1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kırık iyileşmesi güncel yayınlarda hala farklı süreçlerin değişkenliğinin koordinasyonunu içeren karmaşık bir olay olarak tariflenmektedir[1]. Birçok tıbbi gelişmeye rağmen kırıklar hala kaynama zorluğu, kaynamada gecikme veya kaynamama gibi sorunlara sebep olabilmektedir[2]. Kırık iyileşmesi biyolojisinde daha anlaşılması gereken noktalar mevcuttur.

Periferik sinir yaralanmaları da benzer şekilde dünyada ciddi sağlık sorunlarındandır. Periferik sinir rejenerasyonu geniş bir araştırma konusu olmakla birlikte sunulan çalışmanın amacına yönelik olarak sinir hasarı sonrası sinirde oluşan değişimler araştırılmış ve yaralanma sonrası nöronal hücre ölümünün mekanizmasının tam olarak anlaşılamadığı gözlemlenmiştir.

Kemikte tanımlanan sinir dokusunun fonksiyonları güncel birçok çalışmanın merkezinde yeralmaktadır. Literatürde periferik sinir hasarı, poliomiyelit, travmatik parapleji, serebrovasküler hastalık ve kafa travması gibi nörolojik patolojilerde değişken kırık iyileşmesi sonuçları rapor edilmiştir[3,4,5,6,7]. Kemikte sinir dokusunun sadece periostta olduğu düşünülürken kemiğin kendi nöral dokusu genelde ihmal edilir. Kronik bölgesel ağrı sendromuyla ilişkili Sudeck atrofisi, kafa travmalı hastalarda görülen heterotopik ossifikasyon, Charcot diyabetik nöroartropatisi gibi durumlar sinir sistemi ile kas-iskelet sistemi arasında bir etkileşim olması gerektiğine işaret etmektedir[8]. Uzun kemikler miyelinize olan ve olmayan sinir lifleri tarafından zengin bir innervasyona sahiptir[9,10,11]. Bu sinir liflerinin fonksiyonları ve sonlanmaları hala bilinmemekle birlikte sempatik sinirlerin kemiğin kan akımını düzenleyici rolleri bilinmektedir[9,12].

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörleri özetleyen tablolarda denervasyon da yer almaktadır. Bu bağlamda kemik dokusunun nörolojik innervasyonunda oluşan değişimlerin sözkonusu kırık iyileşme sürecine olan etkileriyle ilgili olarak literatürde deneysel birçok denervasyon sonrası kırık modelleri ve bu modellerde oluşan değişimlere ait yayınlar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan birçok denervasyon modellerinden biri de nörektomidir (Bir sinirin uzamında az ya da çok kesit yapılıp çıkarılması). Deneysel olarak siyatik sinir

nörektomisi ile siyatik ve periferik sinir (femoral sinir) nörektomilerinin kullanımı ve oluşan denervasyonun gerçekte total denervasyonu ne kadar simüle edebileceği ve bu denervasyon modellerinin bu sinirlerle ilişkili kemiklerde oluşturulan kırıklardaki iyileşme süreçlerine olan etkileriyle ilgili çalışmalar yayınlanmıştır.

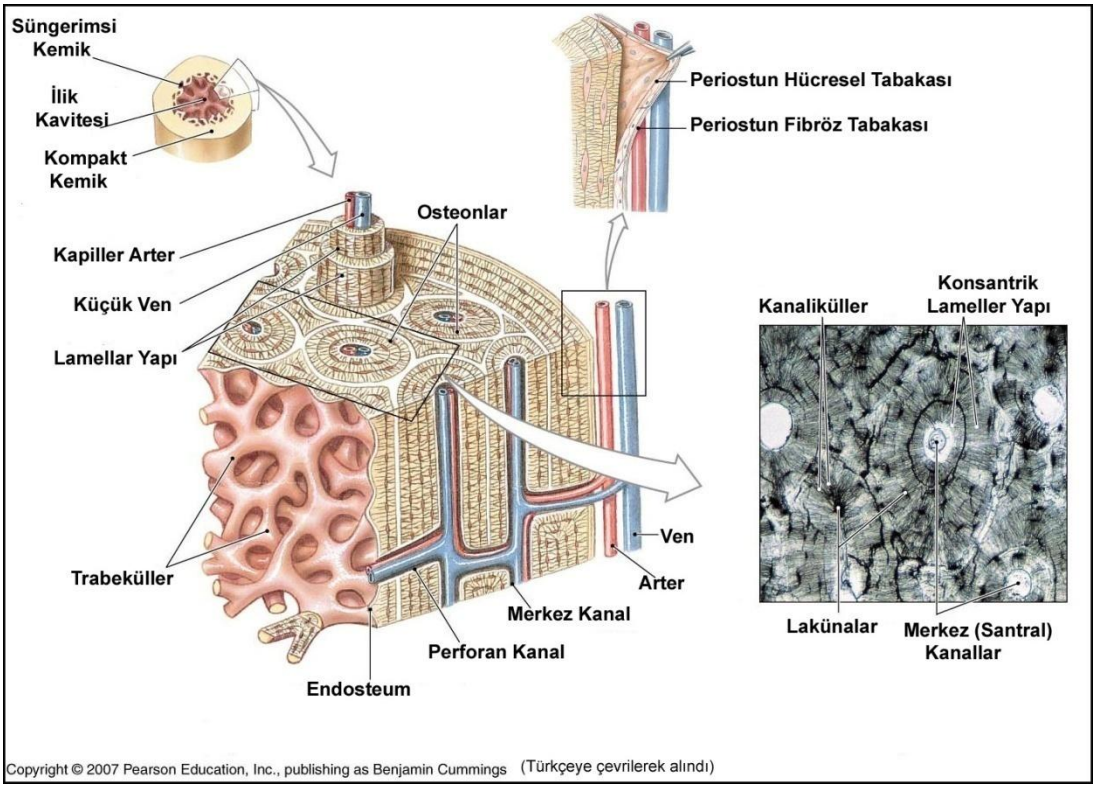
Periost ve kemikte sempatik ve sensorial sinir liflerinin ve kemik hücrelerinde de bunlara özgü bazı reseptörlerin varlığının iyi bilinmesine karşın periferik sinir sisteminin kırık sonrası kallus oluşumu ve maturasyonuna olan etki mekanizmaları hala net değildir[13]. Denervasyon oluşturularak incelenen kırık kalluslarında sinir dokusunun varlığına işaret eden growth-associated protein 43 (GAP 43), protein gene product 9.5 (PGP-9.5) gibi bazı nöromarkerlerin immünohistokimyasal analizine yönelik yöntemlerle nörolojik dokunun varlığı ve kallusa olan etkisi anlaşılmaya çalışılmıştır. Yakın zamanlı bir çalışmada ise deneysel olarak oluşturulan kırık kalluslarında kırık sonrası denervasyon olmaksızın bir reinnervasyon süreci tariflenmektedir[14].

Bu çalışmada 50 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan, üç çalışma grubuna ayrıldı. Tüm deneklerin aynı taraf femurlarında standart transvers diafiz kırığı oluşturulup intramedüller olarak tespit edildi. Takiben birinci grupta siyatik sinirin yapısal bütünlüğü korunurken ikinci grupta sinire nörektomi uygulandı. Üçüncü grupta ise önceki çalışmalardan farklı olarak deneklerde siyatik sinir kesisi yapıldıktan sonra sinirin proksimal ucu kırık hattına tespitlendi (sinir ucu interpozisyonu grubu, interpozisyon=iki şeyin arasında, araya girmiş). 28 günlük izlem sonrasında da oluşan kırık kallusu radyolojik, biyomekanik ve histopatolojik olarak değerlendirilerek hem denervasyonun kırık iyileşmesine olan etkisi, hem de sinir ucunun kırık hattına interpozisyonunun ne gibi bir fark oluşturacağı ve nöral dokunun kırık kallusuna olan etki mekanizmalarına ne gibi bir katkıda bulunacağı araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Yapısı

Kemik, genetik, damarsal, endokrin, beslenme ve travmaya bağlı faktörlere göre yapısal değişiklikler gösterebilen dinamik bir dokudur. Kemiğin primer yapısal birimine osteon adı verilir. Havers kanallarındaki kan damarları çevresinde tabakalar halinde yerleşim gösteren bu sisteme havers sistemi denir. Kemikler eklem yüzeyleri dışında periosteum adı verilen fibröz bir katman ile çevrelenir. Periost, kemiğin dış tabakasına kan ve lenf damarları ile sinirlerin geçişine olanak verir. Periostun dış tabakası sağlam kollajen liflerden oluşurken kambiyum adı verilen ve daha çok elastik lifler içeren fibröz katman damar yapılarından zengin olup içerdiği osteoblastlar sayesinde yeni kemik oluşumunda görev alır. Olgunlaşmamış kemikte periost kalın ve damarsal yapılardan zengin olarak kemiğe sıkıca yapışık durumdadır. Olgunlaşmış kemikte ise periost daha ince, damar yapısı ve osteoblast miktarı daha az sayıdadır. Kemik içi lakünaların iç yüzlerini örten retiküler bağ dokusu katmanına endosteum adı verilir. Endosteum kemik doku için yaşamsal önemi olan bir yapıdır. Gerek yeni kemik, gerekse kan hücrelerini oluşturma potansiyeli mevcuttur[15]. Her kemik iki tip doku içerir. Dış yüzde kompakt (sıkı) ya da kortikal kemik yer alırken iç yüzde kansellöz ya da spongiöz (süngerimsi) kemik kısmı yer almaktadır. Kortikal kemik, havers kanalları ile anastomoz yapan ve kan damarları içeren volkmann kanallarının içeriye doğru uzadığı dış tabakayı oluşturur. Havers kanallarından gelen kan, kanaliküller aracılığıyla osteositleri besler. Uzun kemiklerin osteonları kemiğin uzun aksına uygun şekilde dizilim gösterir. Kortikal kemik, Sharpey lifleri ile periosta sıkı sıkıya bağlı durumdadır, iç taraftaki kansellöz kemik ise yapısal olarak kortikal kemiğe benzer ve trabeküler şekildedir[15]. Olgunlaşmış osteonlar sadece kalınlaşmış trabeküllerde bulunur. Trabeküllerin iç yüzü istirahat halindeki osteoblastlarla kaplıdır (Şekil 1).

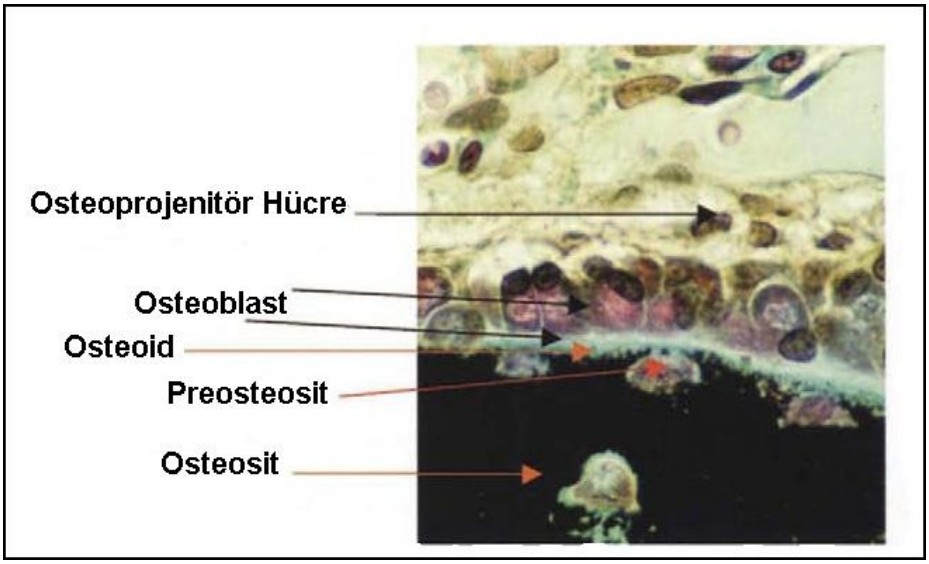


Şekil 1: Kemiğin yapısal birleşenleri

Olgun lameller kemiğin % 7'sini su ve % 93 kadarını solid materyal oluşturur. Solid kısmın da % 70'i inorganik madde, kalan kısmı da organik maddeden oluşmaktadır[16]. Canlı kemik dokusu organik matriks ve bu yapı içinde yer alan osteoblastlar, osteoklastlar ve kalsiyum tuzlarından oluşur. Organik matriks, kollajen fibrillerle bunların arasını dolduran glikozaminoglikanlardan oluşur. Henüz kalsiyum tuzları ile sertleşmemiş (kalsifiye olmamış) dokuya osteoid adı verilir.

Organik matriks sentezinden osteoblastlar sorumludur. Osteoprojenitör hücre ailesinden köken alırlar[17] (Resim 1). Kendi oluşturdukları matriks tarafından çevrelenmiş osteoblastlara ise osteosit adı verilmektedir[18]. Osteositler mineralize kemik matriksine gömülü iğsi şekilli hücrelerdir[19,20]. Kemik dokusunun içinde osteositler adeta hücresel bir şebeke organizasyonundadır. Kendi aralarında protoplazmik uzantılarla etkileşimde bulunan bu hücreler genellikle kemiğin mekanik ve mikroçevresel değişimlere yanıtı olan remodelizasyonunun düzenlenmesine katkıda bulunurlar. Birçok çalışmada osteositlerin kemik remodelizasyonunda, osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin düzenlenmesinde bir orkestra şefi gibi planlayıcı olduğu

desteklenmektedir[20,21,22]. Ayrıca osteositler kemik mineral dengesinin kontrolünde de rol almaktadır. Osteositik osteoliz hipotezine göre osteositlerin özellikle bazı patolojik koşullarda kemik matriksini mobilize ederek metabolizmanın ihtiyacına göre eksiltme ve yerine koyma yeteneği vardır[23].



Resim 1: Osteoprojenitör hücrelerin osteoblast ve diğer hücrelere farklılaşması (Lian JB, Stein GS. Osteoblast Biology. In Marcus R, Feldman D,Kelsey J (ed). Osteoporosis. Third Edition. San Diego, CA: Academic Press 2008;93-150. Türkçeye çevrilerek alındı.)

Osteoid yapının içine kalsiyum tuzlarının çökmesi ile organik matriks sertleşir ve böylelikle mekanik direnç karşısında kemiğin dayanma gücü artar. Osteoblastlar tarafından sentezlenen alkalen fosfataz enzimi ara madde içinde birikerek kalsiyum tuzlarının fosfat grupları ile birleşmesi sonucunda kemiğin mineralizasyonu gerçekleşir. Kemiğin inorganik mineral bileşimi kalsiyum fosfat yapısında olup canlı kemik dokusunda hidroksiapatit kristalleri şeklinde yer alır.

Temelde kemik yıkımından sorumlu olan osteoklastlar, hematopoetik kök hücrelerden köken alırlar[24].

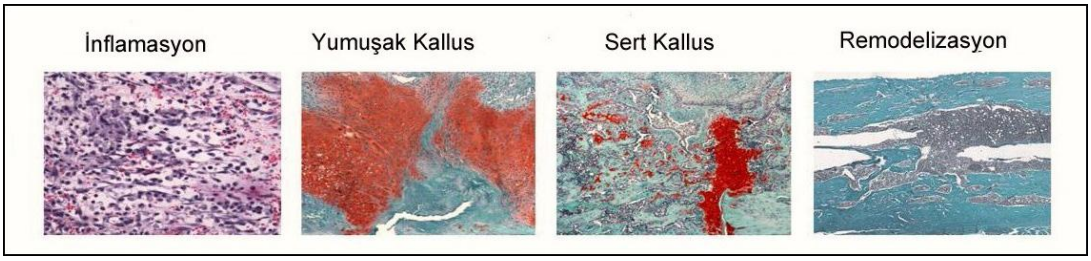
2.2. Kırık İyileşmesi (Kemiğin Hasarlanmaya Yanıtı)

Dıştan veya içten gelen zorlanmalarla kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasına kırık denir[25]. Kemik dokusu vücuttaki diğer dokulara kıyasla rejenerasyon (kendini yenileme) kabiliyeti önceden tahmin edilebilen yegâne

dokudur[26]. Kırık iyileşmesinin diğer doku iyileşmeleriyle kıyaslandığında en göze çarpan özelliği oluşan onarım dokusunun skar olmaksızın birinci sınıf bir kemik doku olmasıdır. Bu bağlamda rejenerasyon tabiri bu süreci onarım tabirinden daha iyi tariflemektedir. Tabi bu durum hasarsız bir kemiğin sahip olduğu kadar bir remodelizasyon kapasitesine de bağlıdır[27].

