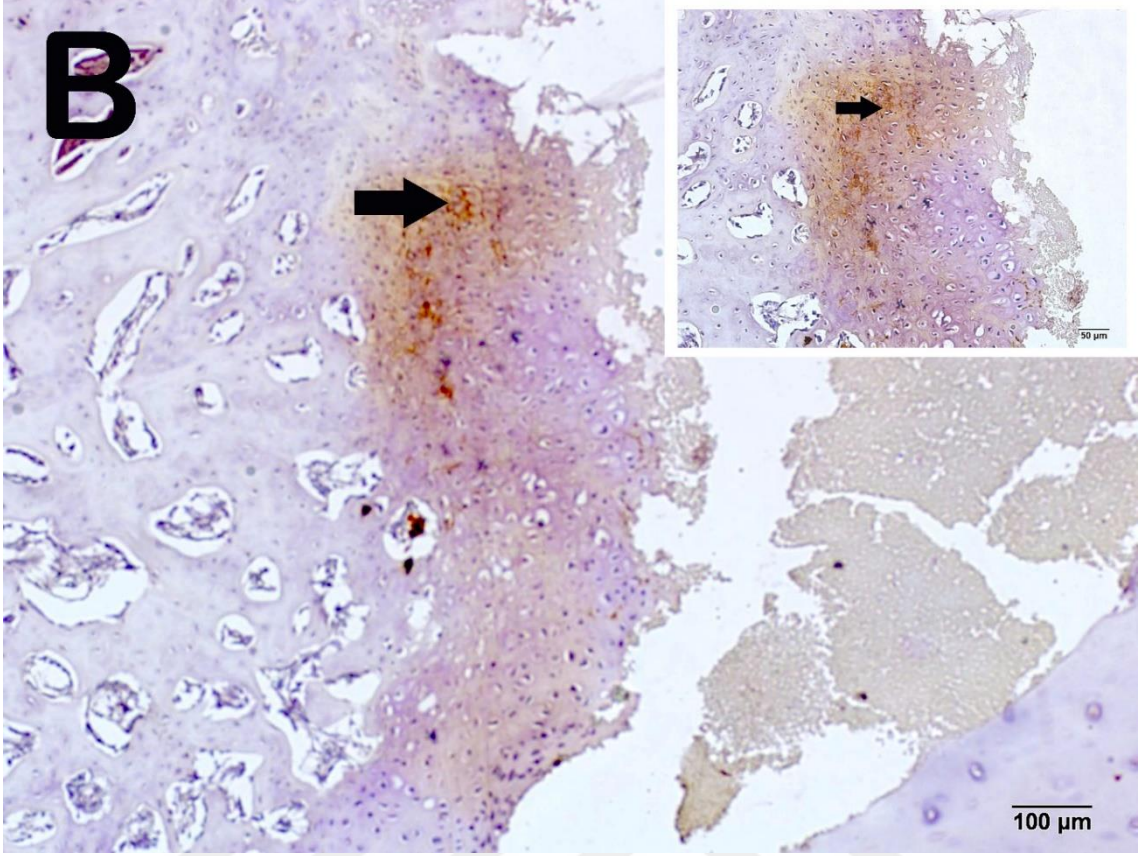
Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait femur kesitlerinde kemik dokusunda herhangi bir osteopontin pozitifitesi gözlemlenmedi (Osteopontin pozitifite skoru: 0.00 ± 0.31 ; Şekil 31).



Şekil 31 : Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti.(Normal yapıdaki kemik dokusu izlenmekte. İnflamasyon (Inf). x20 (Osteopontin pozitivite skoru: 0.00 ± 0.31 .)

4.4.1.4. Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

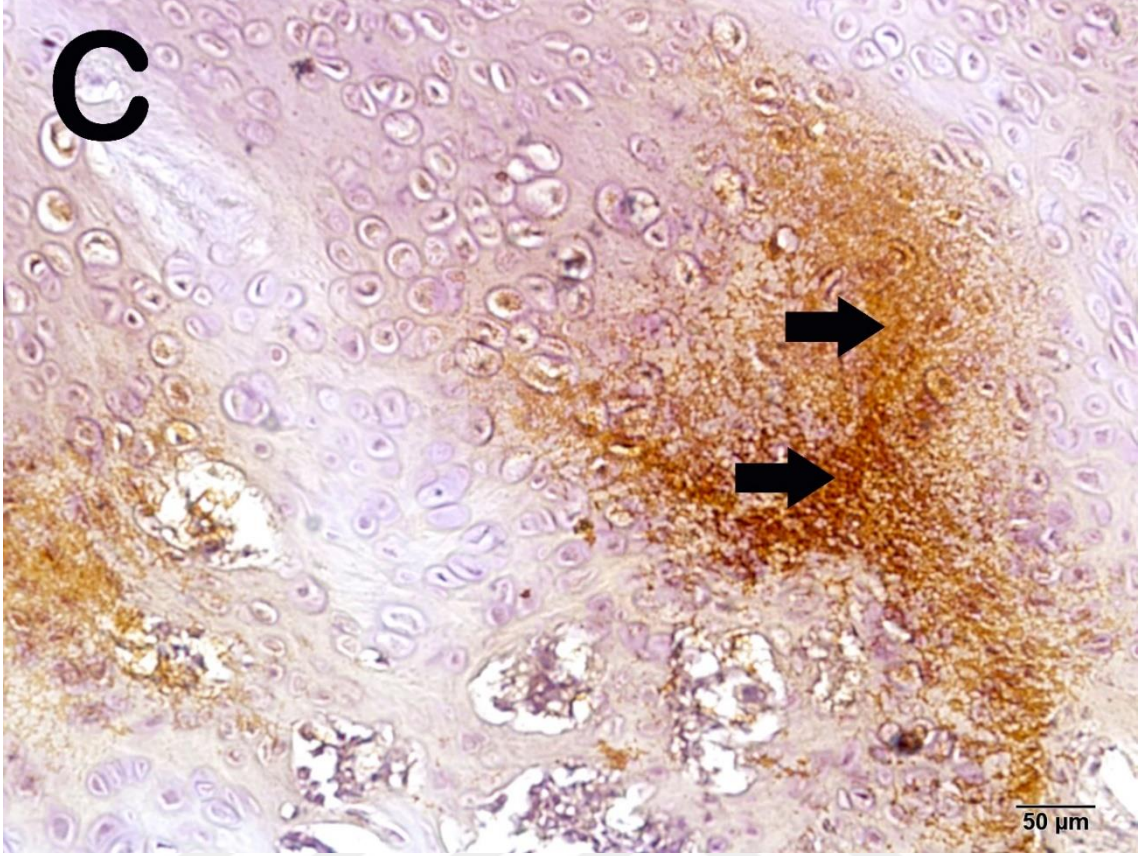
Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait femur kesitlerinde kemik dokusunda orta seviyede osteopontin pozitivitesi gözlemlenmedi (Osteopontin pozitivite skoru: 1.00 ± 0.7 ; Şekil 32).



Şekil 32 : Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti.(Kesitte osteopontin pozitivitesi izlenmekte x20 (Osteopontin pozitivite skoru: 1.00 ± 0.7 .)

4.4.1.5. Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

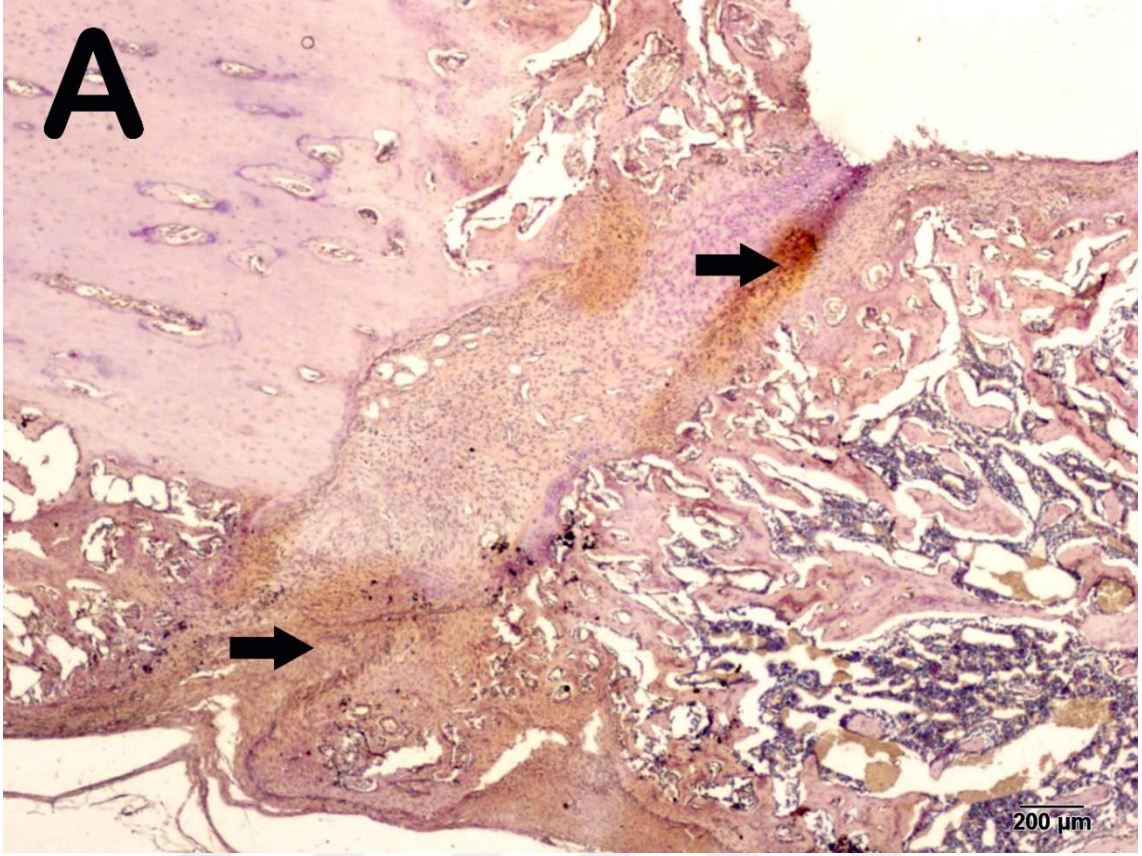
Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait femur kesitlerinde kemik dokusunda yoğun osteopontin pozitivitesi gözlemlenmiştir (Osteopontin pozitivite skoru: 2.50 ± 0.54 ; Şekil 33).



Şekil 33 : Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti.(Yoğun osteopontin pozitifitesi izlenmekte x40 (Osteopontin pozitifite skoru: 2.50 ± 0.54).)

