



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

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN DİSTRAKSİYON  
OSTEOGENEZİSİNDE REJENERAT OLUŞUMUNA ETKİSİ**

**Dr. Mehmet KARAKAYALI**

**UZMANLIK TEZİ  
BURSA 2006**





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

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN DİSTRAKSİYON  
OSTEOGENEZİSİNDE REJENERAT OLUŞUMUNA ETKİSİ**

**Dr. Mehmet KARAKAYALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA 2006**



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

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN DİSTRAKSYON  
OSTEOGENEZİSİNDE REJENERAT OLUŞUMUNA ETKİSİ**

**Dr. Mehmet KARAKAYALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Bartu SARISÖZEN  
BURSA 2006**



# İÇİNDEKİLER

## SAYFA

TÜRKÇE ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
GİRİŞ.....	1
GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
BULGULAR.....	15
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	23
KAYNAKLAR.....	27

## ÖZET

Distraksiyon osteogenezisinde yeni kemik dokusu gelişimi üzerine trombositten zengin plazmanın etkisi, kemik dansitometrisi, mekanik testler ve histolojik inceleme yöntemleri kullanılarak araştırıldı.

Yeni Zelanda türü 12 tavşan iki gruba ayrılarak, sağ tibialarına osteotomi yapıldı. İlizarat eksternal fiksator ile distraksiyon osteogenezisi uygulanarak 1cm uzatma gerçekleştirildi. Tavşanların osteotomi bölgesine cerrahi girişimi takiben 1. , 2. , 3. haftalarda trombositten zengin plazma enjekte edildi. Uzatma bölgesinde gelişen yeni kemik dokusunun mineral dansitesi üçüncü, dördüncü ve beşinci haftalarda kantitatif bilgisayarlı tomografi ile ölçüldü. Tavşanlar 6. haftanın sonunda öldürülerek sağ tibialarının mekanik özellikleri, torsiyonel yüklenme testi ile değerlendirildi, oluşan yeni kemik dokusu histolojik olarak incelendi.

Kemik dansitometrisi değerleri, deney süresince trombositten zengin plazma enjekte edilen tavşanlarda ve kontrol grubunda başlangıç ölçümlerine oranla belirgin artış gösterdi (sırayla %62,3 ve %43,7). Üçüncü, dördüncü ve beşinci haftalarda ortalama kemik dansitesi trombositten zengin plazma enjekte edilen grupta sırası ile 416 HU, 487 HU, 675 HU; kontrol grubunda sırası ile 313 HU, 374 HU, 450 HU olarak ölçüldü. Her iki grubun haftalık değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında trombositten zengin plazma enjekte edilen grupta gözlenen dansite artışı kontrol grubuna göre daha fazlaydı. Mekanik testlerde trombositten zengin plazma enjekte edilen grupta ortalama torsiyon 46.50 derece, ortalama tork 0.53 Nm, kontrol grubunda ortalama torsiyon 19.33 derece, ortalama tork 0.65 Nm bulundu. Mekanik verilerin değerlendirilmesinde, ortalama maksimum torsiyon açıları iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Histolojik incelemede, her iki grupta eksternal ve internal periosteal kallus dokusu izlendiği, trombositten zengin plazma enjekte edilen grupta dört, kontrol grubunda ise iki tavşanda

kallus dokusunun şekillenerek normal kemik yapısı kazandığı ve distrakte edilen kemik uçlarının birbirine bağlandığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Deneysel, distraksiyon osteogenezisi, kantitatif kemik dansitometrisi, mekanik test, trombosit zengin plazma

## SUMMARY

The effect of platelet rich plasma on new bone formation during distraction osteogenesis was researched using bone density measurement, mechanical tests and histologic assesment.

Twenty New Zealand rabbits were divided into two groups both being osteotomized at right tibial bone. The tibial bone was lengthened 1 cm with ilizarat external fixator. Platelet rich plasma was enjected to the osteotomized sites of the rabbits on the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> weeks following surgery. Mineral density of the new bone tissue formed in the distraction zone was investigated in the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> using quantitave computed tomography. At the end of the 6<sup>th</sup> week animals killed and mechanical properties of the right tibiae were assessed by torsional loading and regenerated bone tissue was investigated histologically.

Bone density measurements were significantly increased during the experimental period compared to the initial values in both groups (62,3%, 43.7% respectively). In the platelet rich plasma enjected group 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> weeks were 416 HU, 487 HU, 675 HU. In the control group the same measurements were 313 HU, 374 HU, 450 HU respectively. On comparasion of weekly measurements of the two groups the increase in the density in the platelet rich plasma was higher than the control group.

During the mechanical tests, platelet rich plasma enjected groups mean m torsion was 46,50 degree, means m torque was 0,53 Nm. In the control group mean torsion was 19.33 degree, mean torque was 0,65 Nm. The mechanical analysis of the groups revealed significant differences in mean maximum torsion angles.

During the histological examination, it was seen that both groups possessed external and internal periosteal callus, in the platelat rich plasma

enjected group four, in the control group two rabbits callus tissue was remodeled, normal bone formation occurred and distracted bone ends were intact.