Kırık iyileşmesi farklı araştırmacılar tarafından farklı evrelerle tariflenmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda iyileşme morfolojik (inflamasyon, yumuşak kallus, sert kallus, remodelizasyon), biyokimyasal (mezenkimal, kondroid, kondroosteoid, osteojenik) ve biyomekanik evrelerle tariflenebilir[28].

Geleneksel olarak uzun kemik kırıklarının iyileşmesi iç içe geçmiş dört fazda tariflenmekle birlikte bu tablo çoğunlukla iyi yumuşak doku örtüsü olan düşük enerjili kırıkların klinik ve deneysel histolojik gözlemlerine dayanmaktadır. Bu dört fazlı model kırık onarımı esnasındaki kemiğin yeniden şekillenmesi (remodelizasyonu) açısından sadece bir başlangıç noktası teşkil etmektedir[27]. (Resim 2)



Resim 2: Kırık iyileşmesinin fazları (Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Semin Cell Dev Biol 2008;19(5):459-466. Türkçeye çevrilerek alındı.)

Bu fazların her biri kendine özgü hücresel ve moleküler olaylar grubudur. Hücresel düzeyde inflamatuar hücreler, vasküler hücreler, osteokondral prekürsör hücreler ve osteoklastlar kilit rol oynarlar. Moleküler düzeyde ise üç ana faktör tariflenmiştir; proinflamatuar sitokinler ve büyüme faktörleri, proosteojenik faktörler ve anjiyogenetik faktörler. Bu faktörler ilgili hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını stimüle etmektedir. Ekstraselüler matriks oluşumunda ise faz 1'de tip III kollajen, faz 2'de tip II kollajen, faz 3 ve 4'de de tip I kollajen hâkimdir[29].

Faz 1: Hematom (inflamasyon, granülasyon) fazıdır. Kırık oluşumunu takiben o bölgede yumuşak doku bütünlüğü, normal damarsal fonksiyon ve kemik iliği mimarisi bozulmaktadır. Bu hasar organizmanın tüm dokulardaki ortak yara iyileşme mekanizmasındaki gibi tetik bir faktör olarak trombositlerin, makrofajların ve diğer inflamatuar hücrelerin (granülositler, lenfositler ve monositler) aktivasyonuna sebep olarak ortama platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β), fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), makrofaj koloni stimüle faktörü (M-CSF), interlökin-1 ve interlökin-6 (IL-1 ve IL-6), kemik morfojenik protein (BMPs) ve tümör nekrozis faktör (TNF) gibi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınmasını sağlar. Bu faktörler pozitif bir geri besleme mekanizmasıyla ilave inflamatuar hücrelerin olaya iştirakını kolaylaştırır ve süreç multipotent mezenkimal kök hücrelerin olay yerine göçetmesi ve yayılmasıyla sonuçlanır. Kök hücreler periost, kemik iliği, kan dolaşımı ve ilgili alanı çevreleyen yumuşak dokulardan köken alır[1].

Faz 2: Yumuşak kallus oluşumu (çoğalma) fazıdır. Kıkırdak oluşumu ve mevcut damarlardan yeni kapillerlerin oluşumu (anjiyogenezis) evresidir. Bu fazda hücresel düzeyde kondrosit ve fibroblast hâkimiyeti olmakla birlikte farklı kırık tiplerinde farklı hücre hâkimiyetleri görülebilir. Bu hücreler kırık hattına mekanik destek sağlayan yarı sert yumuşak kallusu üretirler. Oluşan kıkırdak kallus esasen avasküler (damarsız) özellikte olmasına rağmen takip eden üçüncü fazda oluşan örgülü (woven) kemik vasküler invazyonlar (damarsal yayılım) içermektedir. Mezenkimal kök hücrelerden farklılaşan kondrositler faz 1'de oluşan fibröz granülasyon dokunun yerini alacak kıkırdak matriksi sentezler. Eğer bu sentez yetersiz kalırsa alan fibroblast hücreleri tarafından üretilen yaygın fibröz dokuyla dolar. Üretilmiş ayrı kıkırdak bölgeleri ilerleyici şekilde büyüyerek kırık uçları arasında merkezi bir fibrokartilaj tıkaç oluşturmak üzere birleşirler. Son olarak kondrositler apopitozise (programlı hücre ölümü) gitmeden hemen önce hipertrofiye olarak kıkırdak matriksi mineralize ederler (Faz 3). Fibroblast çoğalması ile kondrosit çoğalması ve farklılaşması arasındaki denge moleküler düzeyde birçok büyüme faktörü ve sitokinin birbirleriyle koordine uyarımlarına bağlıdır.

Aynı şekilde yumuşak kallusa vasküler endotel hücreleri ve yeni oluşan kapillerlerin yayılımı da (anjiyogenezis) ilgili moleküler uyarımların koordinasyonuyla sağlanır[1].

Faz 3: Sert kallus oluşumu (olgunlaşma) fazıdır. Mevcut kıkırdak taslağın mineralizasyonu sonucu (enkondral kemikleşme) örgülü kemik oluşur[15]. Bu faz kemik oluşumunun en aktif fazıdır. Yüksek düzeyde osteoblastik aktivite ve mineralize kemik matriksi oluşumuyla karakterizedir. Bu fazda osteoblastlar hızlı bir şekilde organize ama mekanik olarak zayıf olan örgülü kemiği üretirler. Buna rağmen örgülü kemiğin köprüleşmesi klinik olarak kaynamayı ifade etmektedir. Oluşan sert kallus tipik olarak düzensiz ve remodelizasyondan yoksundur. İntramembranöz (mezenkimal) kemikleşme mekanizması ile iyileşen kırıklarda ise sert kallus faz 2'deki kıkırdak taslak oluşumu olmaksızın damardan zengin bağ dokusunun direkt mineralizasyonuyla da oluşabilir[15]. Bu duruma pratikte kırıkların cerrahi olarak sert iç sabitlenmesi sonrası (rijit internal fiksasyon) ve vücuttaki yassı kemiklerin fizyolojik gelişim süreçlerinde rastlanır. Oluşan örgülü kemik matriksi, proteinden zengin ve mineralize hücre dışı bir matriks formundadır ve osteojenik faktörlerin etkisinde kalan osteoprojenitör hücrelerin farklılaşmasına ikincil olarak oluşan olgun osteoblastlar tarafından üretilmiştir. Kemik morfojenik protein ailesi (BMP) bu süreçte kritik aracı bir rol oynar[1]. Diğer büyüme faktörlerinin de bu süreçte bir artışı olmakla birlikte osteoprojenitor hücre çoğalması ve farklılaşmasına olan etkileri net olarak açıklanamamıştır.

Faz 4: Remodelizasyon (yeniden şekillenme) fazıdır. Kırık onarımının bu final fazı örgülü zayıf kemiğin sert kallusunun osteoblastik kemik oluşumu ve osteoklastik kemik rezorbsiyonu (yıkımı) dengesiyle orijinal kortikal ve trabeküler kemik konfigürasyonundaki güçlü lameller kemik haline dönmesini kapsar. İkincil kemik oluşumu olarak da isimlendirilebilir. Yeni damar oluşumu süreci (anjiyogenezis) bu fazda da devam etmektedir. Bu fazın kilit hücresi mineralize kemiği rezorbe eden osteoklastlardır. Osteoblastlar tarafından salgılanan iki ana sitokinin osteoklastları uyarması bu fazda kritik bir öneme sahiptir. Bu sitokinler makrofaj-koloni stimüle faktör (M-CSF) ve NFkB Ligand

Reseptör Aktivatörü (RANKL)'dür. M-CSF'ün önemi hematopoetik kök hücrelerin osteoklastlara farklılaşması için birincil uyaran olmasıdır[1]. RANKL ise olgun osteoblastlar tarafından üretilen ve kemik oluşumu-yıkımı arasındaki dengenin koordinasyonundan sorumlu olan faktördür[1]. Diğer büyüme faktörleri ve sitokinlerden TNF-α, BMPs ve TGF-β'nın da osteoklastların oluşumunu tetiklediği bilinmektedir. Osteoklastların farklılaşmasını ve çoğalmasını düzenleyen bu moleküler süreçler bazı genetik hastalıklarda ve kemik erimesi hastalığının (osteoporoz) tedavisinde kullanılan ilaçlarda hedef mekanizmalar olmaktadır.

Radyolojik ve histolojik olarak da kırık açıklığı köprülenmesi hayvan modellerinde üç şekilde tariflenmiştir[27].

i) İnterkortikal köprüleşme (primer kortikal kaynama): Kırığın cerrahi olarak sert iç sabitlenmesi sonrasında görülür.

ii) Periosteal köprüleşme (External kallus oluşumuyla kaynama): Periosttan yeni kemik oluşumu vardır. Kırık hattının minimal hareketleri bunu tetikler. Kırık kapalı yöntemle, ameliyatsız tedavi edilirse veya intramedüller cerrahi tespit sonrası görülür.

iii) İntramedüller köprüleşme (endosteal kallus): Periosteal köprüleşme başarısızlığına ikincil (sekonder) kaynama gecikmesinde görülür. Kaymamış (nondeplase) kırıkların çok erken evresinde de görüldüğü tariflenmiştir.

2.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kırık onarımının kalitesi birçok faktör tarafından değişen oranlarda etkilenmektedir. Bu faktörler yerel (lokal) veya genel faktörler olarak tariflenebilir[30].

Yerel Faktörler: Kırılan kemiğin türü, kırık bölgesindeki kan dolaşımının durumu, yerel bir iltihap varlığı, kırık uçlarının birbirine göre konumu, kırığın eklem içi veya eklem dışı olması, yerel patolojik koşullar, kırık çizgisinin özelliği, kırığın kemik stimülasyonu (elektrik akımı[31], elektromanyetik akım[31,32], ultrasonik sinyal[33]) ile tedavisi, hatalı kırık tedavisi, kırığa eşlik eden yumuşak doku yaralanması, kırığın açık veya kapalı kırık olması ve kırık alanıyla ilişkili sinir dokusu hasarına ikincil olarak oluşan kırık denervasyonu sayılabilir[13,34,35,36,37,38,39].

Genel Faktörler: Yaş, tıbbi genel durum, organizmanın hormonal durumu, kırık sonrası rehabilitasyon süreci, bireyin kullandığı medikal ajanlar ve hiperbarik oksijen tedavisi alımı sayılabilir.

Kırığın kaynaması önceden öngörülebilse de garanti edilememektedir. Ayrıca gecikmiş kırık kaynaması ya da kaynamama gibi süreçleri objektif olarak değerlendirmek pratikte bazen güç olmaktadır. Bu bağlamda patolojik süreçlerin olumsuz etkilerini anlayabilmek açısından özellikle gecikmiş kırık iyileşmesine sebep olan faktörlere hastanın sistemik statüsü, kırıktan etkilenen ekstremitenin (uzuv) hasar öncesi yerel statüsü, kırığa sebep olan travmatik hasarın doğası, organizmanın hasara verdiği yerel cevap, tedavi sürecine bağlı negatif etkiler, farmakolojik faktörler şeklinde bir tablo ile bir ikinci yaklaşım yapılabilir[28].

BİREYİN SİSTEMİK DURUMU

1) Cinsiyet: Erkek ve kadın cinsiyet arasında kırık iyileşme süreci açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

2) İleri yaş: Periostta çocukluk çağında fonksiyonel hücre sayısı ve damarlanma daha fazlayken ileri yaşta büyük, fibröz, uyku halinde osteoblastik hücreler içeren tek bir kambiyum tabakası gözlenir.

3) Malnütrisyon (kötü beslenme): Tek bir uzun kemik kırığı hastanın metabolik gereksinimi % 20-25 artırır. Kalsiyum ve fosfor kayıpları kallus matriksinin mineralizasyonunu ve dolayısıyla kırık kaynamasını azaltır.

4) Anemi: Anemik farelerde deneysel olarak kemik iyileşmesinde anlamlı azalma ve % 33 gibi oranlarda kaynamama gözlenmiştir. Bu değişimler parsiyel oksijen basıncı değişiklikleriyle ilişkili görünmektedir.

5) Diabetes Mellitus: Muhtemelen damar, sinir dokularına verdiği hasar ile hastanın beslenmesini olumsuz etkilemesi bu hasta gruplarında kırık iyileşmesindeki gecikmeyi açıklamaktadır.

6) Hormonal kayıplar: Klinik bir çalışmada büyüme hormonu (GH) kaybının gecikmiş kaynamaya sebep olduğu gösterilirken deneysel başka bir çalışmada da farelerde ovarektomiye sekonder östrojen kaybında da benzer sonuç gösterilmiştir.

İLGİLİ UZVUN YEREL DURUMU

1) Azalmış parsiyel oksijen basıncı: Önceden geçirilmiş cerrahi, radyasyon, vasküler hastalık buna yatkınlık oluşturabilir.

2) Kas dokusu kalitesi ve yağ dokusu oranı: Özellikle postmenopozal dönemdeki obez kadınlarda humerus kırıklarında bu faktörler kaynama gecikmesine yatkınlık oluşturur.

TRAVMATİK HASARIN DOĞASI

1) Kırık lokalizasyonu: Eklem dışı metafiz kırıkları, diafiz kırıklarından daha çabuk iyileşirken humerus, talus, skafoid ve tibia kırıkları diğer kemiklere göre daha zor iyileşir.

2) Yüksek enerjili travmaya ikincil olarak yaygın yumuşak doku hasarı

3) Enfeksiyon

4) Sinir hasarı: İmmünohistokimyasal olarak kırık kallusunda yedinci günde sinir dokusu elemanlarının ortaya çıktığı ve 14-21 günler arasında da periostta sinir liflerinin varlığı gösterilmiştir[14]. Bazı yayınlarda kırık iyileşme sürecinin sözkonusu kırık sahasıyla ilişkili sinir dokusunun hasarlı olmasıyla olumsuz etkilendiğine işaret edilmektedir[35,36,37,38,39].

HASARA YEREL KONAK CEVABI

1) Erken hasar anı: Başlangıçta kemiğe olan travmanın enerjisi kırık oluşturmak için yeterli olursa kemik doku tarafından üretilen biyoelektrik potansiyeli tarafından kan akımını kırık alanına yönlendirilir. Tüm canlı dokuların elektriksel özellikleri vardır. Sağlam kemik elektropozitif, hasarlı kemik dokusu (kırık uçları) ve büyüme faaliyeti gösteren kemik elektronegatiftir. Dokulara mekanik güç uygulanması onların bu elektrik özelliklerinde değişimlere sebep olur. Buna gerim ilişkili potansiyeller denir. İki tipi vardır; piezoelektrik (kollajen matriksin deformasyonuyla oluşur) ve akım potansiyelleri (matriks moleküllerindeki iyonik akımın mekanik etki altında değişimiyle oluşur)[33].

2) Büyüme faktörleri ve sitokinler: TGF, FGF, PDGF gibi moleküller anjyiogenezisi ve mitogenezisi başlatır ve hücrelerin göçünü, farklılaşmasını ve çoğalmasını tetikler.

3) Kemik morfojenik protein (BMP): Olgun osteoblastların mineralize kemik matriksi üretmesinde kritik aracı bir rol oynarlar.

4) Prostoglandinler: Kemik yapımı ve yıkımı süreçlerinde çeşitli reseptörler aracılığıyla çok fonksiyonlu bir düzenleyici rolleri olmakla birlikte etki mekanizmalarına özgü yollar hala netlik kazanmamıştır.

5) Kollajen: Stabil kırıklarda tip I-II ve V kollajen hâkimken instabil kırıklarda tip III ve V kollajen hâkimdir. Tip III kollajen kırığın erken iyileşme evresinde hâkimdir. Üretimindeki aşırı artış gecikmiş kaynama ve kaynamama sebebidir. Deneysel kaynamama modellerinde kallus mineralizasyonunun üçüncü haftada durduğu ama kollajen sentezinin yedinci haftaya kadar artıp sonra sabit kaldığı saptanmıştır. Sağlıklı bir kaynamada ise kollajen sentezinin üçüncü haftaya kadar artış gösterip üçüncü haftada sabit kaldığı ve takiben mineralizasyon artışı başladığı saptanmıştır.

6) Mineralizasyon sürecinde aksama

TEDAVİ SÜRECİNE BAĞLI NEGATİF ETKİLER

1) İyatrojenik (doktor hatası): Yanlış yerden cerrahi insizyonla giriş, gereğinden fazla periostu sıyırma, açık kırıklarda aşırı irrigasyon

2) Açık cerrahi

3) Kırık uçların aşırı hareketi: Yetersiz tespit sonrası görülebilir.