4.4.1.6. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

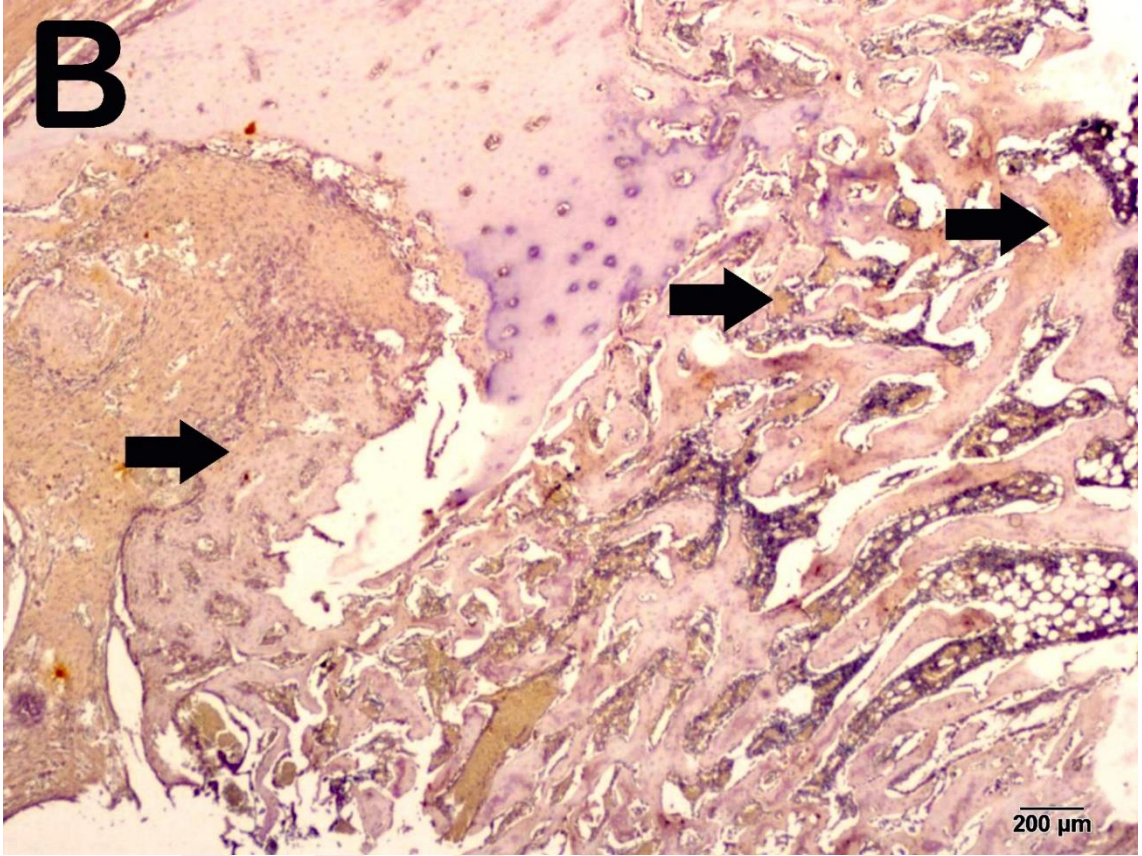
Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait femur kesitlerinde, kemik dokusunda orta seviyede osteopontin pozitifitesi gözlemledik (Osteopontin pozitifite skoru: 2.00 ± 0.46 ; Şekil 34).



Şekil 34 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti. (Orta seviyede osteopontin pozitifitesi izlenmekte. x4 (Osteopontin pozitifite skoru: 2.00 ± 0.46)).

4.4.1.7. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

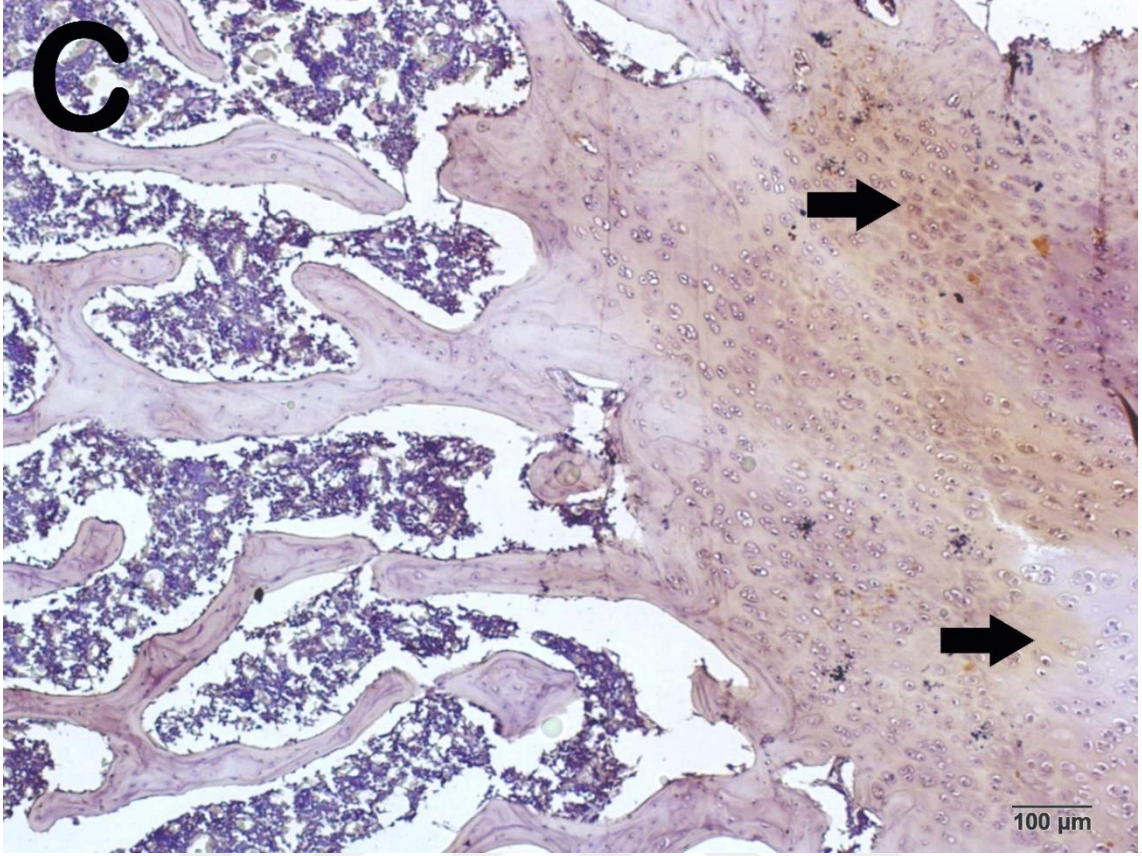
Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait femur kesitlerinde, kemik dokusunda orta seviye osteopontin pozitifitesi gözlemledik (Osteopontin pozitifite skoru: 3.00 ± 0.52 ; Şekil 35).



Şekil 35 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti.(Orta seviye osteopontin pozitifitesi izlenmekte. x4 (Osteopontin pozitifite skoru: 3.00 ± 0.52).)

4.4.1.8. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait femur kesitlerinde, kemik dokusunda az yoğun osteopontin pozitifitesi gözlemledik (Osteopontin pozitifite skoru: 2.00 ± 0.64 ; Şekil 36).

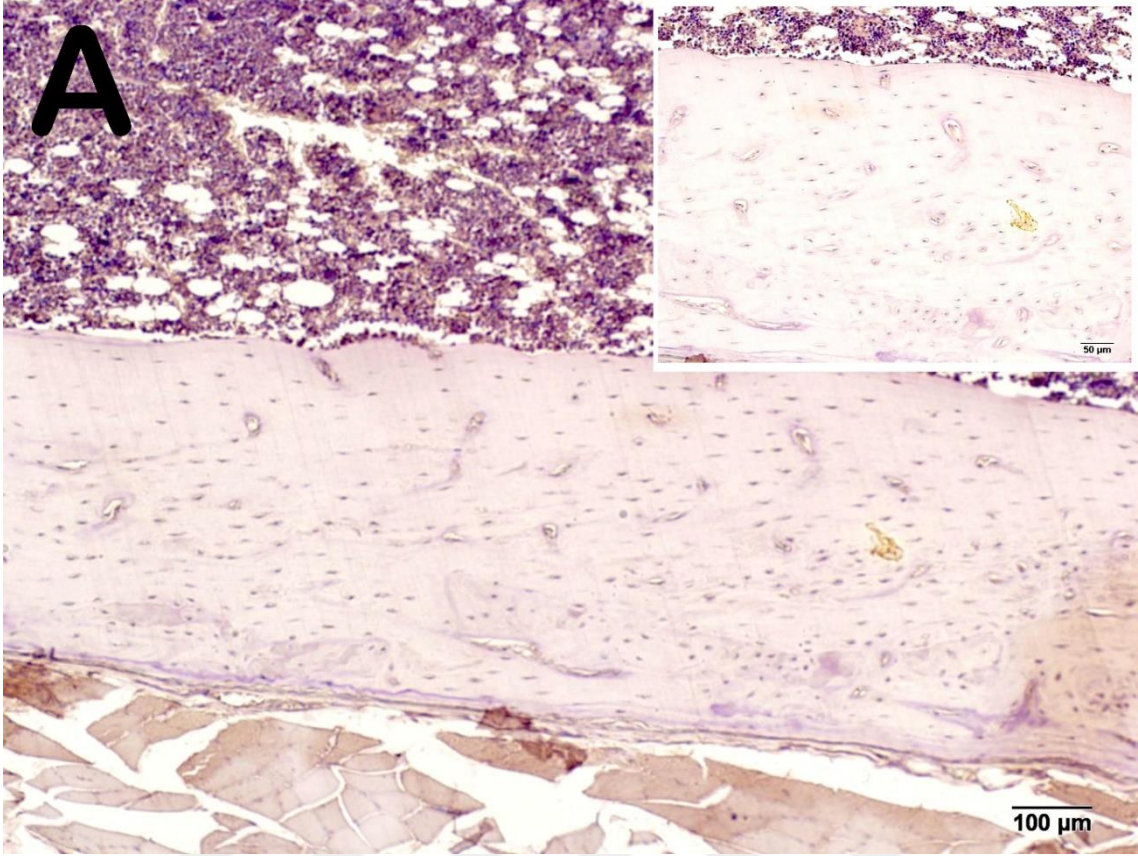


Şekil 36 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti.(Az seviyede osteopontin pozitivitesi izlenmekte. x4 (Osteopontin pozitivite skoru: 2.00 ± 0.64 .)