4) Kemik çimentosu

5) Allogreftin immünolojik olarak reddi

6) Radyasyon

7) Gecikmiş tanı, kırık bölgenin uygun olmayan manipülasyonları

FARMAKOLOJİK FAKTÖRLER

1) Kortikosteroidler: Mezenkimal hücrelerin osteoblasta farklılaşmasını baskılayarak kemik erimesine neden olurlar.

2) Antikoagülanlar: Heparin ve kumadin, kırık hattında pıhtı oluşumunu engellediklerinden hücre sayısını azaltıcı ve normal metabolik süreçleri olumsuz tetikleyici etkileri vardır.

3) Nonsteroid antienflamatuar ajanlar (NSAİ): İndometazin ve aspirin kırık hattındaki yerel kan akımını azaltır ve öncü osteoblastları engeller. Kollajen sentezine etkileri yoktur.

4) Antibiyotikler: Siprofloksasinin kondrotoksik etkisi iyi bilinmektedir.

5) Kemoterapötik ajanlar: Doxorubisin ve metotreksat kıkırdak matriks üretimini geciktirir.

6) Sigara: Kırık iyileşmesi sürecinde hücre çoğalmasını baskılayıcı ve onarım süreci için önemli olan kanlanma miktarını da vazokostriksiyon yapmak suretiyle azaltıcı etkileri vardır. Spinal füzyon cerrahisinde sigaranın olumsuz etkileri iyi tanımlanmıştır.

2.4. Nöroosseöz (Sinir sistemi ile Kas-İskelet Sistemi Arası) Sinyal İletimi[8]

Sinir dokusu periostta bulunur ve nutrisyen(besleyici) arterler eşliğinde haversian kanalların perivasküler boşluğuna uzanır. Özellikle kemiklerin epifiz, metafiz ve büyüme fizisleri gibi metabolik açıdan aktif alanlarında yoğunluk gösterirler. Nörolojik sinyaller sinir-sinir ve sinir-hedef organ arasında sinapslar aracılığıyla iletilirler. Kemik doku bileşenlerinde ise (osteoblast,osteoklast,osteosit) klasik sinaps varlığı gösterilememiştir. Bununla birlikte sinir lifleri ve nöromarkerlere özgü ve biyokimyasal olarak aktif reseptör varlığı kemik hücrelerinde mevcuttur. Nöromarkerler bu reseptörler aracılığıyla kemik dokusunda metabolik yanıtlara sebep olurlar. Bunlar;

1) Glutamat: Santral-periferik sinir sistemi arasındaki iletimdeki major nörotransmitterdir(nrt) ve kemik dokusunda identifiye edilmiştir.2 tip reseptöre sahiptir, iyonotropik ve G proteini bağımlı. İyonotropik reseptörlerinden biri NMDA'dır. Osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler NMDA reseptörleri ekspresse edebilirler. Glutamat bu reseptörler aracılığıyla osteoblastların çoğalma ve aktivite artışına sebep olurken osteoklastların kemik rezorbsiyonunu inhibe edici etkiye sahiptir.

2) Kalsitonin gen related peptid (CGRP): Periferik sinir sisteminde A-delta ve C liflerinde (major periferik d lifler) bulunurken kemikte periost, kemik iliği ve epifiz trabeküllerinde bulunur. Kemikte serbest sinir sonlanmaları şeklinde prezente olur ve kemikten santral sinir sistemine duyusal ileti taşır. Kültüre osteoblastlarda cAMP'yi artırır, insülin benzeri büyüme faktörünü artırır, tümör nekrozis faktörü azaltır, osteoklast rezorbsiyonunu direkt etkiyle

azaltır.Sonuç olarak net etki kemik oluşumunu artırma, yıkımını azaltma şeklindedir.

3) Substans P: Nosiseptif (ağrı) sinyal molekülüdür. Hem osteoblastik, hem de osteoklastik aktiviteyi artırıcı (nörokinin I reseptörü üzerinden) etkisi vardır.

4) Vazoaktif intestinal peptid (VİP): Sıklıkla parasempatik sinir lifleriyle ilişkilidir. Etkileri ve reseptör kompleksleriyle ilgili çalışmalar devam etmektedir. İyi bilinen etkisi osteoklast oluşumunu azaltmasıdır.

5) Katekolaminler: Tirozin hidroksilaz, katekolamin sentezinde kilit enzimdir ve sempatik sinir sisteminde sinir uçlarında yerleşiktir. Bu enzimin immünolokalizasyonunda kemikte sempatik adrenerjik sinir lifleri identifiye edilmiştir. Osteoblastlarda beta-2 adrenerjik reseptörler gösterilmiştir. Ayrıca noradrenalin alfa-1 reseptörleri üzerinden osteoblastik oluşumu artırır. Leptin molekülü metabolik olarak osteopeni ve kaşeksiyi tetiklemektedir. Adrenerjik sinyaller hipotalamusta leptin oluşumunu ve dolayısıyla osteoporozu tetiklemektedir. Bu sebeple beta-blokerlerin osteoporozu engelleyici ajan olarak kullanılmasına dair çalışmalar vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı Modeli

Bu çalışmada yaşları 12-14 hafta arasında değişen erkek cinsiyette, ağırlıkları 240 gram ile 340 gram arasında değişen (ortalama 299 gram) 50 adet Wistar-Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yapıldı. Deney hayvanları çalışmanın yapıldığı birimden temin edildi. Deney hayvanları standart laboratuvar diyeti ve musluk suyu ile beslendi ve tel kafeslerde 12 saat karanlık,12 saat aydınlık süreçlerde her bir kafeste beş adet hayvan kalacak şekilde ve kafesler birbirini görecek şekilde barındırıldı. Kafeslerde yataklık olarak yonga talaşı kullanıldı. Çalışma sırasında üç denek cerrahi işlem sonrası ilk üç günde öldü, iki denek ise yara yeri enfeksiyonu sebebiyle çalışmadan çıkarıldı ve çalışma 45 adet denek ile çalışmanın standart prosedürlerine göre tamamlandı.

Bu çalışma için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu'ndan 13.03.2008 tarihinde 2008-13 numaralı sayı protokolü ile onay alındı.

3.2. Çalışma Grupları

45 adet deney hayvanı her bir grupta 15 adet olmak üzere randomize olarak üç gruba ayrıldı. Grupların hepsinde deneklerin önceden intramedüller olarak tespitlenen sağ femur diafizlerinde standart transvers kırık oluşturuldu. Farklı olarak birinci grupta siyatik sinir bütünlüğü korundu. İkinci grupta siyatik sinire 15 milimetre (mm) rezeksiyon uygulandı. Üçüncü grupta ise siyatik sinire kırık hattı seviyesinde enine tam kat kesi ile keskin yaralanma modeli uygulanarak sinirin proksimal parçası serbest sinir ucundan kırık hattına tespitlendi (sinir ucu interpozisyonu). Sinirin distal parçası ise geniş olarak eksize edildi (Şekil 2).Her çalışma grubunun barındırıldığı tel kafesler numaralandırılarak gruplar kendi aralarında izole edildi.

Şekil 2: Çalışma gruplarının temsili gösterimi (siyatik sinir gri renk ile, femur kahverengi renk ile belirtildi)

3.3. Cerrahi Prosedür

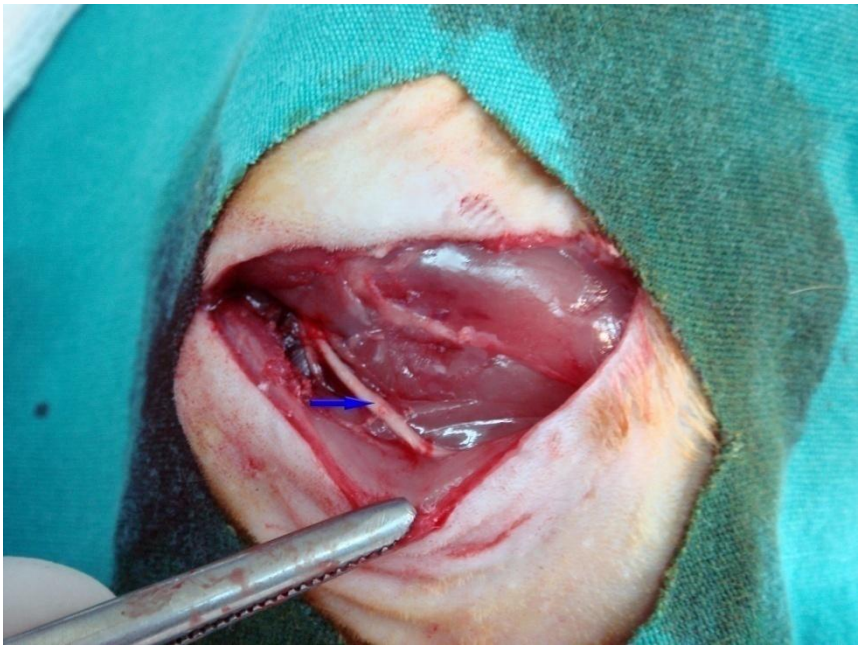
Cerrahi işlem öncesi deneklere 100 mg Ketamin Hidroklorür aktif maddesi içeren Ketalar (Eczacıbaşı Warner Lambert) 100 mg/kg dozunda ve Xylazine (Rompun Bayer, İstanbul) 10 mg/kg dozunda subkutan olarak verilerek anestezi uygulandı. Antibiyobik profilaksisi olarak tek doz Ampisina 50 mg/kg subkutan verildi. Takiben deneklerin sağ uylukları klorheksidin ile temizlenip traş edildi (Resim 3). Cerrahi kesi yapılacak alan povidon iyodür (Batticon, ADEKA, Türkiye) ile boyanmak suretiyle dezenfekte edilerek cerrahi olarak örtüldü (Resim 4).

Resim 3: Uyluğun traş edilmesi

Resim 4: Cerrahi sahanın örtülmesi

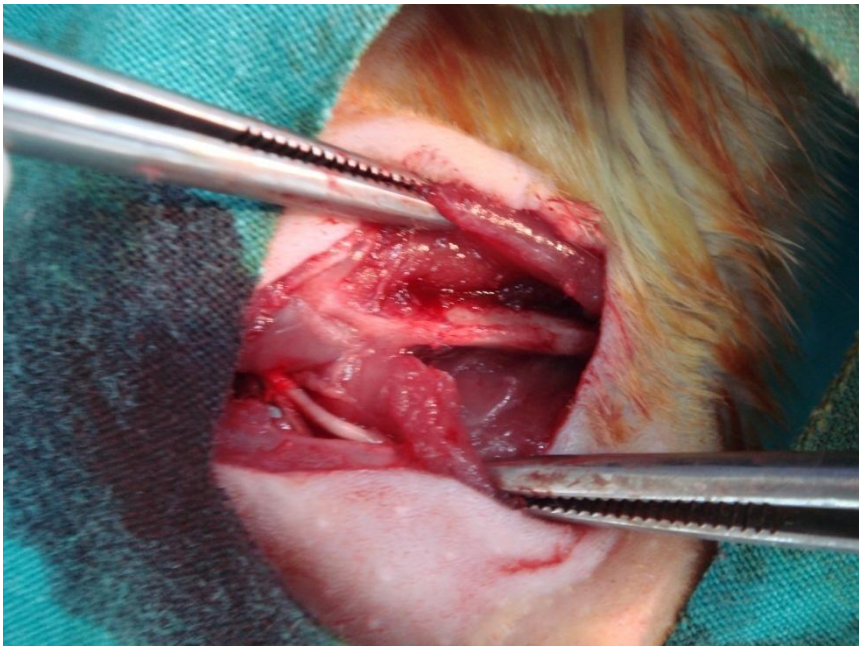
Deneklerin sağ uyluk dış kısmından femur uzun aksına paralel cilt insizyonuyla girilip gluteal kas ilk insizyona paralel kesilerek siyatik sinire ulaşıldı (Resim 5, Resim 6).

Resim 5: Cilt insizyonu



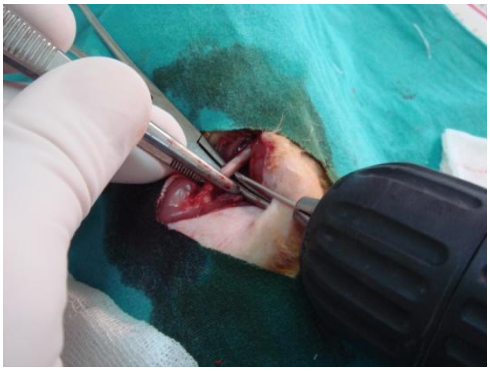
Resim 6: Siyatik sinirin görünümü (mavi ok ile işaretli kısım)

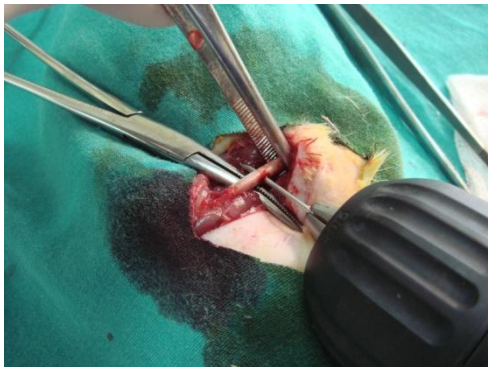
Takiben femur diafizi bitişik kas dokulardan künt diseksiyonla ayrılarak ortaya konuldu (Resim 7).



Resim 7: Femur diafizinin ortaya konulması

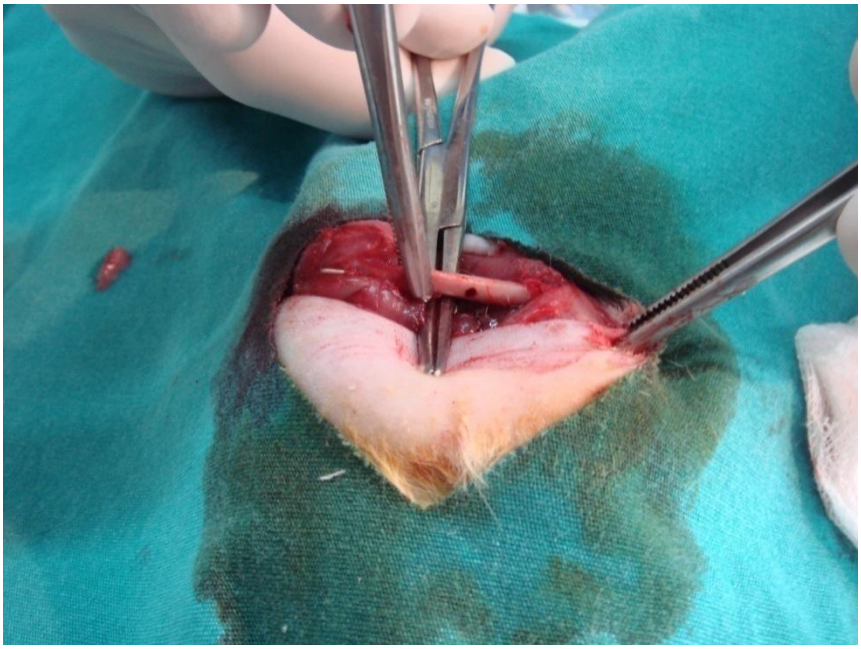
Femur diafizinin orta 1/3 seviyesinden 1 adet 1,4 mm (milimetre) kalınlığında Kirschner teli transvers olarak geçilerek hem oluşturulacak kırıkların seviyelerinin belirlenmesi, hem de kemik forsepsinin standart transvers kırıkları daha efektif olarak oluşturması amaçlandı (Resim 8, Resim 9).





Resim 8, Resim 9: Daha kalın kirschner teli ile oluşturulacak kırık hattında transvers delik açılması

Femur proksimalinden 1 mm kalınlığında Kirschner teli motorlu matkap yardımıyla intramedüller olarak yollanıp telin kemiğin üst ucunda kalan kısmı 1-2 milimetre dışarıda kalacak şekilde kesildi (Resim 10).

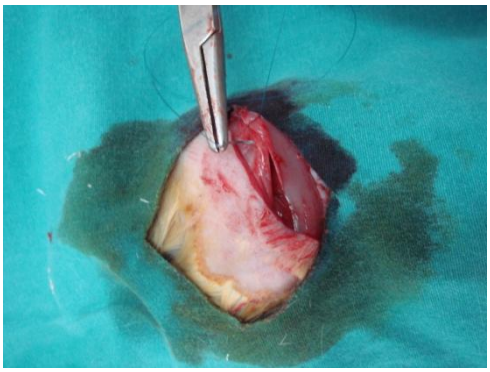


Resim 10: İntramedüller tespit aşaması

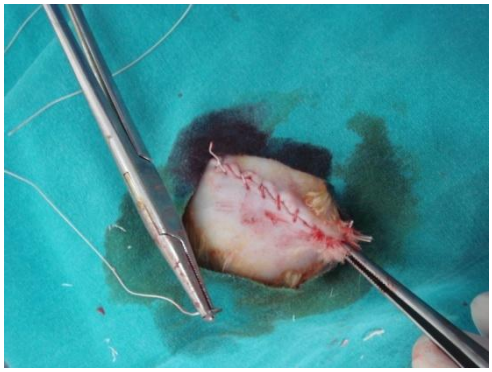
Femur diafizinde önceden açılmış olan transvers delik seviyesinden bir kemik forsepsi yardımıyla standart transvers diafiz kırığı oluşturuldu (Resim 11).

Resim 11: Femurun intramedüller tespitlenmesi ve ardından standart transvers diafiz kırığı oluşturulması sonrası siyatik sinir komşuluğundaki görünümü

Tüm deneklerde katlar fasia ve cilt olmak üzere 2 tabaka olarak kapatıldı (Resim 12, Resim 13). Yara yerine povidon iyodür ile pansuman yapıldı.

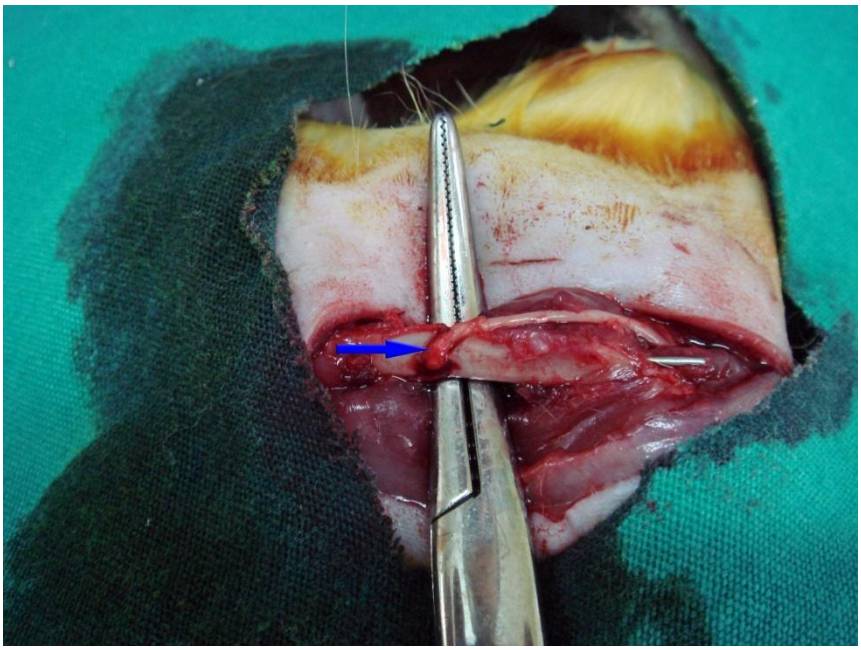


Resim 12: Fasianın kapatılması



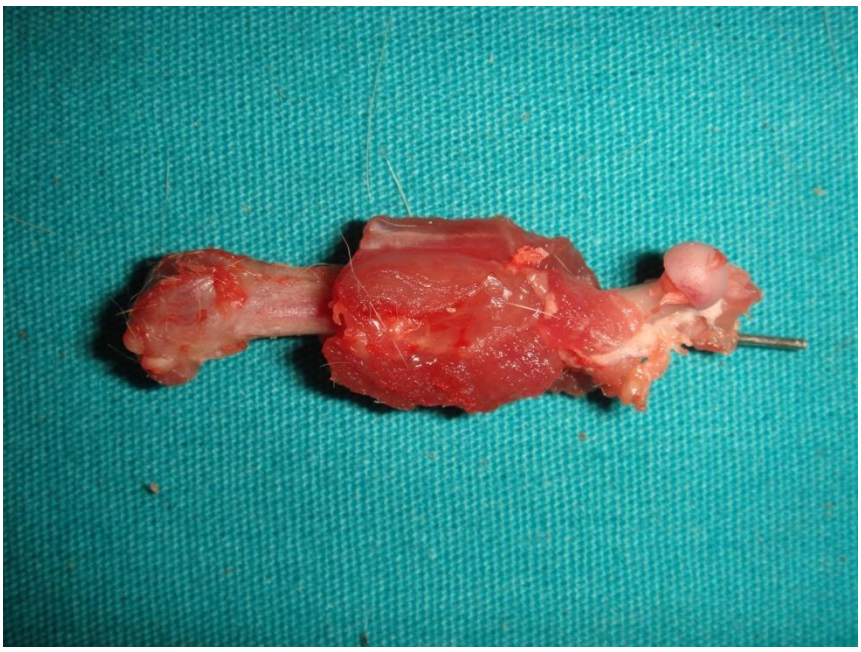
Resim 13: Cildin kapatılması

Birinci çalışma grubunda siyatik sinirin yapısal bütünlüğü korundu. İkinci grupta siyatik sinire 15 mm rezeksiyon yapılarak denervasyon amaçlandı. Üçüncü grupta ise siyatik sinire aşırı gerilmeyi engellemek amacıyla kırık hattının yaklaşık 5 mm distalinden 15 numara bistüri ile keskin yaralanma modeli uygulandı. Takiben sinirin üst ucu yuvarlak iğneli 10/0 naylon dikiş materyali ile epinöryumdan kırık hattına tespitlendi (Resim 14). Sinirin alt parçası ise ulaşılabilen en alt seviyeden eksize edildi.



Resim 14: Siyatik sinirin proksimal ucunun kırık hattına interpozisyonu (mavi ok ile işaretli kısım)

Deney gruplarının tel kafesler içinde serbest olarak hareketlerine izin verildi. Opere ekstremiteler tespit yeterliliği ve enfeksiyon yönünden takip edildi. Deneklerin diğer üç ekstremitesini kullanıp cerrahi işlem uygulanan ekstremitesini koruduğu gözlendi. Dört hafta sonra tüm deneklere yüksek doz Pentotal (Pantobarbütal 50 mg/kg) intraperitoneal olarak verilerek sakrifiye edildi. Tüm deneklerin hem cerrahi işlem uygulanan sağ femurları, hem de hiçbir müdahele uygulanmamış olan sol femurları üstte kalça eklemi seviyesinden, altta diz eklemi seviyesinden ayrılarak femur diafizi 1/3 orta kısımdaki yumuşak dokular bırakılmak suretiyle geriye kalan tüm çevre yumuşak dokulardan temizlendi (Resim 15). Tüm deneklerin sağ femurlarındaki kirschner telleri çekildi. Tüm femur numuneleri steril izotonik sodyum klorür solüsyonu ile doldurulan flakon şişelerine teker teker konularak grup numarası, grup içi sayı numarası ve sağlam/kırık kemik şeklinde işaretlendi.

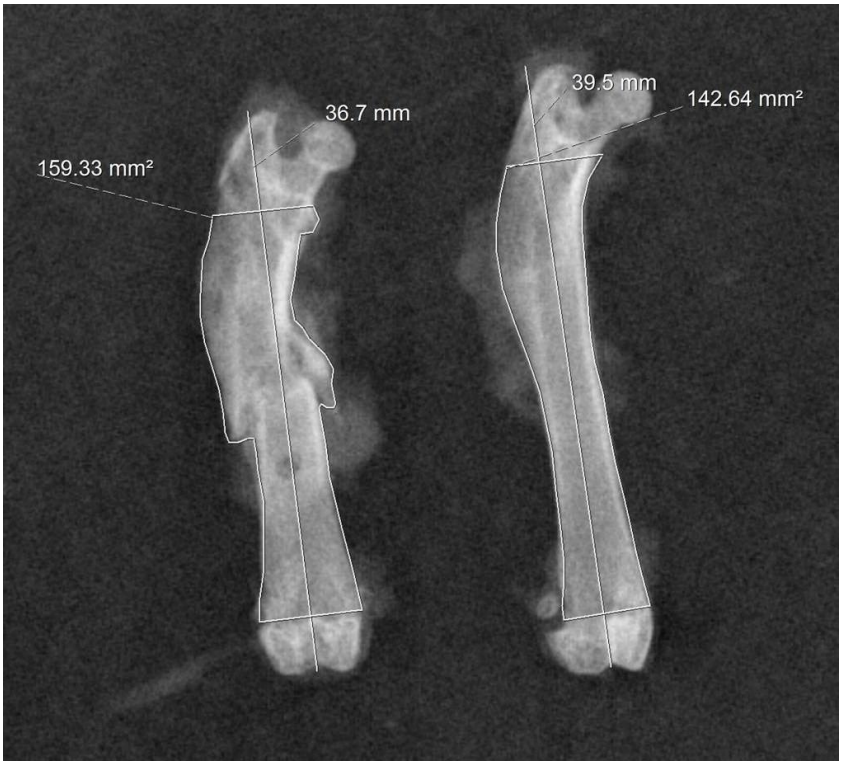


Resim 15: Sakrifiye edilen denekten çıkarılan femurun son hali (Cerrahi işlem yapılan taraf)

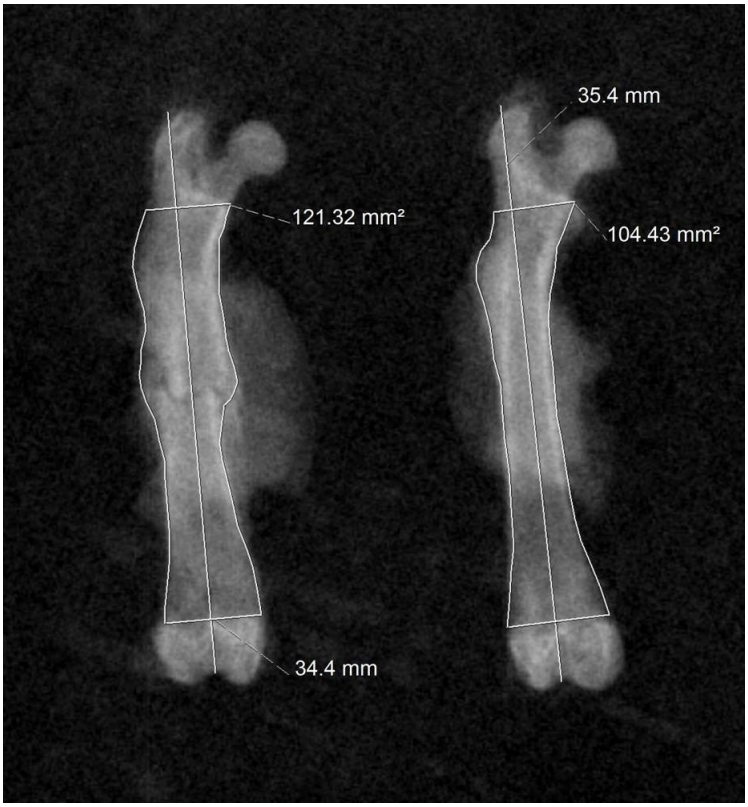
3.4. Radyolojik Değerlendirme

Tüm femur numunelerine sakrifiye edildikleri gün ön-arka düzlemde direkt grafi çekildi. Görüntüleme işlemi yüksek rezolüsyonlu dijital radyografi sistemi ile yapıldı. Görüntüleme 110 cm mesafe, 48 kilowatt, 2,50 miliamper ve 9,45 milisaniye değerleriyle standardize edildi. Elde edilen görüntüler Philips Medical Systems firmasının PACS ürün gamına ait ‘’İmage Viewer R

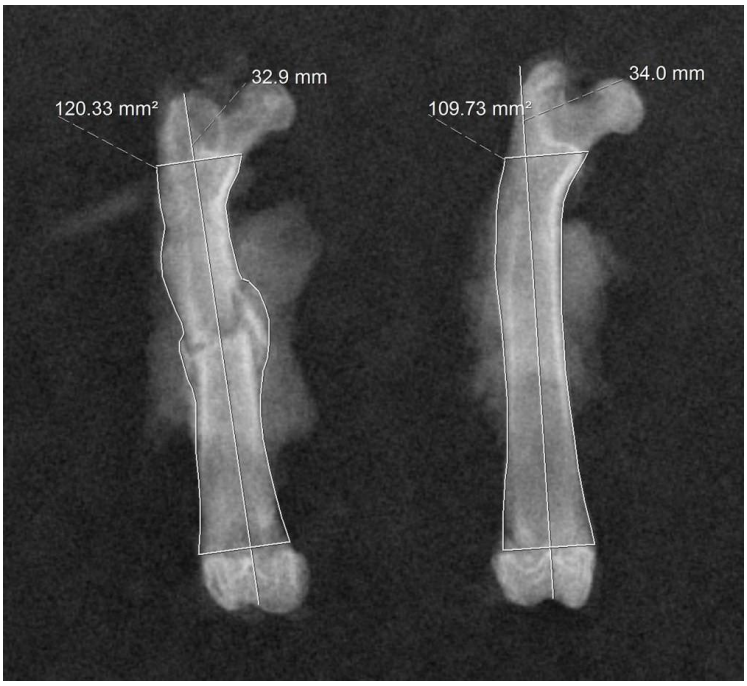
10.2'' yazılımında C: 8600 (kontrast), W: 9440 (parlaklık) standart değerlerinde dijital olarak bire bir büyütmeyle değerlendirildi. Görüntüler değerlendirilirken her çalışma grubunun kallus oluşumu görülen sağ femurları ile kallus oluşumu görülmeyen sol femurlarının metafizodiafizer segment alanları (izole femur diafiz alanı olarak tariflenen), mm^2 (milimetrekare) cinsinden objektif olarak hesaplandı. Burda femurun izole olarak diafiz alanını hesaplayabilmek amacıyla femur üst ucunda trokanter minor seviyesinden, alt ucunda femur kondillerinin diafizle birleşme seviyesinden femur uzun eksenine dik çizgiler çekilerek çizgiler arasında kalan metafizodiafizer segmentin alanı mm^2 olarak tayin edildi. Bu teknikle femurda oluşan kallus dokusunun diafiz alanında yaptığı artışın saptanması amaçlandı (Resim 16, Resim 17, Resim 18).



Resim 16: Grup I'in 9 numaralı deneğine ait izole femur diafiz alanlarının görünümü



Resim 17: Grup II'nin 16 numaralı deneğine ait izole femur diafiz alanlarının görünümü



Resim 18: Grup III'ün 10 numaralı deneğine ait izole femur diafiz alanlarının görünümü

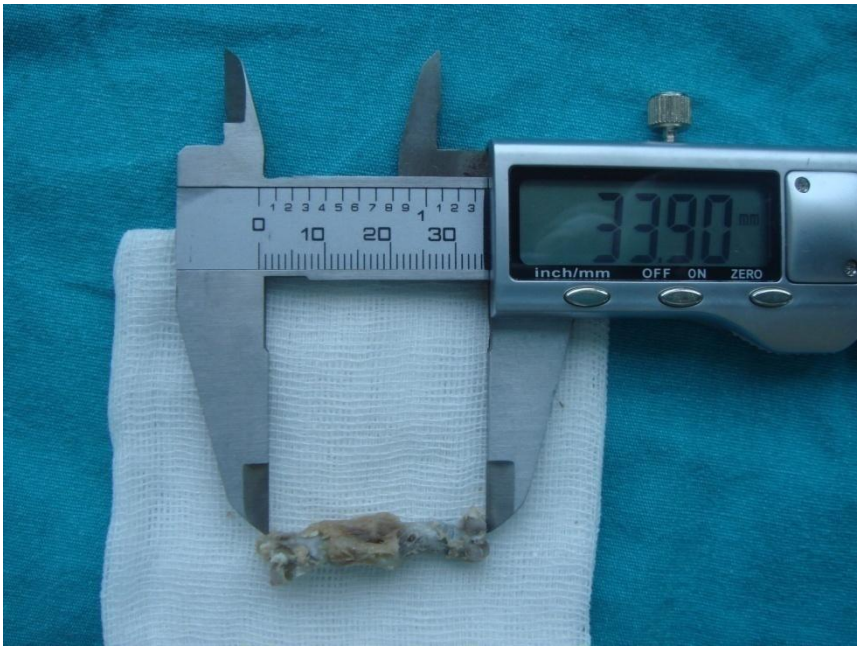
Her çalışma grubunun kallus oluşumu görülen sağ femurlarının izole diafiz alanları grup içinde karşı taraftaki sağlam femurların izole diafiz alanlarıyla, gruplar arasında ise her bir grubun kallus oluşumu görülen sağ femur izole diafiz alanlarıyla kıyaslandı.