4.4.2. Osteokalsin

4.4.2.1. Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

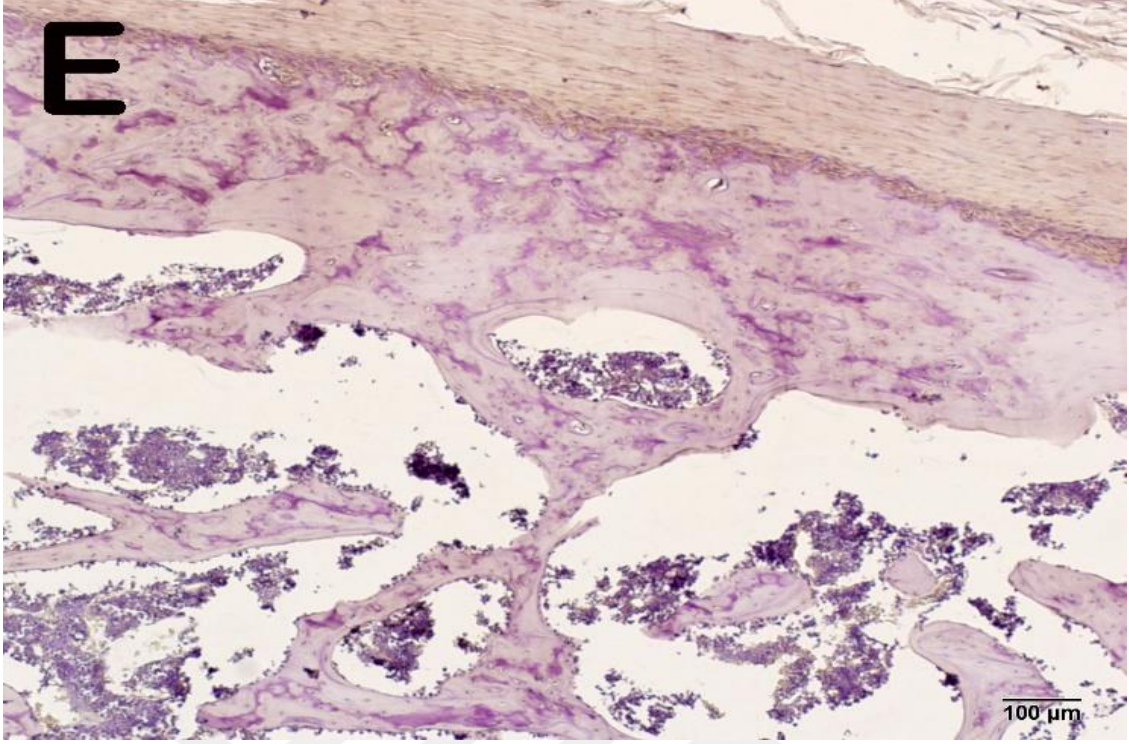
Kontrol grubuna ait femur kesitlerinde, normal yapıdaki kemik dokusu gözlemledik. (Osteokalsin pozitivite skoru: 0.00 ± 0.46 : Şekil 37).



Şekil 37 : Kontrol grubuna ait femur kesiti. (Normal yapıdaki kemik dokusu izlenmekte, x10 (Osteokalsin pozitivite skoru: 0.00 ± 0.46 .)

4.4.2.2. Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait immunohistokimyasal bulgular

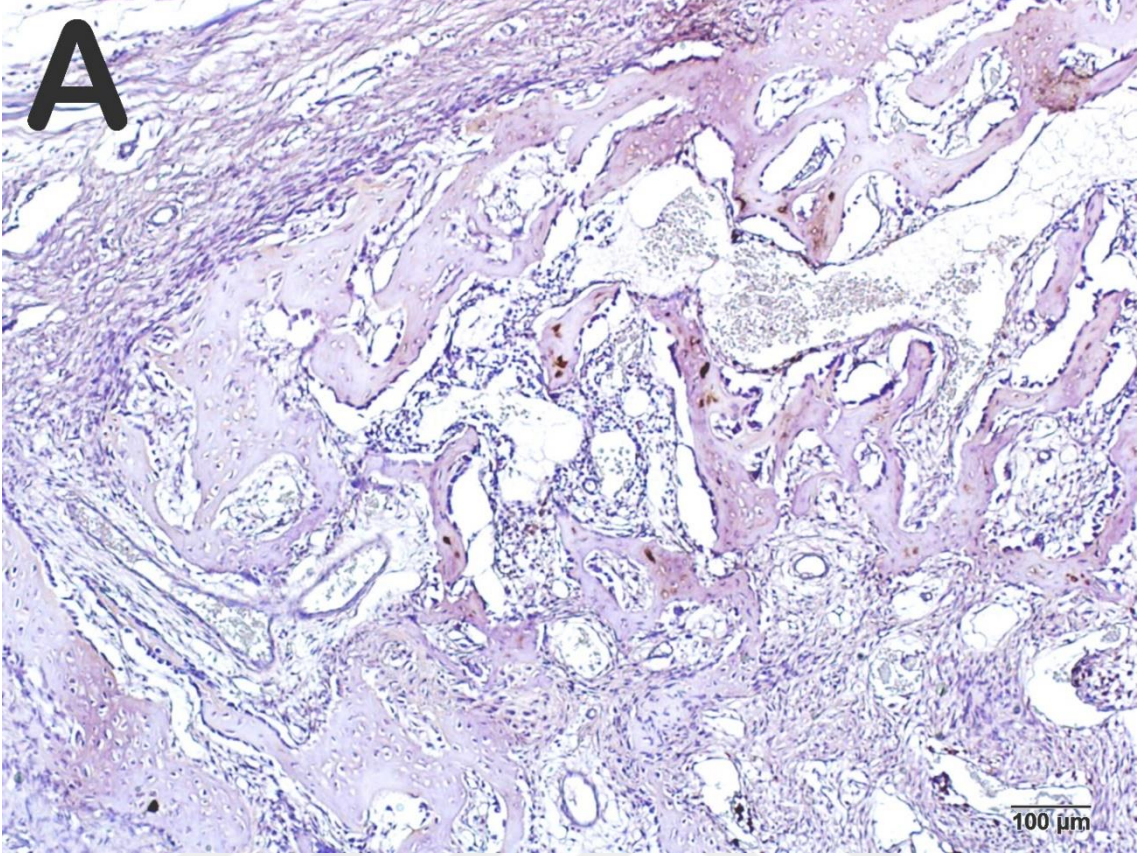
Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait femur kesitlerinde osteokalsin pozitivitesi izlenmekte x20 (Şekik 38).



Şekil 38 : Sağlıklı ve KTY verilen gruba ait femur kesiti. Osteokalsin pozitivitesi izlenmekte x20 (Osteopontin pozitivite skoru: 0.50 ± 0.2).

4.4.2.3. Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

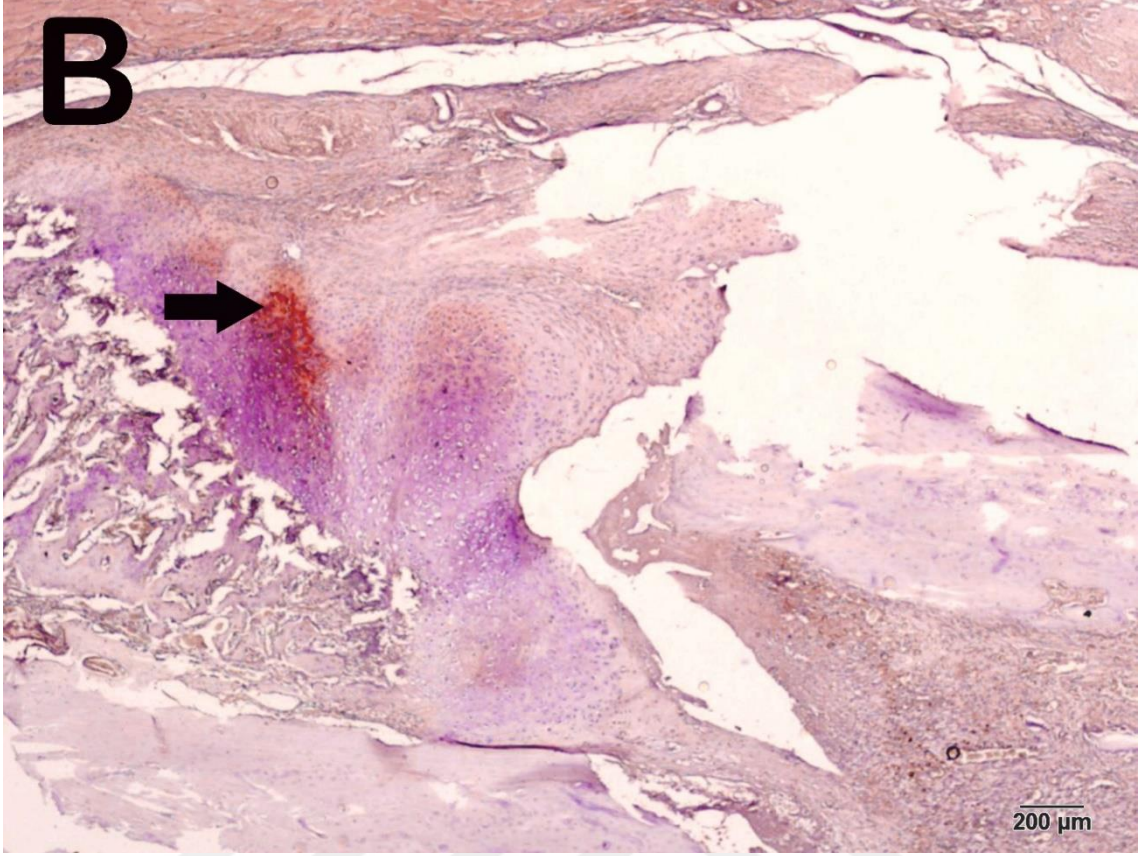
Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait femur kesitlerinde kemik dokusunda osteokalsin aktivitesi izlemedik (Osteokalsin pozitivite skoru: 0.00 ± 0.35 ; Şekil 39).



Şekil 39 : Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti.(Herhangi bir osteokalsin aktivitesi izlenmemekte, x10 (Osteokalsin pozitivite skoru: 0.00 ± 0.35 .)

4.4.2.4. Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

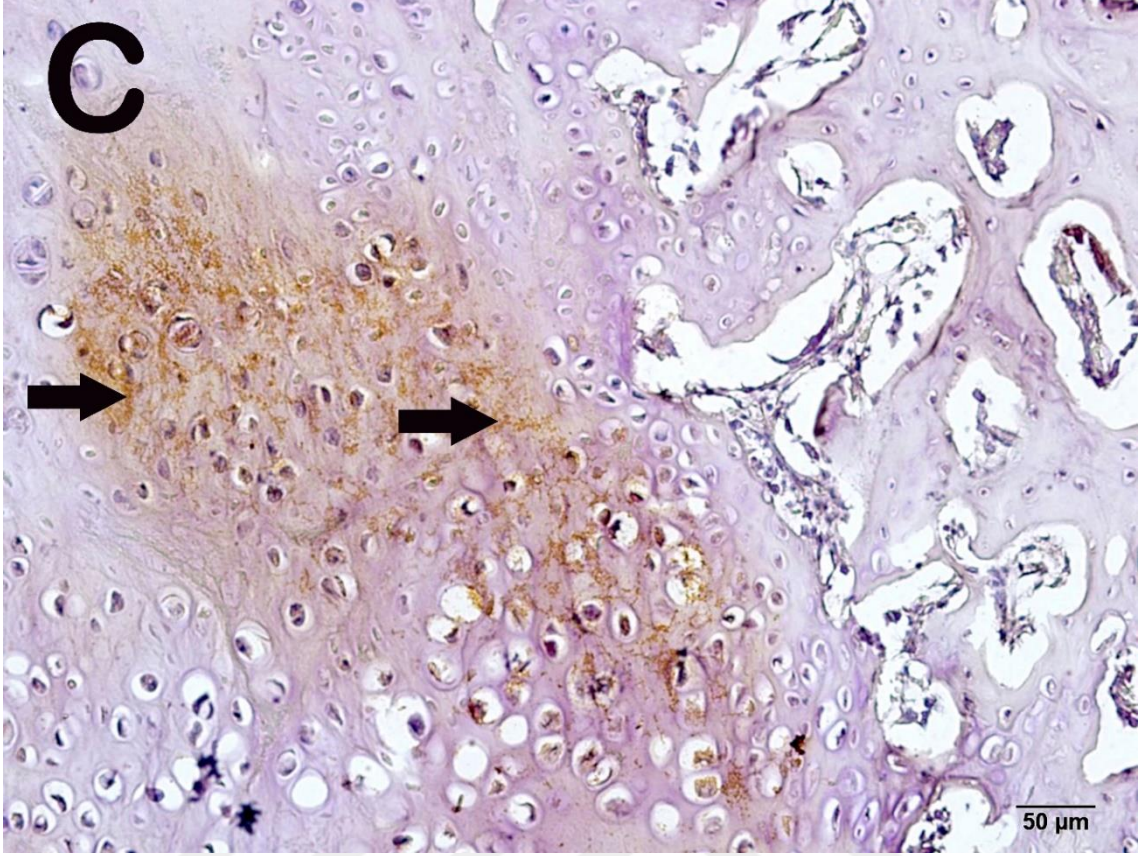
Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait femur kesitlerinde, kemik dokusunda orta düzeyde osteokalsin aktivitesi gözlenmekte (Osteokalsin pozitivite skoru: 1.50 ± 0.46 ; Şekil 40).