3.5. Histopatolojik Değerlendirme

Direkt grafilerinin alınmasını takiben rastgele seçimle birinci ve üçüncü gruptan sekiz adet, ikinci gruptan da yedi adet deneğin sadece kırık kallusu oluşumu gözlenen sağ femurları histopatolojik değerlendirmeler için ayrıldı. Birinci gruba ait numunelerden ikisi transport esnasında hasar gördüğü için bu grubun histopatolojik değerlendirmesi altı adet denek üzerinden yapıldı. Numaralandırılmış örnekler % 10'luk formol solüsyonu ile oda sıcaklığında fikse edildi. Ardından bir hafta boyunca 48-72 saat aralarla oda sıcaklığında % 10'luk formik asit ile dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işleminin ardından 2-3 mm'lik doku kesitleri alınıp parafin içine gömülerek bloklandı. Bu bloklardan mikrotom yardımı ile 6 mm'lik uzunlamasına ve enine kesitler alınarak HE (hematoksilen-eozin) ve alcalin blue ile boyama işlemi uygulandı. Bu işlemden sonra alınan 6-8 kesit ışık mikroskobunda 20x, 40x, 100x, 400x büyük büyütmede incelenerek numunelerin en selüler alanlarından milimetrekarede hücre sayımı (osteosit, osteoblast, osteoklast, fibroblast, kondrosit) ile kallusun kemik ve kıkırdak kalınlığı ölçümü yapıldı. Mikroskobik örnekler Olympus BX 51 dijital fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

3.6. Biyomekanik Değerlendirme

Direkt grafilerinin alınmasını takiben rastgele seçimle birinci ve ikinci gruptan sekiz adet, üçüncü gruptan da yedi adet deneğin kallus oluşumu gözlenen sağ femurları ile karşı taraf sağlam femurları (kontrol grubu) biyomekanik değerlendirme için ayrıldı. Numaralandırılmış tüm femur örneklerinin önce hassas dijital cetvel yardımıyla uzunlukları teker teker ölçülüp kaydedildi. (Resim 19).



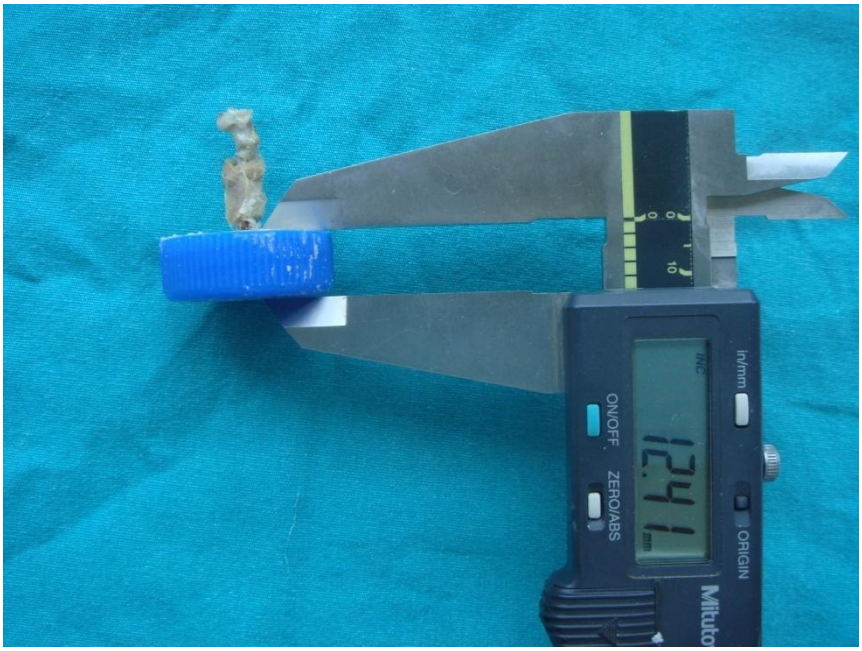
Resim 19: Femur uzunluklarının hassas dijital cetvel yardımıyla ölçülmesi

Sonra tüm femurlar aynı büyüklük ve derinlikteki plastik kaplara ön-arka ve yan planda bir gonyometri cetveli yardımıyla kemik çimentosu (sement) kullanılarak horizontal (yere paralel) düzleme tam dik olacak açıyla gömüldü (Resim 20, Resim 21).

Resim 20: Femurun ön-arka planda plastik kaba gömülmesi (Gonyometri cetvelinin açısı doksan derecedir)

Resim 21: Femurun yan planda plastik kaba gömülmesi (Gonyometri cetvelinin açısı doksan derecedir)

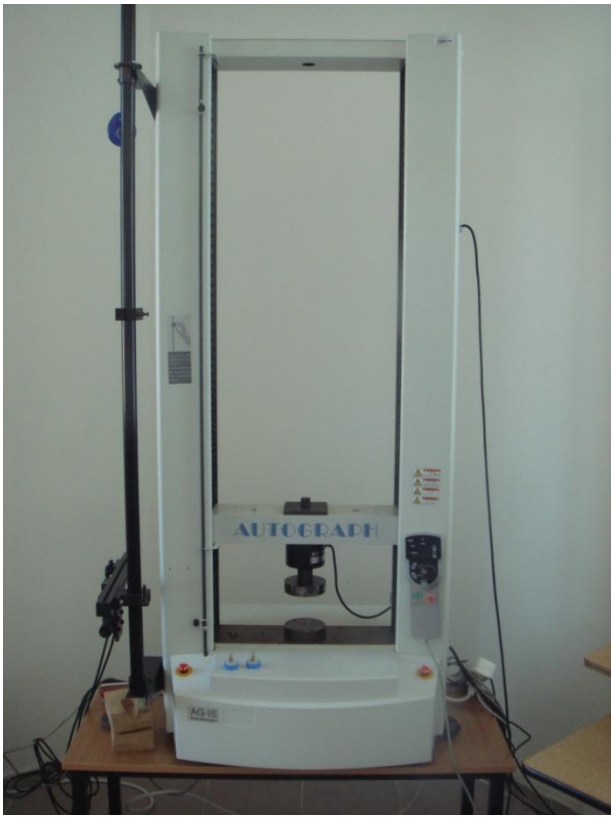
Sonra tüm femurların plastik kaplardaki kemik çimentosu içine gömülen miktarının uzunluğu (L_0) hassas dijital cetvel yardımıyla teker teker ölçülüp kaydedildi (Resim 22).



Resim 22: Femurun kemik çimentosu içine gömülü miktarının (L_0) hassas dijital cetvel yardımıyla belirlenmesi

Bu işlemin ardından numuneler DEÜTF Biyomekanik laboratuvarına ulaştırıldı. Biyomekanik çalışma olarak numunelere aksiyel yüklenme testi

uygulandı. Deneyde basma aleti olarak SHIMADZU Autograph AG-I 10kN basma ve çekme cihazı kullanıldı (Resim 23). Cihazın üst aparatına numunelerin femur başlarını kavrayacak genişlik ve derinlikte girintiye sahip tahta blok tespitlendi.



Resim 23: Biyomekanik testinin (Aksiyel yüklenme testi) yapıldığı cihaz (SHIMADZU Autograph AG-I 10kN, Japonya)

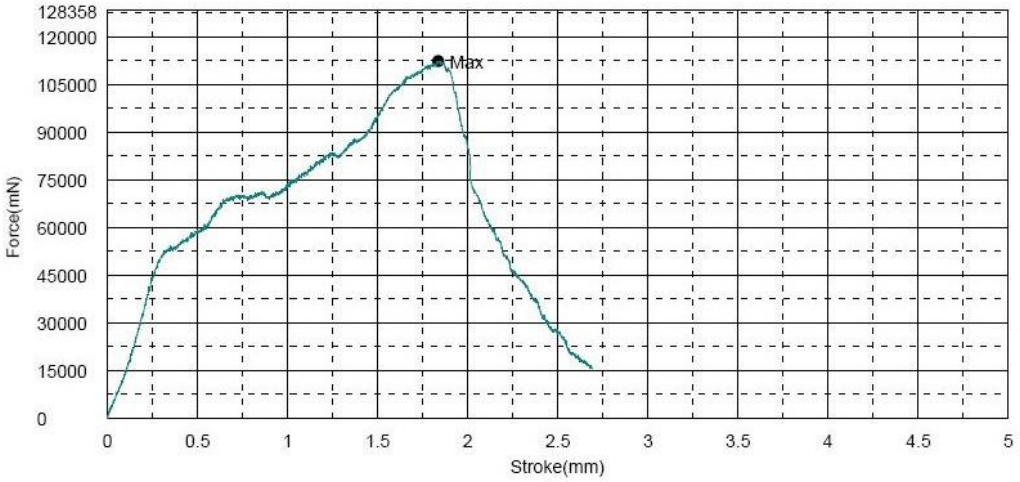
Cihaz aksiyel yüklenme testini dakikada 1 milimetre hız (1 mm/dak) ile basarak gerçekleştirdi. Ölçüm sonuçları bilgisayara kuvvet (milinewton)/deplasman (milimetre) eğrileri şeklinde kaydedildi (Şekil 3). Biyomekanik değerlendirme için ayrılan numunelerin radyolojik değerlendirme aşamasında elde edilmiş dijital görüntülerinden ortalama yarıçap (r_0) değerleri hesaplandı.

Shape: Rod

	Diameter	Height
Units	mm	mm
1 - 1	5.0000	35.0000

Name	YP Force	YP Disp	Max Force	Max Disp	Break Force
Parameter	0.1 %/FS	0.1 %/FS			
Units	mN	mm	mN	mm	mN
1 - 1	-.-	-.-	112344.	1.83650	-.-

Name	Break Disp	Break Stress
Units	mm	N/mm2
1 - 1	-.-	-.-



Şekil 3: Aksiyel yüklenme testi sonrası elde edilen kuvvet/deplasman eğrisi (force=kuvvet, stroke=deplasman), Grup III'ün 16 numaralı deneğinin opere femuru

Biyomekanik Parametrelerin Hesaplanması

Sertlik (Stiffness): F/ΔL. Kuvvet-deformasyon grafiğindeki ilk bölümün eğimidir. Grafikler doğrusal olmadığı için ilk bölüm femur proksimal kısmının yani trokanterik bölgenin sertliğidir. Buradaki F grafikteki doğrusal kısmın tepe noktasındaki kuvveti, ΔL ise bu kuvvete karşılık gelen deformasyon miktarını göstermektedir.

Elastisite (Young Modulü): $E=(F_{max}/A^o) / (\delta_{max}/L_0)$ Bu değer bir cismin yüzey alanına uygulanan kuvvetin, o cismin boyundaki birim şekil değiştirmeye (uzama veya kısalma gibi) olan oranıdır. Bir başka deyişle bir maddenin şekil değiştirme özelliklerini belirleyen parametrelerden biridir ve bu değerin yüksek olması maddenin zor şekil değiştirdiğini, düşük olması ise kolay şekil değiştirdiğini gösterir. Burada F_{max} kemiğe uygulanan maksimum kuvvet, δ_{max} bu kuvvetin oluşturduğu deformasyon miktarı, A^o kuvvetin uygulandığı yüzey alanı- ki kuvvet tüm kemiğe uygulandığından femurlar üzerinde proksimal-orta(kırık kemiklerde kallus çapı)-distal kısımlarda ölçülen

3 adet yarıçapın ortalaması (r_0) alınarak πr^2'den hesaplandı. L_0 ise femurun başlangıçtaki (çimento içine gömüldükten sonraki) boyuna karşılık gelmektedir.

Enerji Depolama Kapasitesi (U): Femurun test başlangıcından kırılmasına kadar absorbe ettiği toplam enerji olup kuvvet-deformasyon grafiğinde altta kalan alan hesaplanarak bulunmuştur. Bir maddenin enerji depolama kapasitesi, üzerine uygulanan yükü, darbeyi emebilme özelliğini yani kolay kırılıp kırılmadığını gösterir.

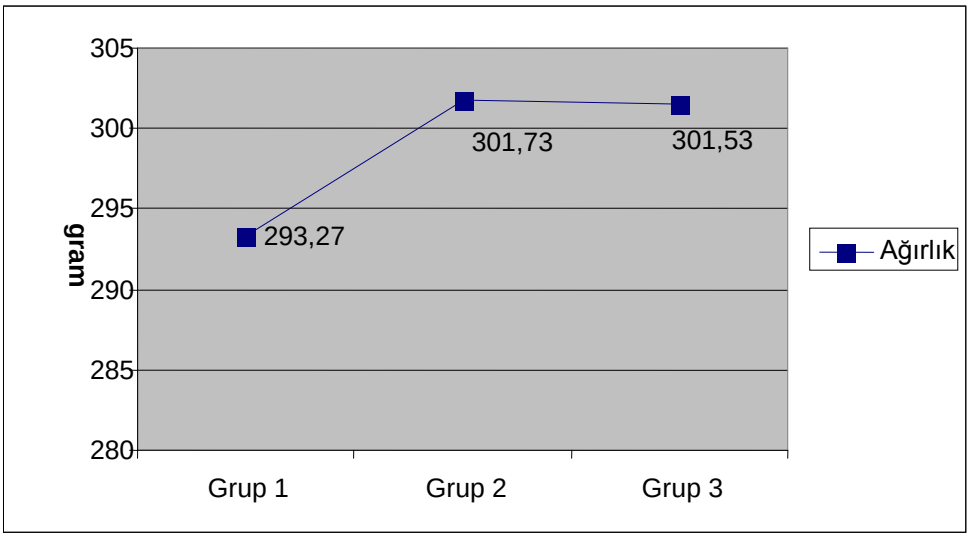
3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmanın analizi ''Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 for Windows'' İstatistik paket programında %95 güvenle yapıldı. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesi yapılırken Wilcoxon Signed Ranks, Mann-Whitney 'U', Spearman's correlations istatistiksel analizleri kullanıldı. Parametreler bütünüyle Mean±SD, ayrıca grafik ve tablolar ile desteklenerek özetlendi. Tüm analizlerde $P \geq 0,05$ istatistiksel olarak anlamsız, $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanları Ağırlıkları

Deneklerin sakrifikasyon evresinde ağırlık ortalama dağılımı gram cinsinden yapılan ölçüm sonuçlarına göre incelendiğinde birinci grupta 293,27±6,00; ikinci grupta 301,73±6,16; üçüncü grupta 301,53±9,17 olup ağırlıkları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p=0,954) (Grafik 1).



Grafik 1: Deneklerin Ağırlık Ortalama Dağılımı

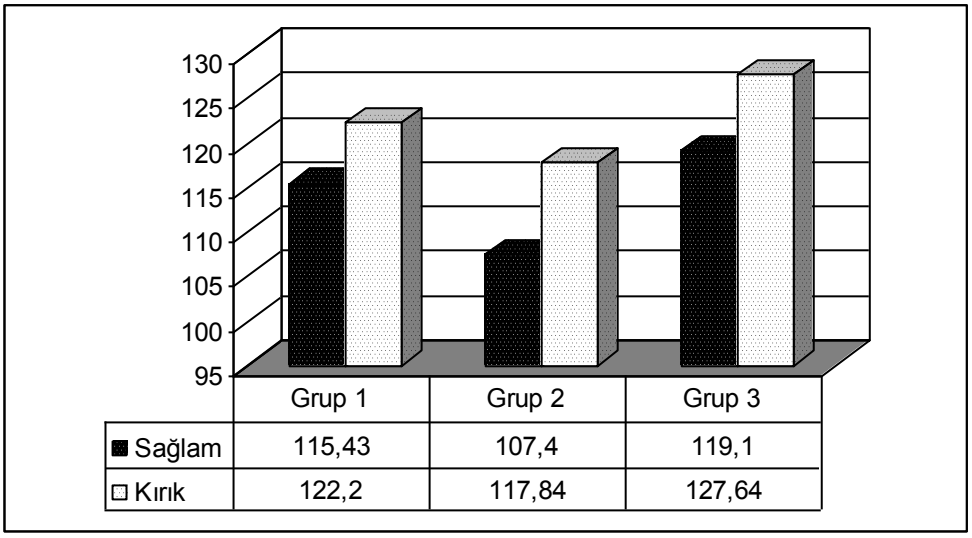
4.2. Radyolojik Değerlendirme Bulguları

Bütün grupların sağ femurlarında dördüncü hafta sonunda kallus dokusu oluşumu izlendi. Kırık açıklığı köprülenmesi tüm gruplarda radyolojik olarak periosteal köprüleşme (eksternal kallus) şeklindeydi.

Her bir grubun kallus oluşumu gözlenen femurlarının izole diafiz alanları ile sağlam femurlarının izole diafiz alanları (kontrol grubu) Wilcoxon Signed Ranks testi ile grup içi olarak değerlendirildi (Grafik 2). Birinci grupta radyolojik izole femur diafiz alanları ortalaması sağlam kemiklerde 115,43±4,58 mm^2 iken kırık kemiklerde 122,20±7,89 mm^2 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,156).

İkinci grupta radyolojik izole femur diafiz alanları ortalaması sağlam kemiklerde 107,40±3,65 mm^2 iken kırık kemiklerde 117,84±3,89 mm^2 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,005).

Üçüncü grupta radyolojik izole femur diafiz alanları ortalaması sağlam kemiklerde 119,10±3,14 mm^2 iken kırık kemiklerde ise 127,64±3,22 mm^2 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,011).



Grafik 2: Çalışma gruplarında izole femur diafiz alanları ortalama dağılımı

Kallus oluşumu gözlenen sağ femurların izole diafiz alanları gruplar arasında Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre birinci grup ile ikinci grup arasında ve birinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ikinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı (Tablo 1).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,506 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,335 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,044 (istatistiksel olarak anlamlı)

Tablo 1: Çalışma gruplarının kırık femurlarına ait izole femur diafiz alanlarının gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.3.Biyomekanik Değerlendirme Bulguları

Her bir grubun kallus oluşumu gözlenen sağ femurları ile sağlam olan sol femurları (kontrol grubu) Wilcoxon Signed Ranks testi ile grup içi olarak aksiyel yüklenme testi sonrasında hesaplanan üç biyomekanik parametre ile değerlendirildi: a) Elastisite, b) Enerji depolama kapasitesi, c) Sertlik. Kallus

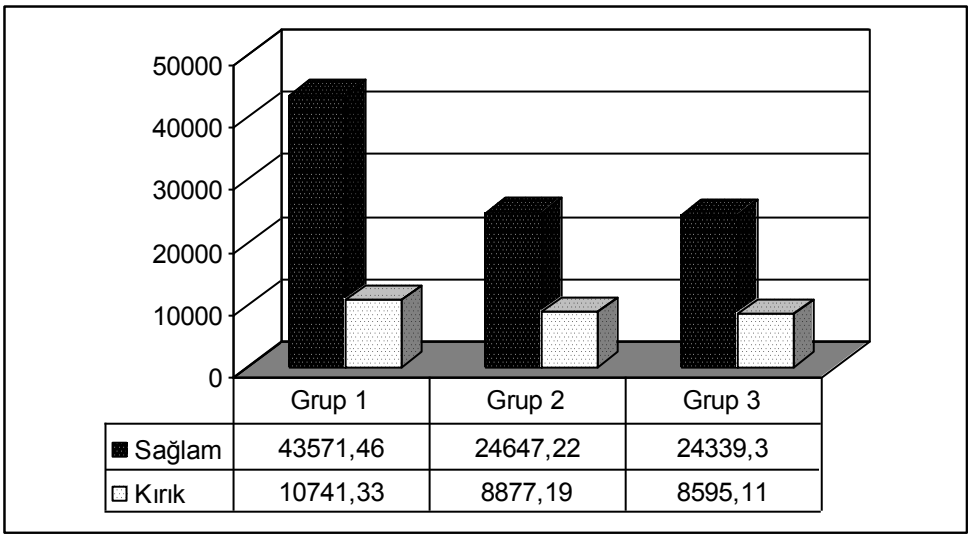
oluşumu gözlenen sağ femurlar gruplar arasında ise yine bu üç biyomekanik parametre ile Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi.

4.3.1. Elastisite

Birinci grupta elastisite sağlam kemiklerde 43571,46±3246,35 iken kırık kemiklerde 10741,33±2846,10 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,012).

İkinci grupta elastisite sağlam kemiklerde 24647,22±4320,05 kırık kemiklerde ise 8877,19±3689,22 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,010).

Üçüncü grupta elastisite sağlam kemiklerde 24339,30±4154,11 kırık kemiklerde ise 8595,11±4341,56 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,018) (Grafik 3).



Grafik 3: Çalışma gruplarında elastisitelerin ortalama dağılımı

Kallus oluşumu gözlenen sağ femurların elastisitelerinin gruplar arasında değerlendirilmesi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 2).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,466 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,482 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,904 (istatistiksel olarak anlamlı değil)

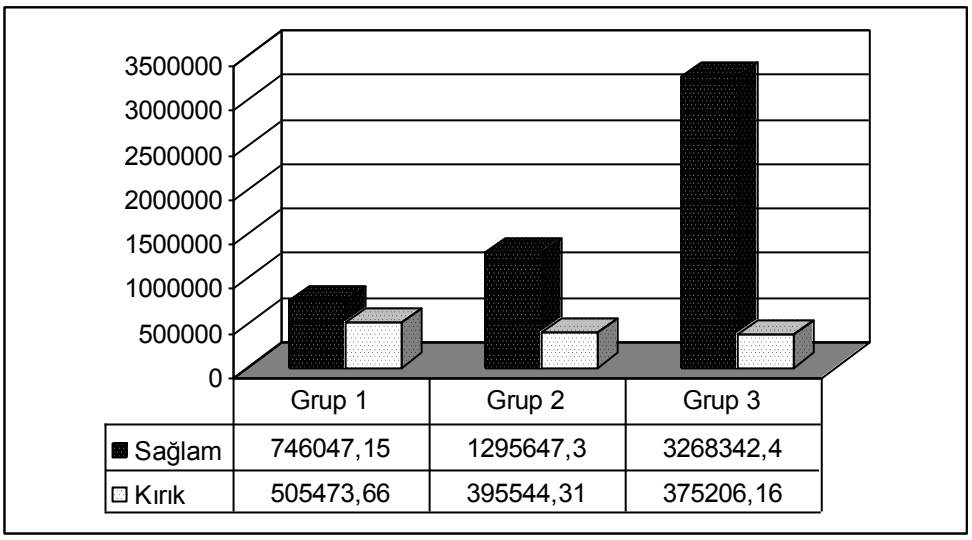
Tablo 2: Çalışma gruplarının kırık femurlarına ait elastisitelerinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.3.2. Enerji Depolama Kapasitesi

Birinci grupta enerji depolama kapasitesi sağlam kemiklerde 746047,15±81978,17 kırık kemiklerde ise 505473,66±90267,78 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,208).

İkinci grupta enerji depolama kapasitesi sağlam kemiklerde sağlam kemiklerde 1295467,30±90157,16 iken kırık kemiklerde ise 395544,31±65914,26 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,012).

Üçüncü grupta enerji depolama kapasitesi sağlam kemiklerde 3268342,40±650541,53 kırık kemiklerde ise 375206,16±93557,23 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,018) (Grafik 4).



Grafik 4: Çalışma gruplarında enerji depolama kapasitesi ortalama dağılımı

Kallus oluşumu gözlenen sağ femurların enerji depolama kapasitelerinin gruplar arasında değerlendirilmesi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 3).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,475 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,510 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,906 (istatistiksel olarak anlamlı değil)

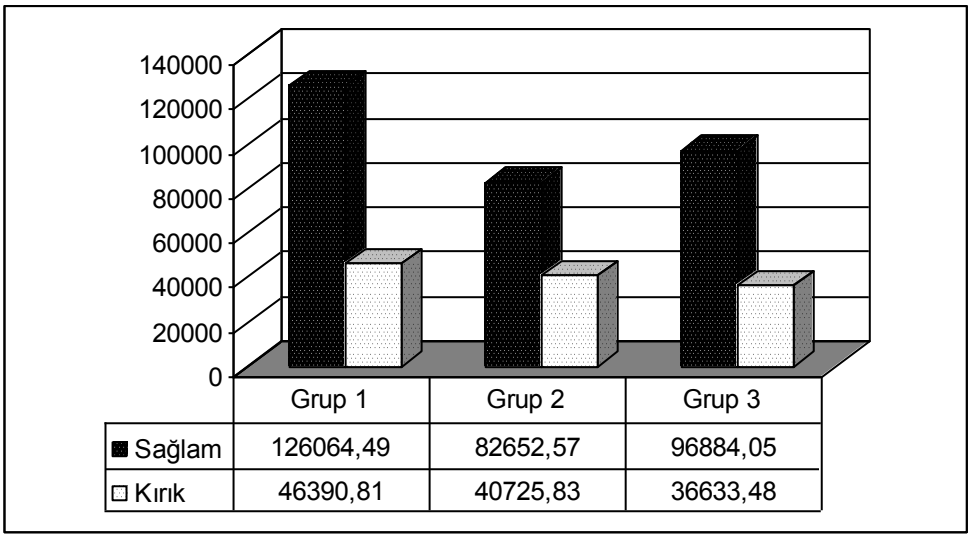
Tablo 3: Çalışma gruplarının kırık femurlarına ait enerji depolama kabiliyetinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.3.3. Sertlik

Birinci grupta sertlikler sağlam kemiklerde 126064,49±20240,18 kırık kemiklerde ise 46390,81±7914,36 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,017).

İkinci grupta sertlikler sağlam kemiklerde 82652,57±8052,21 kırık kemiklerde ise 40725,83±4876,48 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,012).

Üçüncü grupta sertlikler sağlam kemiklerde 96884,05±18643,26 kırık kemiklerde ise 36633,48±6556,21 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,012) (Grafik 5).



Grafik 5: Çalışma gruplarında sertliklerin ortalama dağılımı

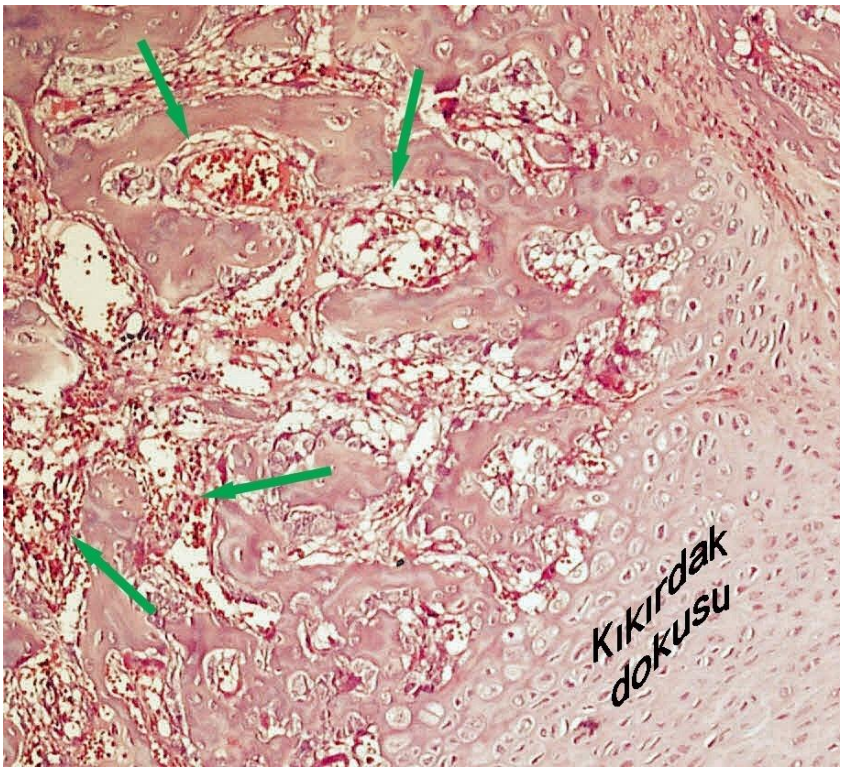
Kallus oluşumu gözlenen sağ femurların sertliklerinin gruplar arasında değerlendirilmesi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,487 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,394 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,696 (istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 4: Çalışma gruplarının kırık femurlarına ait sertliklerin gruplar arası istatistiksel p değerleri

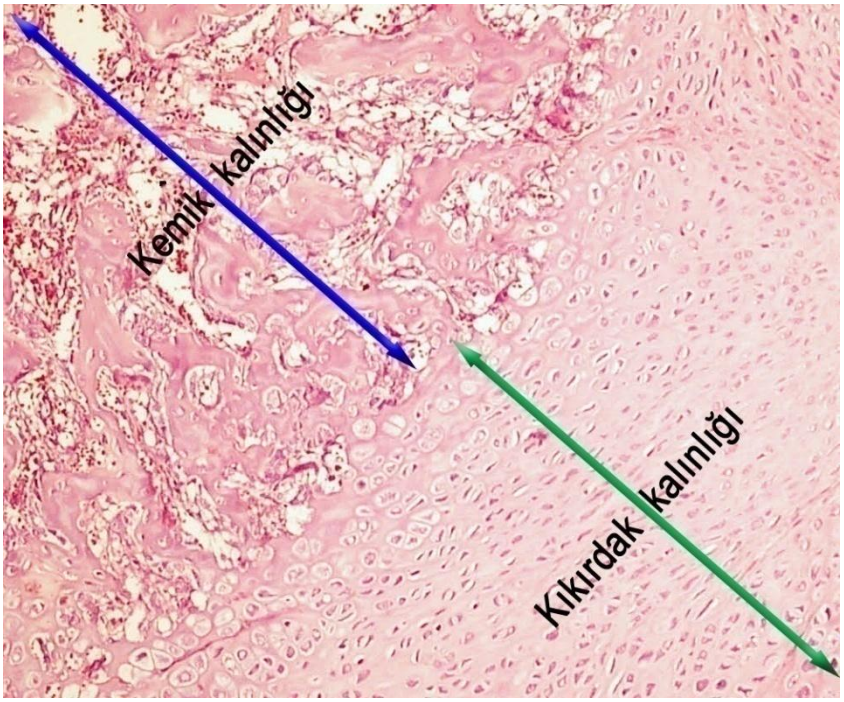
4.4. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Deneklerin sağ femurlarının intramedüller tespitinden 28 gün sonra sakrifikasyon aşamasını takiben birinci gruptan altı adet, ikinci gruptan yedi adet ve üçüncü gruptan da sekiz adet numune, histopatolojik olarak aynı zaman diliminde değerlendirildi. Tüm çalışma gruplarında değişen derece ve aşamalarda kallus oluşumu gözlenmekle birlikte genel olarak birinci grupta daha küçük ve daha ileri evrede kallus oluşumu gözlenmekle birlikte ikinci ve üçüncü grupta daha hipertrofik ve daha erken evrede kallus oluşumu gözlendi (Resim 24).