Şekil 40 : Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti.(Orta seviyede osteokalsin aktivitesi gözlenmekte. x4. (Osteokalsin pozitivite skoru: 1.50 ± 0.46 .)

4.4.2.5. Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

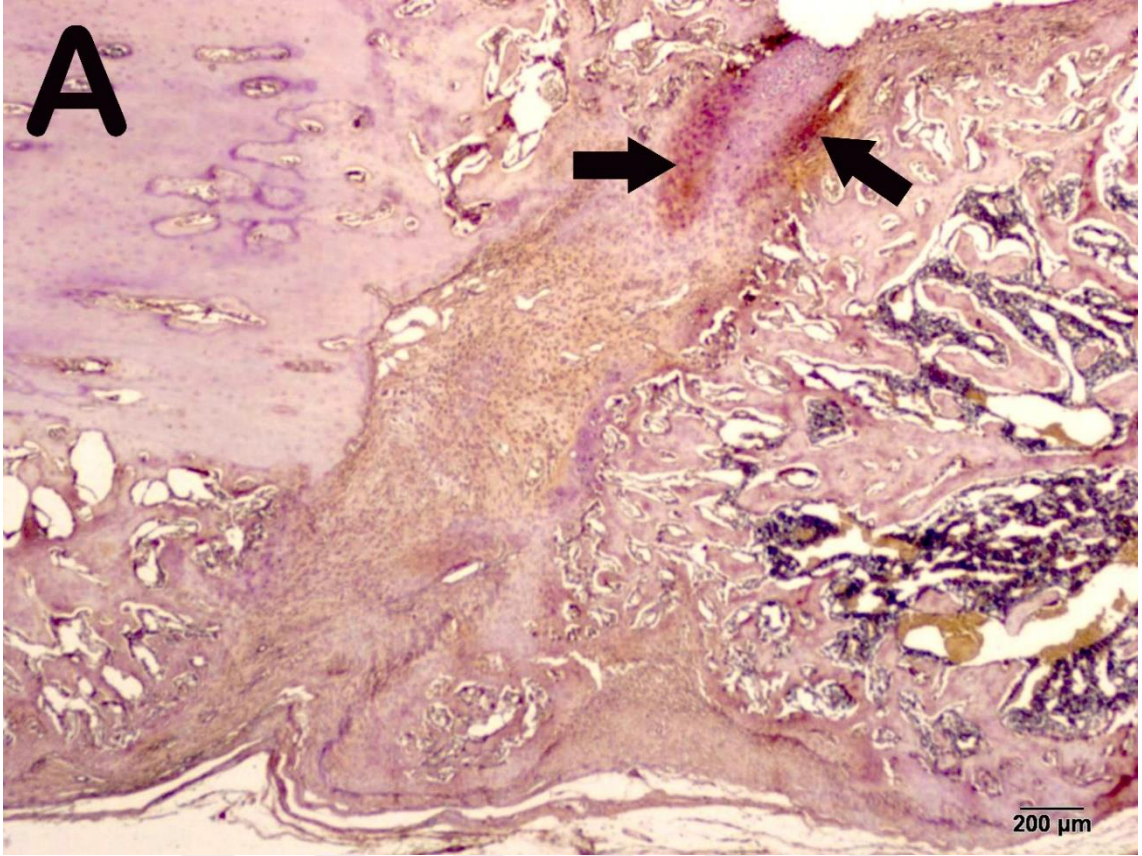
Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait femur kesitlerinde, kemik dokusunda yoğun osteokalsin aktivitesi gözlenmekte (Osteokalsin pozitivite skoru: 2.00 ± 0.35 ; Şekil 41)



Şekil 41 : Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna ait femur kesiti.(Yoğun seviyede osteokalsin aktivitesi gözlenmekte. x4. (Osteokalsin pozitivite skoru: 2.00 ± 0.35 .)

4.4.2.6. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

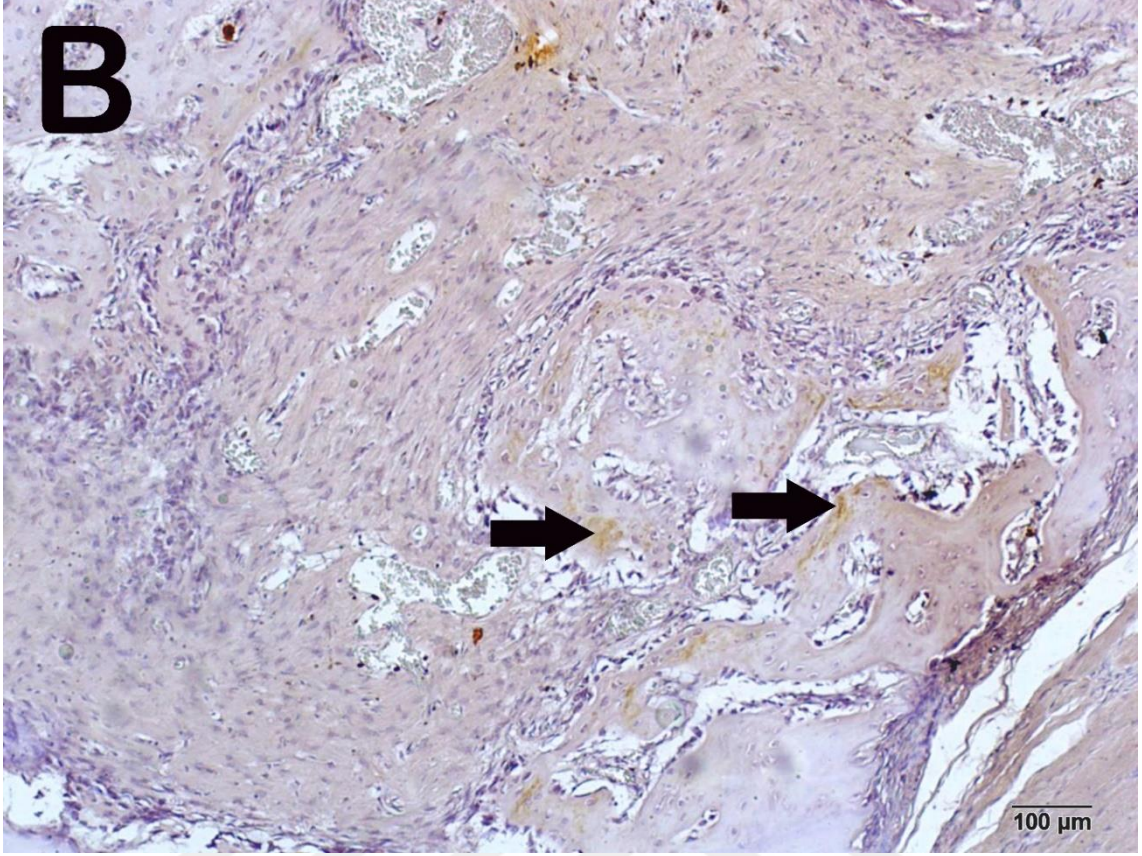
Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait femur kesitlerinde, kemik dokusunda az miktarda osteokalsin aktivitesi gözlenmekte (Osteokalsin pozitivite skoru: 3.00 ± 0.54 ; Şekil 42).



Şekil 42 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 2. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti.(Az seviyede osteokalsin aktivitesi gözlenmekte. x4. (Osteokalsin pozitivite skoru: 3.00 ± 0.54 .)

4.4.2.7. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

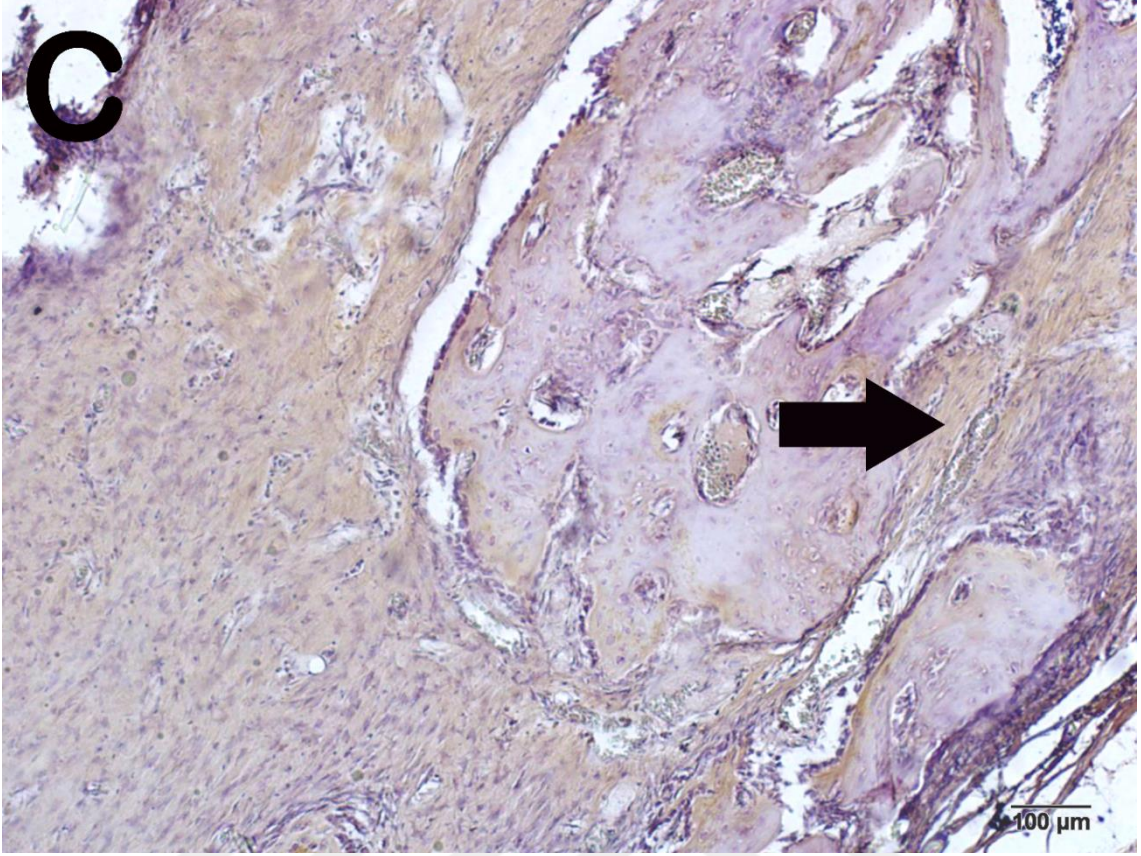
Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait femur kesitlerinde, kemik dokusunda yoğun osteokalsin pozitivitesi gözlenmekte (Osteokalsin pozitivite skoru: 3.00 ± 0.51 ; Şekil 43).



Şekil 43 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 4. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti.(Az seviyede osteokalsin aktivitesi gözlenmekte. x4. (Osteokalsin pozitivite skoru: 3.00 ± 0.51 .)

4.4.2.8. Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait immunohistokimyasal bulgular

Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait femur kesitlerinde, kemik dokusunda yoğun osteokalsin pozitivitesi gözlenmekte (Osteokalsin pozitivite skoru: 1.50 ± 0.74 ; Şekil 44).



Şekil 44 : Kırık oluşturulan ve KTY verilen 6. hafta tedavi grubuna ait femur kesiti.(Yoğun osteokalsin aktivitesi gözlenmekte. x4. (Osteokalsin pozitivite skoru: 1.50 ± 0.74 .)

4.5. Semi-Kantitatif Bulgular

4.5.1. Histopatolojik kemik iyileşmesi skoru

Kontrol grubuna (HKİS: 10.0 ± 0.35) ait kestilerde yapılan ölçümler sonucunda histopatolojik kemik iyileşme skoru (HKİS), gerek kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubu (HKİS: 1.0 ± 0.35), kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu (HKİS: 2.0 ± 0.54), kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu (HKİS: 5.0 ± 0.84) gerekse Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu (HKİS: 3.0 ± 0.54), Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubu (HKİS: 4.50 ± 0.99), ve Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubu (HKİS: 5.0 ± 0.84) gruplarında düştüğünü saptatik ($p=0.00$; Tablo 7). Bunun yanında kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubu HKİS skoru 1.0 ± 0.35 'den, kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu 2.0 ± 0.54 'e ve kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubu 4.50 ± 0.99 'a yükseldiğini saptatik ($p=0.00$; Tablo 7).

KTY uygulaması, kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubunda 1.0 ± 0.35 olan HKİS skorunu 3.0 ± 0.54 'e yükseltmiştir ($p=0.00$; Tablo 7). Yine KTY uygulaması kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubunda 2.0 ± 0.54 olan HKİS'i 4.50 ± 0.99 yükseltmiştir ($p=0.00$; Tablo 7). kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu sonucu 5.0 ± 0.84 ölçülen HKİS skorunun KTY uygulamasının ardından 7.0 ± 0.53 'e yükseldiğini saptatik ($p=0.00$; Tablo 7). Bunların yanında kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu 5.0 ± 0.84 olarak ölçülen HKİS ile Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubunda 4.50 ± 0.99 olarak ölçülen HKİS benzer olması dikkat çekiciydi ($p=1.00$; Tablo 7).

Tablo 7 : Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru (HKİS) Analiz Sonuçları (Median±Standart sapma).

Gruplar	HKİS
Kontrol	$10.00 \pm 0.35^{b,d,f,j,m,p}$
Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubu	$1.00 \pm 0.35^{a,e,f,j,m,p}$
Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu	$2.00 \pm 0.54^{a,c,f,k,m,p}$
Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu	$5.00 \pm 0.84^{a,b,d,k,n,s}$
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu	$3.00 \pm 0.54^{a,b,e,g,k,o,p}$
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubu	$4.50 \pm 0.99^{a,b,d,h,l}$
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubu	$7.00 \pm 0.53^{a,b,d,i,j,p}$
Sağlıklı ve KTY verilen grup	9.50 ± 0.35^y
Kruskal Wallis, Tamhane T2 ^a P=0.00 Kontrol grubuna kıyasla, ^b P=0.00 Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^c P=0.045 Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^d P=0.00 Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^e P=0.04 Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^f P=0.00 Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^g P=0.04 Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^h P=1.00 Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol kıyasla, ⁱ P=0.01 Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^j P=0.00 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^k P=0.04 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^l P=0.01 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^m P=0.01 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna kıyasla, ⁿ P=1.00 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^o P=0.01 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^p P=0.005 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna kıyasla,	

^rP=0.00 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna kıyasla,
^sP=0.01 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna kıyasla,
^yP=1.00 Sağlıklı ve KTY verilen grubuna kıyasla,

4.5.2. Osteopontin pozitivite skoru

Kontrol grubu (pozitivite skoru; 0.00 ± 0.46) ve kırık oluşturulan 2. hafta kontrol (pozitivite skoru: 0.00 ± 0.31) grubuna ait kemik dokusunda osteopontin pozitivitesi gözlemedik (Tablo 8). Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol (pozitivite skoru: 1.00 ± 0.7) ve kırık oluşturulan 6. hafta kontrol gruplarında (pozitivite skoru: 2.00 ± 0.64) kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna (pozitivite skoru: 0.00 ± 0.31) kıyasla anlamlı bir şekilde osteopontin pozitivitesini artırdığını saptatik ($p < 0.05$; Tablo 8). Bunun yanında kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu osteopontin pozitivite skoru (pozitivite skoru; 2.00 ± 0.46) kırık oluşturulan 2. hafta kontrol pozitivite skoruna (pozitivite skoru: 0.00 ± 0.31) kıyasla anlamlı olarak artırdığını gözlemedik ($p < 0.05$; Tablo 8). Bunun yanında kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu osteopontin pozitivite skoru (pozitivite skoru: 2.00 ± 0.46) kırık oluşturulan 2. hafta kontrol osteopontin pozitivitesi skoru (pozitivite skoru: 1.00 ± 0.7) arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p < 0.05$; Tablo 8). Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol osteopontin skoru (pozitivite skoru: 2.50 ± 0.54) kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu (pozitivite skoru: 3.00 ± 0.52) ve kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu skoruna (pozitivite skoru: 2.00 ± 0.64) benzerdi ($p < 0.05$; Tablo 8). Bununla beraber kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubu pozitivite skoru (pozitivite skoru: 3.00 ± 0.52) kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu pozitivite skoruna (pozitivite skoru: 2.50 ± 0.54) kıyasla artığını izledik ($p < 0.05$; Tablo 8).

Tablo 8 : Osteopontin pozitivite skorlama bulguları (median \pm standart sapma).

Gruplar	Osteopontin Pozitivite Skoru
Kontrol	0.00 ± 0.46
Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubu	$0.00 \pm 0.31^{c,g,i,k}$
Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu	$1.00 \pm 0.7^{a,b,c,e,h,i,k}$
Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu	$2.50 \pm 0.54^{a,b,c,h,j,l}$

Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu	2.00±0.46 ^{a,b,d,f,j,l}
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubu	3.00±0.52 ^{a,b,c,f,h,l}
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubu	2.00±0.64 ^{a,b,c,f,h,j}
Sağlıklı ve KTY verilen grup	0.00±0.41 ^m
<p>^aP<0.05 Kontrol grubuna kıyasla, ^bP<0.05 Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^cP>0.05 Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^dP>0.05 Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^eP<0.05 Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^fP>0.05 Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^gP<0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^hP>0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna kıyasla, ⁱP<0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^jP>0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^kP<0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^lP>0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^mP=1.00 Sağlıklı ve KTY verilen gruba kıyasla,</p>	

4.5.3. Osteokalsin pozitivite skoru

Kontrol grubu (pozitivite skoru: 0.00±0.46) ve kırık oluşturulan 2. hafta kontrol (pozitivite skoru: 0.00±0.35) grubuna ait kemik dokusunda osteokalsin pozitivitesi gözlemedik (Tablo 9). Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol (pozitivite skoru: 1.50±0.46) ve kırık oluşturulan 6. hafta kontrol gruplarında (pozitivite skoru: 2.00±0.35) kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna (pozitivite skoru: 0.00±0.35) kıyasla anlamlı bir şekilde osteokalsin pozitivitesini artırdığını saptatik (p<0.05: Tablo 9). Bunun yanında kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu osteokalsin pozitivite skoru (pozitivite skoru: 3.00±0.54) kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu pozitivite skoruna (pozitivite skoru; 0.00±0.35) kıyasla anlamlı olarak artırdığını gözlemedik (p<0.05; Tablo 9). Bunun yanında kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu osteokalsin pozitivite skoru (pozitivite skoru: 3.00±0.54) kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu osteokalsin pozitivitesi skoru (pozitivite skoru: 1.50±0.46) arasında istatistiksel olarak fark yoktu (p<0.05; Tablo 9). Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu osteokalsin skoru (pozitivite skoru: 2.00±0.35) kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu (pozitivite skoru: 3.00±0.54) ve 6. hafta tedavi grubu skoruna (pozitivite skoru: 1.50±0.74) benzerdi (p<0.05: Tablo 9). Bununla beraber kırık oluşturulan ve KTY

verilen, 4. hafta tedavi grubu osteokalsin pozitivite skoru (pozitivite skoru: 3.00 ± 0.51) kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu pozitivite skoruna (pozitivite skoru: 2.00 ± 0.35) kıyasla artığını izledik ($p < 0.05$; Tablo 9).

Tablo 9 : Osteokalsin pozitivite skorlama bulguları (median±standart sapma).

Gruplar	Osteokalsin Pozitivite Skoru
Kontrol	0.00 ± 0.46
Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubu	$0.00 \pm 0.35^{c,g,i,k}$
Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubu	$1.50 \pm 0.46^{a,b,c,e,h,i,k}$
Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubu	$2.00 \pm 0.35^{a,b,c,h,j,l}$
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubu	$3.00 \pm 0.54^{a,b,d,f,j,l}$
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubu	$3.00 \pm 0.51^{a,b,c,f,h,l}$
Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubu	$1.50 \pm 0.74^{a,b,c,f,h,j}$
Sağlıklı ve KTY verilen grup	0.00 ± 0.53^m
<p>^aP<0.05 Kontrol grubuna kıyasla, ^bP<0.05 Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^cP<0.05 Kırık oluşturulan 2. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^dP>0.05 Kırık oluşturulan 4. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^eP<0.05 Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^fP>0.05 Kırık oluşturulan 6. hafta kontrol grubuna kıyasla, ^gP<0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^hP>0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 2. hafta tedavi grubuna kıyasla, ⁱP<0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^jP>0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 4. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^kP<0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^lP>0.05 Kırık oluşturulan ve KTY verilen, 6. hafta tedavi grubuna kıyasla, ^mP=1.00 Ketan tohumu grubuna kıyasla,</p>	

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada deneysel olarak femoral kırık oluşturulup intramedüller tespit uygulanan sıçanlarda KTY'nin kırık iyileşmesinde etkisini araştırdık. Kırık iyileşmesi üzerine yapılan deneysel çalışmalarda, sıçanlar da dahil olmak üzere farklı türden çok sayıda hayvan kullanılmıştır (92,93). Ayrıca uygulama avantajları nedeniyle literatürde femur ve tibia gibi uzun kemikler kullanılmıştır (94,95).