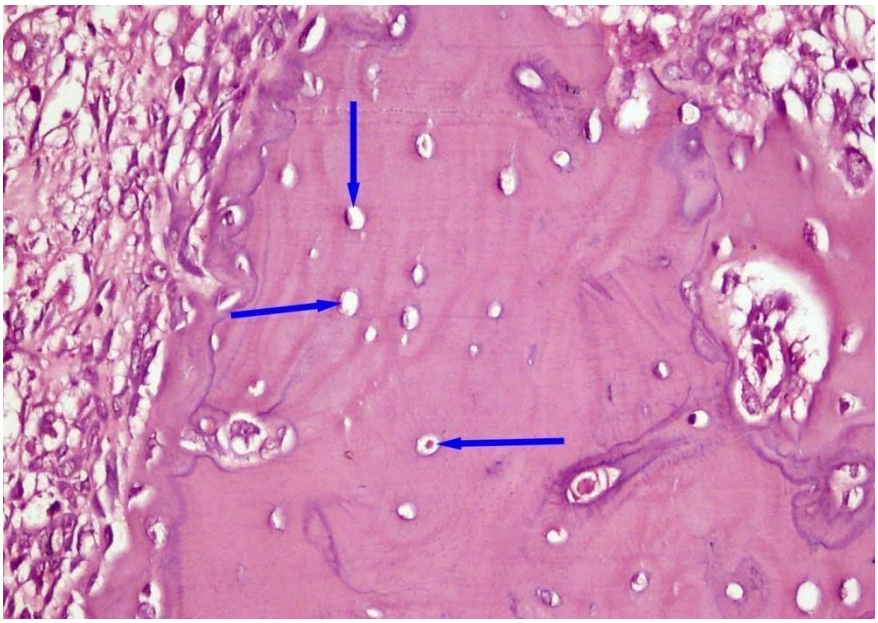


Resim 22: Grup 1'de belirgin trabeküler kemik oluşum alanları (yeşil oklarla gösterilen), H&E ile boyama, x100 büyütme

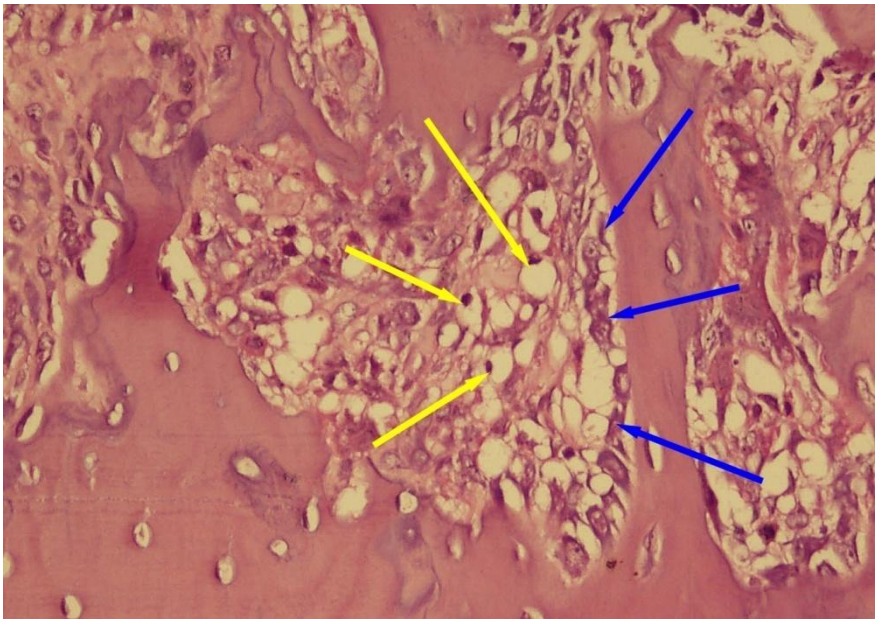
Daha niceleyici bir değerlendirme yapmak amacıyla numunelerin en selüler alanlarından milimetrekarede hücre sayımı (osteosit, osteoblast, osteoklast, fibroblast, kondrosit) ile kallusun kemik ve kıkırdak kalınlığı ölçümü yapıldı (Resim 25, Resim 26, Resim 27, Resim 28, Resim 29). Elde edilen veriler gruplar arasında Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.



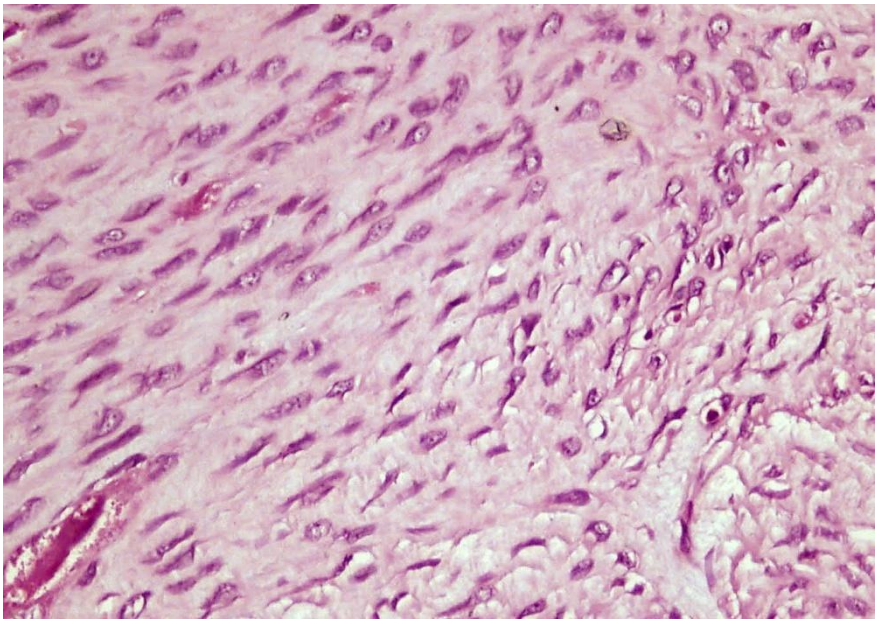
Resim 25: Kallus dokusunda kıkırdak-kemik geçiş ve kalınlığı, H&E ile boyama, x100 büyütme



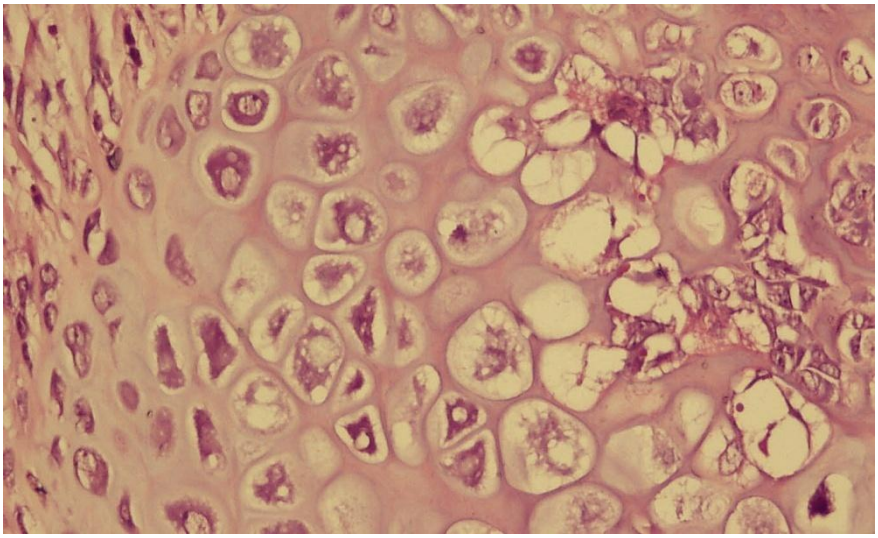
Resim 26: Birim alanda osteosit sayısı (mavi oklar ile işaretli olanlar), H&E ile boyama, x400 büyütme



Resim 27: Birim alanda osteoblast ve osteoklast sayısı (mavi oklar osteoblastik hücre sıralanmasını, sarı oklar ise tipik ekzantrik multinükleer osteoklastları göstermekte), H&E ile boyama, x400 büyütme



Resim 28: Birim alanda fibroblast sayısı, H&E ile boyama, x400 büyütme



Resim 29: Birim alanda kondrosit sayısı, H&E ile boyama, x400 büyütme

4.4.1. Kıkırdak kalınlığı

Bu değerlendirmeye göre birinci grup ile ikinci grup arasında ve birinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ikinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (Tablo 5).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,033 (istatistiksel olarak anlamlı)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,031 (istatistiksel olarak anlamlı)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,891 (istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 5: Çalışma gruplarının kıkırdak kalınlığı değerlerinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.4.2. Kemik kalınlığı

Birinci grup ile ikinci grup arasında ve ikinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken birinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı. (Tablo 6).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,223 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,0045 (istatistiksel olarak anlamlı)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,504 (istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 6: Çalışma gruplarının kemik kalınlığı değerlerinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.4.3. Osteosit sayısı (milimetrekarede)

Bu değerlendirmede ise her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 7).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,562 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,649 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,262 (istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 7: Çalışma gruplarının milimetrekaredeki osteosit sayısı değerlerinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.4.4. Osteoblast sayısı (milimetrekarede)

Birinci grup ile üçüncü grup arasında ve ikinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken birinci grup ile ikinci grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (Tablo 8).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,473 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,034 (istatistiksel olarak anlamlı)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,004 (istatistiksel olarak anlamlı)

Tablo 8: Çalışma gruplarının milimetrekaredeki osteoblast sayısı değerlerinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.4.5. Osteoklast sayısı (milimetrekarede)

Birinci grup ile ikinci grup arasında ve ikinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken birinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (Tablo 9).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,024 (istatistiksel olarak anlamlı)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,604 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,016 (istatistiksel olarak anlamlı)

Tablo 9: Çalışma gruplarının milimetrekaredeki osteoklast sayısı değerlerinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.4.6. Fibroblast sayısı (milimetrekarede)

Birinci grup ile ikinci grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ikinci grup ile üçüncü grup arasında ve birinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (Tablo 10).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,042 (istatistiksel olarak anlamlı)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,054 (istatistiksel olarak anlamlı değil)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,622 (istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 10: Çalışma gruplarının milimetrekaredeki fibroblast sayısı değerlerinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.4.7. Kondrosit sayısı (milimetrekarede)

Birinci grup ile ikinci grup arasında ve birinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ikinci grup ile üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (Tablo 11).

Grup 1-Grup 2 arası	p=0,018 (istatistiksel olarak anlamlı)
Grup 1-Grup 3 arası	p=0,0026 (istatistiksel olarak anlamlı)
Grup 2-Grup 3 arası	p=0,772 (istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 11: Çalışma gruplarının milimetrekaredeki kondrosit sayısı değerlerinin gruplar arası istatistiksel p değerleri

4.4.7. Histopatolojik değerlendirmeye genel bakış

Grup 1 (n=6) Grup içi denek	Kıkırdak Kalınlığı (mm)	Kemik Kalınlığı (mm)	Osteosit / mm^2	Osteoblast / mm^2	Osteoklast / mm^2	Fibroblast / mm^2	Kondrosit / mm^2
1	0,42	0,35	42	34	13	53	23
2	0,22	0,17	27	15	4	22	25
3	0,27	0,89	28	28	11	68	33
4	0,42	0,13	15	32	14	57	27
5	0,26	0,22	23	24	9	39	28
6	0,23	0,16	24	17	12	42	19
Ort.	0,303	0,32	26,5	25	10,5	46,83	25,83

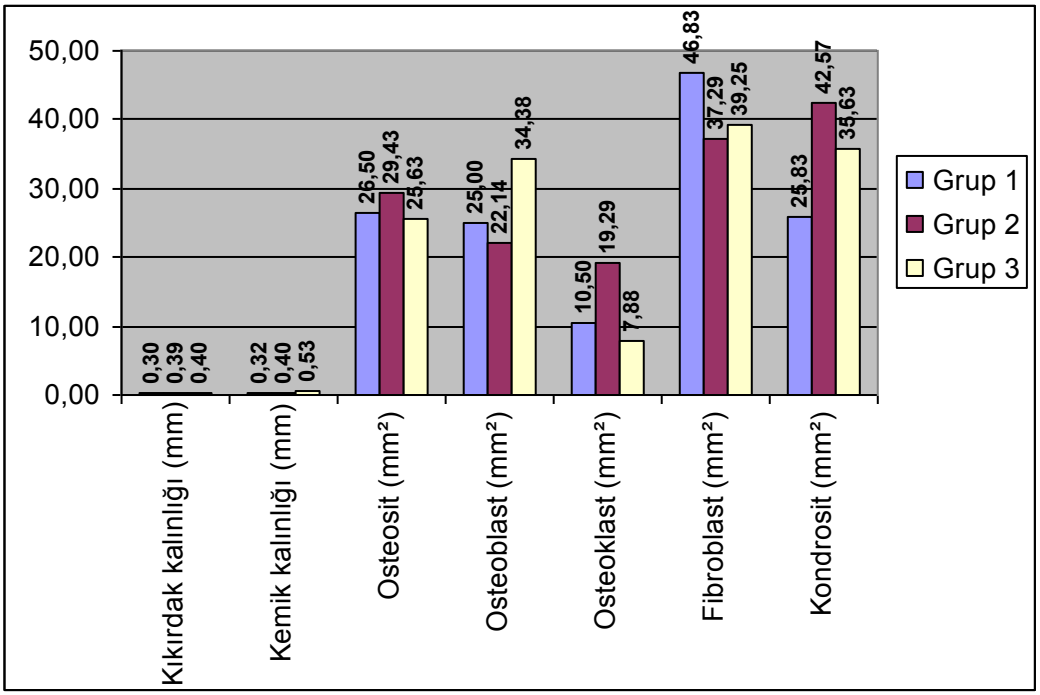
Tablo 12: Birinci grup birim alanda hücre sayıları ve kemik-kıkırdak kalınlıkları

Grup 2 (n=7) Grup içi denek	Kıkırdak Kalınlığı (mm)	Kemik Kalınlığı (mm)	Osteosit / mm^2	Osteoblast / mm^2	Osteoklast / mm^2	Fibroblast / mm^2	Kondrosit / mm^2
1	0,63	0,32	28	28	7	18	83
2	0,29	0,35	23	13	3	11	25
3	0,18	0,51	31	16	6	43	35
4	0,5	0,53	23	23	5	35	42
5	0,55	0,12	35	18	9	73	39
6	0,27	0,43	43	29	91	28	29
7	0,35	0,57	23	28	14	53	45
Ort.	0,396	0,4	29,43	22,14	19,29	37,29	42,58

Tablo 13: İkinci grup birim alanda hücre sayıları ve kemik-kıkırdak kalınlıkları

Grup 3 (n=8) Grup içi denek	Kıkırdak Kalınlığı (mm)	Kemik Kalınlığı (mm)	Osteosit / mm^2	Osteoblast / mm^2	Osteoklast / mm^2	Fibroblast / mm^2	Kondrosit / mm^2
2	0	0,64	32	20	15	115	15
3	0,07	0,21	50	98	5	18	40
4	0,9	0,24	18	23	15	25	55
5	0,8	1,1	23	25	5	16	47
6	0,17	0,095	13	6	0	11	18
7	0,22	0,74	18	25	0	73	30
8	0,65	0,76	28	43	8	13	38
9	0,41	0,43	23	35	15	43	42
Ort.	0,4025	0,5269	25,625	34,375	7,875	39,25	35,625

Tablo 14: Üçüncü grup birim alanda hücre sayıları ve kemik-kıkırdak kalınlıkları



Grafik 6: Tüm grupların hücre sayıları ve kemik-kıkırdak kalınlığı ile karşılaştırılması

5.TARTIŞMA

Kemik dokusunda nöral oluşumun varlığı ilk olarak 1545 yılında belgelenmiştir[8]. Yeni kemik oluşumunun sinirsel kontrolü hipotezi 1930'lu yıllara kadar uzanmaktadır[10]. Kafa travması, travmatik parapleji vs gibi nörolojik hasarı olan hastalarda bol miktarda kallus oluşumu ile hızlı bir kaynama[3,4,5,6,7,34,40,41], Charcot hastalığı gibi bazı diğer nörolojik patolojilerde ise azalmış kemikleşmenin kliniği gözlenir[13,42].

Sıçanlarda Frymoyer ve arkadaşları, Yüce ve arkadaşları, siyatik sinir nörektomisini takiben aynı taraf fibulada[35,37], Hukkanen, Konttinen, Santavirta ve arkadaşları siyatik sinir nörektomisini takiben tibiada[38], Madsen, Hukkanen ve arkadaşları ise siyatik ve femoral sinir nörektomisini takiben tibiada kırık oluşturmuşlardır[39]. Nörektominin ilgili kırığı ne kadar denerve ettiğine dair niceleyici bir gösterge olarak Hukkanen, Konttinen, Santavirta ve arkadaşları, çalışmalarında kallusta immünohistokimyasal yöntemlerle nöromarker analizi yaptılar. Elde ettikleri bulgularla, tibial kırık kallusunun sadece siyatik sinirden innerve olmadığına, başka kaynaklardan da innervasyon olduğu yorumunu yaptılar[38]. Madsen, Hukkanen ve arkadaşları bu sebeple takip eden bir çalışmalarında nörektomiyi hem siyatik, hemde femoral sinirden kombine olarak yaptılar[39]. Bu çalışmada siyatik sinir nörektomisini takiben kırığın femurda oluşturulması, modelin kemiği tümüyle denerve edemediğini düşündürmektedir. Kallusun immünohistokimyasal yöntemlerle nöral dokuya yönelik analizi, denervasyon miktarına (az veya çok yönünde) netlik kazandırabilir.

Sıçanlarda denervasyon modelleri, kırık iyileşmesini nasıl etkilemektedir?