Kırık sonrası hasarlanmış dokuda meydana gelen geçici iskemi sonrası serbest oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır. Oluşan serbest oksijen radikalleri, antioksidan mekanizma ile bir dengede tutulmaya çalışılmaktadır (96). Serbest oksijen radikalleri nedeniyle kırık iyileşmesinin olumsuz olarak etkilendiği birçok çalışmada bildirilmiştir (97-99).

Oksidatif sters belirteci olan MDA düzeyi, lipid peroksidasyonunu gösteren, ölçülebilen bir parametredir (100). Kırık sonrası ilk iki haftada yükseldiği, ilerleyen haftalarda ise azaldığı gösterilmiştir (101). Sıçanlarda tibia kırıkları üzerine yapılan deneysel bir çalışmada ilk iki haftada anlamlı bir artış meydana geldiği, ancak dördüncü haftada tekrar eski seviyesine döndüğü bildirilmiştir (102). Bu çalışmada, kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde MDA düzeyleri yüksek olarak ölçülmüş ve ilerleyen dönemde azalma tespit edilmiştir. Bu sonuç oksidatif sürecin en fazla kırık iyileşmesinin erken fazında olduğu, kırık iyileşme sürecinde azalarak devam ettiğinin göstermektedir.

Antioksidan etkisi olan glutasyon, aynı zamanda kofaktör ve substrat görevi olan hücresel fonksiyonlar için gerekli moleküldür (103). Hücrelerde oluşan metabolitleri uzaklaştırır ve sülfidril grubunun devamlılığını sağlar (104). Biyolojik olarak meydana gelebilecek problemler kırık sonrası kaynamayı olumsuz etkileyebilir. Özellikle kırık meydana geldikten sonraki erken dönemde bu biyolojik etkenlerin etkisinin ortaya çıktığı görülmektedir. Kırık iyileşmesinin erken basamağı bu nedenle önem teşkil etmektedir (105). KTY, antioksidan etkileri olan bir moleküldür. Antioksidan etkisinin aktivite basamağı herbasetin ve herbasetin-3,8-O-diğlukopiranozitin aglikonundan kaynaklanır (83). KTY ile kırık iyileşmesinin erken döneminde antioksidan etkinin oluşması önemlidir. Bu çalışmada, GSH düzeylerinin kırığın erken dönemlerde azaldığı, 4. haftada arttığı ve 6. haftada tekrar azaldığı tespit edildi. Kırık sonrası oksidatif stresin fazla olduğu erken dönemlerde GSH değerinin azalması, daha sonra artması KTY'nin erken

aşamalarda antioksidan etki göstererek bu değişikliğin oluşmasında rolü olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda radyolojik değerlendirme sonucu erken dönemde KTY'nin kırık iyileşmesinde anlamlı etki gösterdiğini belirledik. Kırık iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda, radyolojik iyileşmeyi objektif değerlendirmek için birçok yöntem bildirildi. Bu nedenle kırık iyileşmesinin radyolojik değerlendirmesinde farklı yöntemler ile farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (106,107). Kırık iyileşmesini objektif değerlendirebilmek için çalışmamızda radyolojik skorlama yanında histopatolojik bulguları da değerlendirdik.

Kemik iyileşmesi üzerine yapılan daha önceki çalışmalarda kırık modellerin uygulama sonrasındaki sürelerle bağlı olarak kırık bölgelerinde akut inflamasyon, ödem, fibröz kallus, kırık kallus ve immatür yeni kemik oluşumları gibi çok sayıda bulgu gözlenmiştir (108-112). Huo ve arkadaşları çalışmalarında bu bulguları kapsayan bir histopatolojik kemik iyileşme skoru ile semi-kantitatif değerlendirmeye olanak tanımıştır (91). Loi ve arkadaşları çalışmalarında kemik kırık uygulamasının ilk iki haftasında kırık bölgesinde yoğun inflamasyon ve ödematöz alanlar oluştuğunu raporlamıştır (111). Çalışmamızda benzer olarak ikinci haftada yoğun inflamasyon ve ödematöz alanların oluşumlarına bağlı olarak HKİS skoruna düşmesine neden olduğunu gözlemledik. Handool ve arkadaşları femur kırık modeli çalışmalarında kırık modellemesinde sonraki dördüncü haftada kırık bölgesinde fibröz ve kırık kallus oluşumları gözlediğini bildirmiştir (113). Yu ve arkadaşları ise kırık oluşumundan dört hafta sonra ağırlıklı olarak fibröz kallus ve bunu takiben daha az olmak üzere kırık kallus oluşumu olduğunu raporlamıştır (110). Bununla beraber yer yer immatür yeni kemik oluşumları gözlemlemişlerdir. Bizim bulgularımızda ise benzer olarak fibröz kallus ve kırık kallus oluşumlarını izledik. Ayrıca Huo ve arkadaşlarının bulgularına benzer olarak fibröz kallus ve kırık kallus oluşumları kırık modellemesi ikinci hafta grubuna kıyasla HKİS yükseldiğini saptadık. Ancak Handool ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak immatür kemik oluşumları gözlemedik. Bu farklılığın Yu ve arkadaşlarının çalışmalarına kıyasla kemik kırık oluşturma modelinden kaynaklandığını düşünmekteyiz (110). Handool ve arkadaşları çalışmalarında kırık oluşumundan altı hafta sonrasında kırık kallus kaybolarak yerini matür ve yer yer immatür kemik oluşumlarına bıraktığını bildirmiştir (113). Çalışmamızda benzer olarak yaygın immatür kemik

oluşumları gözlemekle beraber yer yer kırıkta kallus oluşumları mevcuttu. Buna ek olarak HKİS skorunu kırık oluşumu sonrası dördüncü hafta grubuna kıyasla artığını saptadık.

Daha önce yapılan kemik kırık modeli çalışmalarında birçok antioksidan, antikoagulan, antibiyotikler ve antihipertansif gibi ajanların koruyucu etkileri ve terapötik etkilere ele alınmakla beraber KTY ele alınmamıştır (71-82). Zengin fatty oil ve omega - 3 içeriğine sahip olan KTY daha önceki çalışmalarda inflamasyon, aterosklerotik plak oluşumu ve obezitenin oluşturduğu arteriyel disfonksiyona karşı terapötik ve koruyucu etkili olduğu bildirilmiştir (84). Toscano ve arkadaşlarının omurga kırığı üzerine çalışmalarında omega-3 yağ asidinin kemik yapısını güçlendirerek kemik kırıklarına karşı koruyucu etkisi olduğunu raporlamıştır (114). Benzer olarak O'connor ve arkadaşları omega-3 yağ asidinin kemik dokusunda olumlu etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir (78). Bunun yanında Ward ve arkadaşları çalışmalarında KTY'nin kemik dansitesini artırdığını bildirmiştir (87). Çalışmamızda ise benzer olarak KTY uygulamasının ikinci hafta sonunda kırık ikinci hafta grubundan farklı olarak yaygın inflamasyon ve ödematoz alanların yerine kırık dördüncü hafta grubuna benzer olarak fibröz ve kırıkta kallus oluşumları gözlemledik. Buna bağlı olarak HKİS değeri kırık ikinci hafta grubuna kıyasla artmakla beraber kırık dördüncü hafta grubu HKİS değerine benzerdi. Yine KTY uygulaması dördüncü hafta sonunda kırık dördüncü haftadan farklı olarak ve kırık altıncı hafta uygulamasının bulgularına benzer olarak yaygın immatür kemik ve yer yer kırıkta kallus oluşumlarını gözlemledik. Ek olarak KTY uygulaması dördüncü hafta HKİS skoru yalnızca kırık dördüncü hafta HKİS değerine kıyasla anlamlı olarak artığını bunun yanında yalnızca kırık altıncı hafta grubuna benzer olduğunu saptadık. KTY uygulaması altıncı hafta sonunda keten tohumu yağ uygulaması dördüncü hafta ve yalnızca kırık altıncı hafta bulgularında daha fazla immatür ve matür kemik oluşumlarına bağlı olarak HKİS değerinde artış gözlemekle beraber sağlıklı kontrol grubun HKİS değerinde düşük olduğu izledik.

6. SONUÇ

KTY'nin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelendiği bu çalışma sonucunda;

Radyolojik olarak kırık iyileşmesinin ikinci haftasında KTY gruplar arasında anlamlı fark oluşturmaktadır. KTY kırık iyileşmesini erken dönemde radyolojik olarak hızlandırmaktadır.

Biyokimyasal olarak oksidatif stres belirteci olarak MDA düzeyleri, en fazla kırık iyileşmesinin erken fazında olduğu, zamanla azaldığı ancak kırık iyileşmesinin ilerleyen dönemlerde devam etmektedir. Antioksidan etki göstergesi olan GSH kırık iyileşmesinin erken dönemlerde azalması, daha sonra artması KTY'nin erken aşamalarda antioksidan etki gösterdiğini göstermektedir.

Histolojik değerlendirmede KTY kırık iyileşmesi üzerine olumlu katkı sağlar. Altıncı hafta kırık kontrol grubu ve dördüncü hafta KTY verilen grupların sonuçlarının benzer olması, KTY'nin kırık iyileşmesi üzerine olan olumlu etkilerinin, en önemli histolojik kanıtıdır. Kırık iyileşmesini tüm aşamalarında kontrol kırık grubuna kıyasla anlamlı fark oluşturmaktadır.

Sonuç olarak KTY kırık iyileşmesinin erken döneminde belirgin antioksidan etki ve radyolojik iyileşme gösterirken histolojik olarak tüm iyileşme dönemi sürecinde olumlu etki göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1- **Weinstein , S.**, 2009. Turek ortopedi ilkeleri ve uygulamaları. Güneş tıp kitabevleri, altıncı baskı, ISBN:0-7817-4298-6, Alpaslan, M.(Ç.Ed.), 10-19.
- 2- **Ballock , R.T.**, OKeefe , R.J., 2007. Growth and development of the skeleton. Orthopaedic basic science. Foundations of clinical practice. 3rd Ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons. 115-127.
- 3- **Brinker , M.R.**, OConnor , D.P., 2008. Review of orthopaedics. Miller , M.D., 5th Ed. Saunder Elsevier. 1-132.
- 4- **Gartner , L.P.**, Hiatt , J.L., 2001. Color textbook of histology. 2nd Ed. Saunders Company.129-182.
- 5- **Miller , J.D.**, McCreadie , B.R., Alford A.I., Hankenson , K.D., Goldstein , S.A., 2007. Form and function of bone. Orthopaedic basic science. Foundations of clinical practice. 3rd Ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons. 129-159.
- 6- **Silva , R.F.**, Silva , S.G.R., Cerri , E.S., Simoes , M.J., Cerri , P.S., 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function and Factors. That Influence Bone Cells. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Article ID 421746: 17.
- 7- **Miclau , T.**, Bozic , K.J., Tay , B., Kim , H.T., Colnot , C., Puttlitz , C.M., 2007. Bone injury, regeneration and repair. Foundations of clinical practice. 3rd Ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons. 331-348.
- 8- **Junqueira R.O.**, Carneiro , L.C., Kelley J., 1995. Basic Histology. Appleton & Lange, 8.th edition, ISBN:0-8385-0567-8, 132-151.
- 9- **Mundy , G.R.**, 1993. Cytokines and Growth Factors in the Regulation of Bone Remodeling. Journal of Bone and Mineral Research. 8: 505-10.
- 10- **Kılıçoğlu , S.S.**, 2002. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 55 (2): 143-150.
- 11- **Saunders , W.B.**, 1970. The Management of Fractures and Dislocations, De Palma. , 2 nd Ed., 1: 10-2.
- 12- **Bucholz , R.**, 2014. Rockwood ve Green erişkin kırıkları. Güneş tıp kitabevleri, yedinci baskı, Başbozkurt, M.(Ç.Ed.), 87-88.
- 13- **Heinrich , S.D.**, 2001. Fractures of the shaft of the tibia. 5th (Ed.), Rockwood, Wilkins and Beaty (Ed.). Lippincott, Williams and Wilkins.1077-119.