Bu sorunun cevabı kırık iyileşmesine yönelik değerlendirme ölçütlerine göre verilmelidir. Klinikte kırık iyileşmesi, pratik olarak radyografi ve fizik muayene bulguları ile değerlendirilirken, niceleyici değerlendirme zor olabilmektedir[28]. Sıçanlarda ise bu değerlendirmenin çalışmalarda radyografik, histopatolojik, dansitometrik ve biyomekanik ölçümlerle yapıldığı görülmektedir[13,35,36,37,38,39]. Bu çalışmada nümerik olarak yapılan radyolojik

alan ölçümlerinde kırık kemikler arasında, denervasyonun tek başına uygulanmasında (ikinci çalışma grubu) kontrol grubuna göre (birinci çalışma grubu) anlamlı bir alan artışı saptanmadı. Aro ve arkadaşları, intramedüller olarak tespitledikleri sıçan tibia kırıklarında siyatik sinir denervasyonunun daha büyük, düz ve kalsifiye görünmekle birlikte daha düzensiz dansite sergileyen bir kallus oluşumuna sebep olduğunu saptadılar. Kontrol gruplarında ise kallus oval şekilde ve daha düzenli dansite göstermekteydi[13]. Takip eden bir çalışmada ise aynı ekip kimyasal analizler ile denervasyonun kallusda osteoporotik bir dönüşümü tetiklediğini saptadılar[36]. Yüce ve arkadaşları, siyatik denervasyon yapılan sıçanların fibula kırıklarında 28. günde radyolojik olarak kırık fragmanlarının birleştiğini, kontrol grubunda ise minimal bir açıklık olduğunu saptadılar. Dansitometre cihazında ışık yoğunluğu olarak ölçtükleri kemik dansitometrisini denerve tarafta artmış olarak buldular[37]. Hukkanen, Konttinen, Santavirta ve arkadaşları ile Madsen, Hukkanen ve arkadaşları, radyolojik olarak skorlama sistemi ile yaptıkları değerlendirmelerde normal innerve kırıklarda primer kırık iyileşmesi, denerve olgularda ise geniş kallus oluşumuyla karakterize sekonder kırık iyileşmesi saptadılar. Onlar ayrıca sıçanlara stronsiyum klorür enjeksiyonu sonrası yaptıkları dansitometrik ölçümlerde denerve tarafla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulamadılar[38,39]. Bu çalışmada denervasyonun radyolojik bulgularında kırık kemikler arasındaki karşılaştırma göz önüne alındığında literatürdekine benzer değişimler saptanmadı. Bu yönüyle ikinci çalışma grubundaki model, bir denervasyon modeli olarak yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

Biyomekanik değerlendirme sonuçlarında ise çalışılan elastisite, sertlik ve enerji depolama kabiliyeti parametrelerinin her üç çalışma grubunun kırık kemikleri arasındaki gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Frymoyer ve arkadaşları, siyatik siniri denerve sıçanların fibula kırıklarının iyileşmesinde 15. ve 20. günlerde biyomekanik parametrelerden elastisite, enerji depolama kapasitesi ve sertlikte bir artış saptadılar[35]. Aro ve arkadaşları, biyomekanik olarak kırık iyileşmesinin erken evresinde (ilk 15 gün), maksimum kırma kuvvetlerinin denerve gruplarda

arttığını gözlediler[13]. Hukkanen, Konttinen, Santavirta ve arkadaşları ile Madsen, Hukkanen ve arkadaşları, biyomekanik olarak 35. günde denerve grupta maksimum bükülme momenti, enerji depolama kapasitesi ve sertlik parametrelerini kontrol grubuna göre azalmış olarak buldular[38,39]. Biyomekanik incelememizde birinci grupta enerji depolama kapasitesi sağlam kemiklerle kırık kemikler arasında anlamlı fark göstermedi. Bu bulgu, birinci grupta enerji depolama kapasitesinin kırık kemikte sağlam kemiğe yakın bir değerde olduğunu, denervasyon ve sinir ucu interpozisyonu gruplarında ise kırık kemiklerde sağlam kemiklerden daha düşük bir değer sergilediğine işaret ederek enerji depolama kapasitesinin denervasyona ikincil olarak azaldığı şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmanın histopatolojik değerlendirmesi ise birim alandaki hücre sayıları (osteosit, osteoblast, osteoklast, fibroblast, kondrosit) ve kemik-kıkırdak kalınlık ölçümleriyle niceleyici bir düzende yapıldı. Denervasyonun kontrol grubuna göre kıkırdak kalınlığını, kondrosit sayısını, osteoklast sayısını anlamlı olarak arttırdığı (sırasıyla p=0,033, p=0,018 ve p=0,024), fibroblast sayısını ise azalttığı (p=0,042) saptandı. Denerve grupta osteosit sayısında ve kemik kalınlığında da istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bir artış vardı (sırasıyla % 11,06 ve % 26,25). Frymoyer ve arkadaşları, siyatik siniri denerve sıçanların fibula kırıklarının iyileşmesinde 15. ve 20. günlerde histolojik olarak (hematom, kallus, kaynama ve kompakt kemik oluşumu ölçütlerinden oluşan bir skorlama sistemi kullanarak) bir artış saptadılar[35]. Yüce ve arkadaşları, histolojik olarak denerve tarafta 28. günde olgun lameller kemik oluşumu ve osteoklastlar, kontrol tarafında ise fibröz ve kıkırdak dokularının hâkim olduğu daha erken evre bir kallus oluşumu saptadılar[37]. Gajda, Litwin ve ark.'nın sıçan tibialarında duyusal innervasyonun gelişimiyle ilgili çalışmasında denerve kemiklerde osteoklastik aktivitenin artışına yönelik gözlemleri olmuştur[43]. Bu çalışmada kırık iyileşmesinin fazları göz önüne alındığında denervasyonda kallus oluşum sürecinde bir gecikme sözkonusudur. Kontrol grubunda hem denervasyon, hem de sinir ucu interpozisyonuna göre daha küçük, ama daha ileri evrede bir kallus oluşumu gözlenmektedir.

Sıçanlarda siyatik sinir denervasyonunun sinir ucu interpozisyonuyla birlikte uygulanması, femurda kırık iyileşmesini nasıl etkilemektedir?

Yapılan literatür araştırmasında deneysel olarak sinir ucunun kırık hattına interpozisyonu modeline rastlanmamıştır. Bu çalışmada nümerik olarak yapılan radyolojik alan ölçümlerinde; denervasyonun sinir ucu interpozisyonuyla birlikte uygulandığı femurlarda (üçüncü çalışma grubu), denerve gruba göre (ikinci çalışma grubu) anlamlı bir artış saptanmıştır. Sinir ucu interpozisyonunda daha hipertrofik bir kallus oluşumu, sinirin kırık hattında birtakım fiziksel ve/veya kimyasal uyarımlarına ikincil olabilir. Buna yönelik immünohistokimyasal ve moleküler analizler yapılmadığından bu hususta daha ileri bir yorum yapılmamıştır. Biyomekanik olarak iki grup arasında benzer bulgular göstermiştir. Aynı şekilde sinir ucu interpozisyonunun kırık kallusunda, sadece enerji depolama kabiliyeti parametresindeki dolaylı anlamlılığına bağlı olarak biyomekanik açıdan bir azalma gösterdiği söylenebilir. Histopatolojik olarak üçüncü çalışma grubunda denervasyondan farklı olarak kemik kalınlığı ile osteoblast sayısını anlamlı olarak arttırmakla birlikte osteoklast sayısını anlamlı olarak azaltmaktaydı. Değerlendirilen diğer histopatolojik parametreler ise denervasyondakine benzerdi. Bu açıdan sinir ucu interpozisyonunda, daha büyük ama daha immatür bir kallus oluşumu gözükmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada denervasyon ve/veya sinir ucu interpozisyonunun kırık iyileşmesine olan etkileri, siyatik sinir nörektomisini takiben aynı taraf femur kırığı modeli ile araştırıldı. Sinir ucu interpozisyonunun radyolojik olarak daha hipertrofik bir kallus oluşumuna, hem denervasyonun hem de sinir ucu interpozisyonunun biyomekanik olarak kısmen yetersiz bir kallus oluşumuna, histopatolojik olarak ise denervasyonun kısmen immatür bir kallus oluşumuna, sinir ucu interpozisyonunun ise daha büyük ama daha immatür bir kallus oluşumuna sebep olduğu gözlendi.

6. ÖZET

Amaç: Kırık iyileşmesi, kemik dokunun innervasyon süreçlerindeki değişimlerden etkilenmektedir. Bu deneysel çalışma ile denervasyonun ve/veya sinir ucu interpozisyonunun kırık iyileşmesinde oluşturacağı olası değişimlerin incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: 50 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan, üç çalışma grubuna ayrıldı. Anestezi altında tüm deneklerin aynı taraf femurlarında standart transvers diafiz kırığı oluşturulup intramedüller olarak tespit edildi. Takiben birinci grupta siyatik sinirin yapısal bütünlüğü korunurken ikinci grupta sinire nörektomi uygulandı. Üçüncü grupta ise deneklerde siyatik sinir kesisi yapıldıktan sonra sinirin proksimal ucu kırık hattına interpoze edildi. 28 günlük izlem sonrasında da oluşan kırık kallusu radyolojik, biyomekanik ve histopatolojik olarak da değerlendirildi.

Bulgular: Nümerik olarak yapılan radyolojik alan ölçümlerinde kırık kemikler arasında sadece üçüncü grup, ikinci gruba göre anlamlı artış gösterdi. Biyomekanik olarak sadece birinci grupta enerji depolama kabiliyeti parametresinde kırık kemiklerin aynı taraf sağlam kemiklere göre anlamlı artış göstermemesi kaydadeğer bulundu. Histopatolojik olarak ise denervasyonun kontrol grubuna göre kıkırdak kalınlığını, kondrosit sayısını, osteoklast sayısını anlamlı olarak arttırdığı, fibroblast sayısını ise azalttığı gözlendi. Sinir ucu interpozisyonunun ise denervasyona ilave olarak kemik kalınlığı ile osteoblast sayısını anlamlı olarak arttırmakla birlikte osteoklast sayısını anlamlı olarak azalttığı gözlendi.

Çıkarımlar: Sinir ucu interpozisyonunun radyolojik olarak daha hipertrofik bir kallus oluşumuna, hem denervasyonun hem de sinir ucu interpozisyonunun biyomekanik olarak kısmen yetersiz bir kallus oluşumuna, histopatolojik olarak ise denervasyonun kısmen immatür bir kallus oluşumuna, sinir ucu interpozisyonunun ise daha büyük ama daha immatür bir kallus oluşumuna sebep olduğu gözlendi.

7. KAYNAKLAR

[1] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Semin Cell Dev Biol 2008;19(5):459-466.

[2] Einhorn TA: Current concepts review: Enhancement of fracture healing. J Bone Joint Surg 1995; 77A:940-956. (Inst.course lect.1996.vol 45:401-416)

[3] Calandriello B. Callus formation in severe brain injuries. Bull Hosp Joint Dis 1964;25:170-175.

[4] Comarr AE, Hutchinson RH, Bors E. Extremity fractures of patients with spinal cord injuries. Am J Surg 1962;103:732-739.

[5] Eichenhotz SN. Management of long-bone fractures in paraplegic patients. J Bone Jt Surg 1963;45(A):299-310.

[6] Freehafer AA, Mast WA. Lower extremity fractures in patients with spinal-cord injury. J Bone Jt Surg 1965;47(A):683-694.

[7] Robin GC. Fractures in poliomyelitis in children. J Bone Jt Surg 1966;48-A:1048-1054.

[8] Jones KB, Mollano AV, Morcuende JA, Cooper RR, Saltzman CL. Bone and brain: a review of neural, hormonal, and musculoskeletal connections. Iowa Orthop J 2004;24:123-132.

[9] Duncan CP, Shim SS. J. Edouard Samson Address: The autonomic nerve supply of bone. An experimental study of the intraosseous adrenergic nervi vasorum in the rabbit. J Bone Joint Surg Br 1977;59(3):323-330.

[10] Hurrell DJ. The nerve supply of bone. J Anat 1937;72:54-61.

[11] Sherman MS. The nerves of bone. J Bone Joint Surg 1963;45A:522-528.

[12] Shim SS, Copp DH, Patterson FP. Bone blood flow in the limb following complete sciatic nerve section. Surg Gynecol Obstet 123 1966;123(2):333-335.

[13] Aro H, Eerola E, Aho AJ, Penttinen R. Healing of experimental fractures in the denervated limbs of the rat. Clin Orthop Relat Res 1981;155:211-217.

[14] Li J, Ahmad T, Spetea M, Ahmed M, Kreicbergs A. Bone reinnervation after fracture: a study in the rat. J Bone Miner Res 2001;16(8):1505-1510.

[15] Mehrara BJ, McCarthy M. Repair and grafting of bone. In Mathes SJ (ed). Plastic surgery Vol 1. Second edition. Saunders 2005;639-705.

[16] Heppenstall RB. Fracture treatment and healing. In Wilson JN (ed). Watson-Jones:Fractures and joint injuries Vol 1. 6th edition. Saunders co,Philadelphia 1980;35-64.

[17] Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. Biochem Cell Biol 1998;76(6):899-910.

[18] Nijweide PJ,Burger EH,Klein-Nulend J,van der Pluijm G. The osteocyte. In Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (ed). Principles of Bone Biology. Academic Press, San Diego, CA 1996;115–126.

[19] Noble BS. The osteocyte lineage. Arch Biochem Biophys 2008;473:106–111.

[20] Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone 2008;42:606–615.

[21] Van Bezooijen RL, Papapoulos SE, Löwik CW. Bone morphogenetic proteins and their antagonists: the sclerostin paradigm. J Endocrinol Invest 2005;28:15–17.

[22] Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases,and ERKs. Am J Physiol Cell Physiol 2005;289:633–643.

[23] Teti A, Zallone A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. Bone 2009;44(1):11-16.

[24] Suda T, Takahashi N,Martin TJ. Modulation of osteoclast diferentiation. Endocr rev 1992;13:66-80.

[25] Ege R. Kırıkların etyopatolojisi ve biomekaniği. Ege R (ed). Travmatoloji Cilt 1. Beşinci baskı. Bizim Büro Basımevi, Ankara 2001;35-53.

[26] Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. Clin Orthop Relat Res 1999 ;(367 Suppl):59-67.

[27] Marsh DR, Li G. The biology of fracture healing: optimising outcome. Br Med Bull 1999;55(4):856-869.

[28] Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL Jr. Pathophysiology of delayed healing. Clin Orthop Relat Res. 1998;(355 Suppl):31-40

[29] Hiltunen A, Aro HT, Vuono E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. Clm Orthop 1993; 297:23-27.

[30] Kılıçoğlu SS. Mikroskobi düzeyinde kırık iyileşmesi. AÜTF Dergisi 2002;55(2):143-150.

[31] Ryaby JT. Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. Clin Orthop Relat Res 1998;(355 Suppl):205-215.

[32] Bora A, Lök V. Elektromanyetik alanlar ile osteojenik indüksiyon. Acta Orthop Traumatol Turc 1994;28:258-264.

[33] Anglen J. Enhancement of fracture healing with bone stimulators. Tech Orthop 2002;17(4):506–514.

[34] Hardy AG, Dickson JW. Pathological ossification in traumatic paraplegia. J Bone Jt Surg1963;45(B):76-87.

[35] Frymoyer JW, Pope MH. Fracture healing in the sciatically denervated rat. J Trauma 1977;17(5):355-361.

[36] Aro H. Effect of nerve injury on fracture healing. Callus formation studied in the rat. Acta Orthopaedica Scandinavica 1985;56(3):233-237.

[37] Yüce N, Gülman B, Karagöz F. Periferik sinir lezyonlarının kırık iyileşmesi üzerine etkisi. T J Research Med Scl 1988;6(5):391-396.

[38] Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S, et al. Effect of sciatic nerve section on neural ingrowth into the rat tibial fracture callus. Clin Orthop Relat Res 1995;311:247-257.

[39] Madsen JE, Hukkanen M, Aune AK, et al. Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats. Clin Orthop Relat Res 1998;351:230-240.

[40] Aro H, Eerola E, Penttinen R, Aho AJ. The responses of callus cells and lymphocytes to electrical stimulation. In Second Meeting of European Society of Biomechanics, Strasbourg J Biomech 1979. (Abstr. in press).

[41] McMaster WC, Stauffer ES. The management of long bone fracture in the spinal cord injured patient. Clin Orthop 1975;112:44-52.

[42] Eichenholtz SN. Charcot Joints. Springfield, Charles C. Thomas, 1966

[43] Gajda M, Litwin JA, Cichocki T, Timmermans JP, Adriaensen D. Development of sensory innervation in rat tibia: co-localization of CGRP and substance P with growth-associated protein 43 (GAP-43). J Anat. 2005;207(2):135-144.