- 14- **Ogden J.A.**, 1999. Injury to the immature skeleton, Chapt. 2 in: Skeletal injury in the child. 3th ed. Springer, 57-58.
- 15- **Pauwels , F.A.**, 1975. Clinical observation as example and prof of functional adaptation of bone through longitudinal growth. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 113(1); 1-5.
- 16- **Bucholz , R.W.**, Heckman , J.D., 1996. Healing of the musculoskeletal system, Fractures in adults Lippincott Williams & Wilkins, Rockwood , C.A., Green , D.P., (Edt.) , 267-304.
- 17- **Ege , R.**, 2001. Travmatoloji kırıklar, eklem ve diğer yaralanmalar. Bizim Büro Basımevi. 5.baskı 1(2,3,4):35-111.
- 18- **Oktaş , B.**, 2008. Ekstrakorporal şok dalgası tedavisinin normal ve deperioste rat femurlarında kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi. Düzce , Türkiye, 61/49.
- 19- **O'Driscoll , S.W.M.**, Saris , D.B.F., Ito , Y., Fitzimmons , J.S., 2001. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. J Orthop Res. 19:95-103.
- 20- **Khan , S.N.**, 2000. Bone growth factors. Orthop Clin Nort A. 31(3):375-388.
- 21- **Bucholz , R.W.**, Heckman , J.D., Court-Brown , C., 2006. Rockwood and Green's Fractures in Adults. Sixth ed., Lippincott Williams & Wilkins 297-330.
- 22- **Ellegard , M.**, Jorgensen , N.R., Schwarz , P., 2010. Ellegaard M, Jorgensen NR, Schwarz P: Parathyroid Hormone and Bone Healing. Calcif Tissue, Calcif Doku Int. , 87 (1): 1-13.
- 23- **Miller , M.D.**, 2006. Miller'in Ortopedi kitabı, (Ç.Edt. Yetkin , H., Yazıcı M.) ,Akademi Doktorlar Yayınevi, 1-23.
- 24- **Kerimoğlu , G.**, 2010. Leptinin sıçanlarda kırık iyileşmesi üzerine histolojik etkileri. Tıpta Uzmanlık Tezi. K.T.Ü. Tıp Fakültesi. Trabzon, Türkiye, 54/48.
- 25- **Heybeli , N.**, Eroğlu , E., Varol , R., Mumcu , E.F., 2001. Testosteronun kırık iyileşmesine etkisinin orşiektomize ratlarda oluşturulan femur kırık modelinde mekanik yöntemlerle incelenmesi, Hacettepe Ortopedi Dergisi. , 11 (2): 71-73.
- 26- **Doğan , H.**, Özçelik , B., Gedikoğlu , G., Şenel , S., 2001. The effect of calcitonin on osseous healing in guinea pig mandible. J Endod, 27:160-163.
- 27- **Cao , Y.**, Mori , S., Mashiba , T., Westmore , M.S., Ma L., Sato , M., Akiyama , T., Shi , L., Komatsubara , S., Miyamoto , K., Norimatsu , H., 2002. Raloxifene,

- estrogen and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, 17:2237-2246.
- 28- **Bronda , A.R.**, Rubin , T.C., 1990. Fracture Healing. *Surgery of the Musculoskeletal System*. 2nd Ed. 1: 93-114.
- 29- **Gartner , L.P.**, Hiatt J.L., 1997. *Color Textbook of Histology*.114-130.
- 30- **Zeng , Y.**, Si , H., Wu , Y., Li , Y., Cao , F., Li , C., O , Z.Y., Shen , B., 2018. Gene therapy with tetracycline-regulated human recombinant COL1A1 cDNA direct adenoviral delivery enhances fracture healing in osteoporotic rats. *Hum Gene Ther*.
- 31- **Wang , X.**, Huang , J., Huang , F., Zong , J.C., Tang , X., Liu , Y., Zhang , Q.F., Wang , Y., Chen , L., Yin , L.J., M , Ö., Deng , Z.L., 2017 Bone morphogenetic protein 9 stimulates callus formation in osteoporotic rats during fracture healing. *Mol Med Rep.*, 15(5)2537-2545.
- 32- **Shi , L.**, Feng , L., Liu , Y., Duan , J.Q., Lin , W.P., Zhang , J.F., Li , G., 2018. MicroRNA-218 Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Accelerates Bone Fracture Healing. *Calcif Tissue Int*.
- 33- **Dewey , K.G.**, 2001. Nutrition, growth and complementary feeding of the breastfed infant. *Pediatr Clin North Am*. 48:87-104.
- 34- **Buckwalter , J.A.**, 1996. Healing of the musculoskeletal tissues, In : Rockwood C.A (Ed.) ,Rockwood and Green's Fractures in adults. Lippicott-Raven 261-304.
- 35- **Kurt , M.**, Kaçar , S., Onal , I.K., Akdoğan , M., Haznedaroğlu , I.C., 2008. Ankaferd blood stopper as an effective adjunctive hemostatic agent for the management of life threatening arterial bleeding of the digestive tract. *Endoscopy*. 40:262.
- 36- **Tuncer , İ.**, Doğanay , L., Öztürk , O., 2010. Instant control of fundal variceal bleeding with a folkloric medicinal plant extract, ankaferd blood stopper. *Gastrointestinal Endoscopy*. 71 (4): 873-875.
- 37- **Kaplan , B.**, Gönül , B., Dinçer , S., Dincer , K.F.N., Babul , A., 2004. Relationships between tensile strength, ascorbic acid, hydroxyproline and zinc levels of rabbit full-thickness incision wound healing. *Surg Today*. 34:747-751.
- 38- **Buckwalter , J.A.**, Marsh , J.L., 2001. Rockwood and Green's fractures in adults. Lippincott-Williams-Wilkins. 245-269.

- 39- **Marie , P.J.**, 2003. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation, *Gene*, 316: 23-32.
- 40- **Nancy , A.**, Whitson , S.W., Bianco , P., 2003. Bone. Oral histology. Mosby Inc. 111-145.
- 41- **Hulth , A.**, 1989. Current concepts in fracture healing. *Clin. Orthop.* 249:265-284.
- 42- **Benowitz , N.L.**, Jacob , P., 2000. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on nicotine and cotinine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 3rd Ed. 67:653-659.
- 43- **Rodan , G.A.**, 1992. Introduction to bone biology. *Bone* , 13:3-6.
- 44- **Orhan , Z.**, Alper , M., Şenel , F., 2001. Ekstrakorporeal şok dalgası tedavisinin sıçanlarda kırık iyileşmesi üzerine etkileri. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 35:351-357.
- 45- **Brown , C.W.**, Orme , T.J., Richardson , H.D., 1986. The rate of pseudoarthrosis (surgical non-union) in patients who are smokers and patients who are non-smokers, a comparison study. *Spine*, 11(9):942-943.
- 46- **Schmitz , M.A.**, Finnegan , M., Natarajan , R., Champine , J., 1999. Effect of smoking on tibial shaft fracture healing. *Clin. Orthop. Rel.Res.* 365:184-200.
- 47- **Porter , S.E.**, Hanley , E.N., 2001. The musculoskeletal effects of smoking. *J Am Acad Orthop Surg.* 9(1):9-17.
- 48- **Sloan , A.**, Hussain , I., Magsood , M., Eremin , O., Elsheemy , M., 2010. The effects of smoking on fracture healing. *Surgeon* , 8(2):111-116.
- 49- **Nelson , B.W.**, 2005. Clinical utility of biochemical markers of bone healing. *Clinical Chemistry.* 58:1230-1235.
- 50- **Elmali , N.**, Ertem , K., Özen , S., İnan , M., Baysal , T., Güner , G., Bora , A., 2002. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 26:509-513.
- 51- **McKee , M.D.**, 2001. Aseptic non-union, *AO principles of Fracture Management.* Thomas P. Rüedi, William M. Murphy (ed), 753-768.
- 52- **Cahakkalakal , D.A.**, Novak , J.R., Fritz , E.D., Mollner , T.J., McVicker , D.L., Lybarger , D.L., McGuire , M.H., Donohue T.M.Jr., Chronic ethanol consumption results in deficient bone repair in rats. *Alcohol.* 37:13-20.

- 53- **Duryee , M.J.**, Dusad , A., Hunter , C.D., Kharbanda , K.K., Bruenjes , J.D., Easterling , K.C., Siebler , J.C., Thiele , G.M., Chakkalakal , D.A., 2018. N-acetyl Cysteine (NAC) Treatment Restores Early Phase Fracture Healing in Ethanol-Fed Rats. Alcohol Clin Exp Res. Doi:10.1111/acer.13765.
- 54- **Dalle , C.L.**, Giannini , S., 2004. Histologic diagnosis of metabolic bone diseases, bone histomorphometry. Reumatismo. 56:15-23.
- 55- **Craig , S.R.**, 2007. Factors contributing to non-union of fractures, Current orthopaedics, 21: 258-261.
- 56- **Giannoudis , P.**, Tzioupis , C., Almalki , T., Buckley , R., 2007. Fracture healing in osteoporotic fractures, is it really different? A basic science perspective. Injury 2007. 38(1):90-99.
- 57- **Macey , L.R.**, Kana , S.M., Jinguishi , S., Terek , R.M., Borretos , J., Bolander , M.E., 1989. Defect of fracture healing in experimental diabetes. JBJS Surg. 71(5):722-723.
- 58- **Martin , J.A.**, Ellerbroek , S.M., Buckwalter , J.A., 1997. Age related decline in chondocyte response insülin like growth factor I, the role of growth factor binding proteins. J. Orthop. Res., 15(4):491-498.
- 59- **Nyary , T.**, Scammel , B.E., 2015. Principles of bone and joint injuries and their healing, Surgery, 33: 7-14.
- 60- **Dodds , R.A.**, Catterall , A., Bitensky , L., Chayen , J., 1986. Abnormalities in fracture healing induced by vitamin B6, deficiency in rats, Bone, 21 (4): 549-556.
- 61- **Day , S.M.**, DeHeer , D.H. , 2001. Reversal of the detrimental effects of chronic protein malnutrition on long bone fracture healing. J.Orthop T., 15(1):47-53.
- 62- **Guarniero , R.**, DeBarros , F.T.E., Tannuri , U., Rodrigues , C.J., Rossi , J.D., 1992. Study of fracture healing in protein malnutrition. Rev. Paul Med. 110(2):63-68.
- 63- **Türk , C.Y.**, Baktır , A., Karakaş , E.S., Argün , M., Şahin , V., 1992. Kafa travmasının kırık iyileşmesi üzerine etkisi, Acta Orthop Traumatol Turc. , 26, 248-250.
- 64- **Uludağ , A.**, 2007. Kronik lenfödemin kırık iyileşmesi üzerine etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi . Diyarbakır, Türkiye, 48:40-45.
- 65- **Bodamyali , T.**, Bhatt , B., Hughes , F.J., Winrow , V.R., Kanczler , J.M., Simon , B., Abbott J., Blake , D.R., Stevens , C.R., 1998. Pulsed electromagnetic fields

- simltaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro, *Biochem Biophys Res Commun.* , 250 (2): 458-461.
- 66- **Wu , T.**, Zhang , J., Wang , B., Güneş , Y., Liu , Y., Li , G., 2018. Staphylococcal enterotoxin C2 promotes osteogenesis of mesenchymal stem cells and accelerates fracture healing. *Bone Joint Res.* 7(2):179-186.
- 67- **Wang , F.**, Han , L., Wang , X., Li , Y., Zhu , Y., Wang , J., Xue , C., 2018. Sialoglycoprotein isolated from eggs of *Carassius auratus* promotes fracture healing in osteoporotic mice. *J Food Drug Anal.* 26(2):716-724.
- 68- **Moucha , C.S.**, Einhorn , T.A., 2003. Enhancement of skeletal repair. *Browner , B.D., Jupiter , J.B., (Edt.). 3rd Edition, 1: 639-659.*
- 69- **Karaca İ.**, 1993. Hidroksilapatitin yeni kemik yapımına etkisinin deneysel olarak incelenmesi. *G.Ü. Diş. Hek. Fak. Der., Cilt X, Sayı 2, Sayfa 87-96.*
- 70- **Çılbır , Ö.**, Karaca , İ., Sabuncuoğlu , B., Akbay , C., 1999. Demineralize kemik tozunun kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi.* 2 (2): 117-121.
- 71- **Karaman , İ.**, 2009. Propolisin kırık iyileşmesi ve oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi. *Tıpta Uzmanlık Tezi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi. Kayseri, Türkiye, 54/44.*
- 72- **Günay , M.**, 2011. Ankaferdin kırık iyileşmesi üzerine etkisi. *Tıpta Uzmanlık Tezi. On Dokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi. Samsun, Türkiye, 63/44-47.*
- 73- **Biçer , E.K.**, 2010. Taurinin deneysel kırık iyileşmesi üzerine etkisi. *Tıpta Uzmanlık Tezi. Ege Üniversitesi. Tıp Fakültesi. İzmir, Türkiye, 107/88.*
- 74- **Güzel , N.**, 2011. Gingko bilobanın sıçanlarda kırık iyileşmesi üzerine etkisi. *Tıpta Uzmanlık Tezi. K.T.Ü. Tıp Fakültesi. Trabzon, Türkiye, 66/56.*
- 75- **Muhonen , A.**, Muhonen , J., Lindholm , T.C., Minn , H., Klossner , J., Kulmala , J., Happonen , R.P., 2002. Osteodistraktion of a previously irradiated mandible with or without adjunctive hyperbaric oxygenation, an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg Int.* , 31: 519-524.
- 76- **Ho , M.L.**, Chang , J.K., Wang , G.J., 1995. Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodelling in rabbits. *Clin Orthop.* 313:270-278.

- 77- **Zura , R.**, Mehta , S., Rocca , G.J.D., Steen , R.G., 2017. Biologic risk factors for non union of bone fracture, JBJS Reviews. , 4 (1).
- 78- **O'Connor , J.P.**, Capo , J.T., Tan , V., Cottrell , J.A., 2009. A comprassion of the effects of ibuprofen and rofecoxib on rabbit fibula osteotomy healing, Acta Orthop. , 80: 597-605.
- 79- **Gerstenfeld , L.C.**, AlGhawas , M., Alkhiary , Y.M., 2007. Selective and non-selective cyclooxygenase 2 inhibitors and experimental fracture healing. Reversibility of effects after short term treatment. JBJS, 89(1) : 114-125.
- 80- **Özeç , İ.**, Kılıç , E., Gümüş , C., Göze , F., 2007. Lokal olarak üç farklı dozda simvastatin uygulamasının kemik defekti iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Dİşhekimliği Fakültesi dergisi. 10 (2): 82-86.
- 81- **Türkmen , K.E.**, 2013. Teofilinin sıçanlarda kırık iyileşmesi üzerine etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. K.T.Ü. Tıp Fakültesi. Trabzon, Türkiye, 59, 57.
- 82- **Malkoç , Ç.H.**, 2000. Kırık iyileşmesine nitrikoksitin etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. K.T.Ü. Tıp Fakültesi. Trabzon, Türkiye, 54, 47.
- 83- **Yıldırım , M.U.**, Arslan , N., 2013. Seçilmiş keten hatlarının bazı bitkisel özelliklerinin karşılaştırılması, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 22 (2): 59-68.
- 84- **Konuklugil , B.**, Bahadır , O., 2004. Linum usitatissimum l.'nin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri, [Ankara Ecz. Fak. Derg.](#) , 33(1) 63-84.
- 85- **Mirfatahi , M.**, Tabibi , H., Nasrollahi , A., Hedayati , M., 2016. Effects of flaxseed oil on serum lipids and lipoproteins in hemodialysis patients: a randomized controlled trial, Iran J Kidney Dis. , 10 (6): 405-412.
- 86- **Zhanq , X.**, Wang , H., Yin , P., Fan , H., Sun , L., Liu , Y., 2017. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulationg gut microbiota in mice, Lipids Health Dis., 22;16(1):44.
- 87- **Ward , W.E., Yuan , Y.V., and Cheng , 2001.** U.L., Exposure to purified lignan from flax seed (L. usitatissimum) alters bone development in female rats. British Journal of Nutrition 86,499-505.
- 88- **Tabibi , H.**, Mirfatahi , M., Hedayati , M., Nasrollahi , A., 2017. Effects of flaxseed oil on blood hepcidin and hematologic factors in hemodialysispatients, Hemodial Int. , 21 (4): 549-556.

- 89- **Varghese , M.V.**, Abhilash , M., Alex , M., Paul , M.V.S., Prathapan , A., Raghu , K.G., Nair , R.H., 2017. Attenuation of arsenic trioxide induced cardiotoxicity through flaxseed oil in experimental rats, *Redox Rep.* , 22 (6): 346-352.
- 90- **Shuid , A.N.**, Mohamad , S., Muhammad , N., Fadzilah , F.M., Mokhtar , S.A., Mohamed , N., ve ark. 2011. Effects of alpha-tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing. *J Orthop Res.* 29:1732–1738
- 91- **Huo , M.H.**, Troiano , N.W., Pelker , R.R., Gundberg , C.M., Friedlaender , G.E., 1991. The influence of ibuprofen on fracture repair: Biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res.* 9(3):383–90.
- 92- **Hausman , M.**, Schaffler , M. B., Majeska , R. J., 2001. Prevention of Fracture Healing in Rats by Inhibitor of Angiogenesis, *Bone Volume* 29, 560-564.
- 93- **Urutia , J.**, Mardones , R., 2007. The effect of ketoprofen on lumbar spinal fusion healing in a rabbit model. *Journal Neurosurg spine*, 631-636.
- 94- **Kaygusuz , A.**, Ataşlı , N., Aydoğdu , İ., 1999. GM-CSF'nin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin rat tibiaları üzerinde araştırılması, *Acta Orth. Turcica*, 33:375-382.
- 95- **Cao , Y.**, Mori , S., Mashiba , T., 2007. $1\alpha,25$ -Dihydroxy- 2β (3-hydroxypropoxy)vitamin D3 (ED-71) suppressed callus remodeling but did not interfere with fracture healing in rat femora, *Bone* 40:132-139.
- 96- **Özan , F.**, 2006. Propolis'in Kırık İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Sivas, Türkiye, 82/48.
- 97- **Garrett , I.R.**, Boyce , B.F., Oreffo , R.O., Bonewald , L., Poser , J., Mundy , G.R., 1990. Oxygen derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 85(3): 632 - 639.
- 98- **Göktürk , E.**, Turgut , A., Bayçu , C., Günal , I., Seber , S., Gülbas , Z., 1995. Oxygen free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 66(5): 473 - 475.
- 99- **Pincemail , J.**, 1995. Free radicals and antioxidants in human diseases. Analysis of free radicals in biological systems, Basel, İsviçre: Birkhäuser, 83 – 98.
- 100- **Petrovich , Y.A.**, Podorozhnaya , R.P., Kichenko , S.M., Kozlova , M.V., 2004. Effects of selenium-containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. *Bull Exp Biol Med.* 137(1): 74- 77.

- 101- **Turgut A.**, Göktürk , E., Köse , N., Kaçmaz , M., Oztürk , H.S., Seber , S., Acar , S., 1999. Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 70(5): 487- 490.
- 102- **Yeler , H.**, Tahtabas , F., Candan .F., 2005. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochem Funct.* 23(2): 137 - 139.
- 103- **Kidd , P.M.**, 1997. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Reviews*, 2: 155-176.
- 104- **Reed , D.J.**, 2000. Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection, *Introduction to biochemical toxicology.* United States of America: Wiley and Sons Inc; 221-253.
- 105- **Frost , B.H.M.**, 1989. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Cl Orth Rel Res.*, 248: 294 – 309.
- 106- **Frieder , B.R.**, Graham , G.R., 2004. Ibandronate in osteoporosis: preclinical data and rationale for intermittent dosing; *Osteoporos Int.* 15: 423–433.
- 107- **Şener , N.**, Akman , Ş., Göğüş A., 2001. The effect of calcium sulfate on fracture healing in rat tibial fractures; *Acta Orthopædica Turcica.* 35: 431-437.
- 108- **Hebb , J.H.**, Ashley , J.W., McDaniel , L., et al, 2018. Bone healing in an aged murine fracture model is characterized by sustained callus inflammation and decreased cell proliferation. *J. Orthop. Res.* 36: 149–158.
- 109- **Türer , A.**, Durmuşlar , M.C., Şener , I., et al, 2016. The Effect of Local Rosuvastatin on Mandibular Fracture Healing. *J. Craniofac. Surg.* 27: e758–e761.
- 110- **Yu , M.**, Su , B., and Zhang , X., 2018. Morphologic and molecular alteration during tibia fracture healing in rat. 2: 1233–1240.
- 111- **Loi , F.**, Córdova , L.A., Pajarinen , J., et al, 2016. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 86: 119–130.
- 112- **Liu , X.**, McKenzie , J.A., Maschhoff , C.W., et al, 2017. Exogenous hedgehog antagonist delays but does not prevent fracture healing in young mice. *Bone* 103: 241–251. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2017.07.017>.
- 113- **Handool , K.O.**, Ibrahim , S.M., Kaka ,U., et al, 2018. Optimization of a closed rat tibial fracture model. 2018.
- 114- **Toscano , M.J.**, Booth , F., Wilkins , L.J., et al, 2015. The effects of long (C20/22) and short (C18) chain omega-3 fatty acids on keel bone fractures, bone biomechanics, behavior, and egg production in free-range laying hens. *Poult Sci.* 94(5):823-35.