Keywords: Distraction osteogenesis, experimental, mechanical testing, platelet rich plasma, quantitative bone densitometry



## KISALTMALAR

TZP	Trombositten zengin plazma
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
IGF	İnsülin kökenli büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
PNL	Polimorf nüveli lükosit
IL	İnterlökin
TNF	Tümör nekroz faktör
KBT	Kantitatif tomografi
USG	Ultrasonografi
DEXA	Dual enerji x-ışını absorpsiyometrisi

## GİRİŞ

Distraksiyon osteogenezisin ilk temelleri 19. yüzyılda atılmasına rağmen modern anlamda Codivilla'nın çalışmaları ile başlamıştır (1). Codivilla diafizer osteotomi, iskelet traksiyonu ile femoral uzatma tekniğini uygulamıştır. İlk deneysel çalışmada Magnuson (2) tarafından köpeklerde yumuşak doku hasarı oluşturmada 5-7.5 cm'lik tek basamaklı uzatma işlemini uygulamıştır. Wagner (3,4) hastaların erken postoperatif mobilize edilebildikleri tekniği 1970'lerde geliştirmiştir. Bu teknikte unilateral fiksator kullanılarak, orta diyafizden yapılan osteotomiye takiben günde 1.5 mm'lik uzatma yapılmış, ekstremiteler eşitlendiğinde cihaz çıkarılarak greftleme ve internal tespit uygulanmıştır. De Bastiani (5) monolateral dinamik aksiyel fiksatoru geliştirmiş, metafizer bölgeden yapılan osteotomi sonrasında uzatma uygulamış ve buna kallotaxis adını vermiştir. 1950'lerde ise SSCB'de G. Ilizarov (6) ince kirschner telleriyle kemiğin tespit edildiği ve bunların çember fiksatorlara adapte edildiği tekniği yaygın olarak uygulamaya başlamıştır. İtalya'da Spinelli ve Monticelli, Almanya'da Wasserstein aynı dönemde çember fiksatorları uygulamaya başlamışlardır (7). Özellikle Ilizarov'un ilk olarak yayınladığı deneysel ve histolojik çalışmalarla distraksiyon osteogenezisinin biyolojik temelleri ortaya konmuştur. Bu yöntem; kemik defektlerinin, ekstremiteler kısıklıklarının ve kısıklıkla birlikte olan deformitelerin tedavisinde önemli bir uygulama alanı bulmasına rağmen biyolojik mekanizmasının ayrıntıları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (6,8-13).

Distraksiyon osteogenezisi, kortikotomi ile distraksiyonun başlaması arasında geçen ve kesilen kemik uçları arasında iyileşme dokusu köprüleşmesinin beklendiği latent dönem, uzatmanın yapıldığı distraksiyon dönemi ve oluşan rejeneratın olgunlaştığı kondolidasyon dönemlerini içermektedir. Bu dönemdeki ekstremiteler uzatma girişiminin başarısı çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar arasında en önemlileri osteotominin seviyesi, uzatma hızı, uzatma ritmi, latent dönemde bekleme süresi ve kullanılacak olan fiksatorün nitelikleridir (14-21).

Osteotomi hattının seviyesi konusunda yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, metafizer osteotomiler ile diyafizer osteotomiler karşılaştırılmıştır. Metafizer osteotomilerin iyileşme hızlarının ve iyileşme potansiyellerinin diyafizer bölgeye göre daha iyi olmasına rağmen, uzatma devam ettirilirken bu bölgede erken füzyon gelişimi daha sık gözlenmektedir. Delloy ve ark. (22) medüller kemik iliğinin sağlam bırakıldığı kortikotomi ile medüllerin tam olarak ayrıldığı osteotomi yöntemlerini karşılaştırarak, uzatma yapılan kemiklerde, iyileşme potansiyellerinde bir fark gözlemediklerini belirtmişlerdir. Klinik ve deneysel çalışmalarda, en uygun günlük uzatma hızının 0,35mm ile 1,4mm arasında olduğu belirlenmiştir (23). İlizarov (23) ve Delloye (22), en ideal uzatma miktarının günde 1mm olduğunu, bu miktarın günlük 4 eşit parçaya bölünerek (0,25mm x 4 / gün) yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. Günlük uzatma miktarının artırılması, yeterli ve nitelikli yeni kemik yapımının (rejenerat) engellenmesine; kaslarda atrofi, skleroz, nekroz ve kontraktürlere, damar ve sinir hasarına, eklemlerde sublüksasyon veya dislokasyonlara neden olur (23-29).

İlizarov (23) ve Kawamura (30,31) nutrisyen arterlerin korunması için kortikotomi önermişlerse de son yapılan klinik ve deneysel araştırmalarda kallus formasyonunda kortikotomi veya periost korunarak yapılan kapalı osteotomi arasında fark olmadığı, önemli olan osteotomiyle harap edilmiş olan nutrisyen arterin yeniden oluşumu için yeterli miktarda bekleme süresinin sağlanması olduğu belirtilmektedir. Kojimoto ve arkadaşları (32) yaptıkları deneysel çalışmalarda, tam transvers osteotomi sonrasında endosteal dolaşımın restorasyonu için 10 günlük bekleme süresinin uzatmanın başarısı için çok önemli olduğunu göstermişlerdir. Aranson (15) ise hayvanlarda distraksiyonun hemen başlanmasının yeterli kallus oluşumuna neden olacağını göstermiştir. İnsanlardaki klinik kullanım ile hayvan deneylerinde uygulanan bu bekleme süreleri hala tartışmalıdır (6). Klinik uygulamalarda osteotomi sonrasında bekleme süresi genellikle 7-10 gündür (33-34). Ancak bu süre hastanın yaşına ve kemiğin niteliğine göre

değişkenlik gösterebilir (14). Örneğin, metatars, metakarp gibi küçük kemiklerin uzatılmasında üç haftaya kadar beklenmesi önerilir (14,35) .

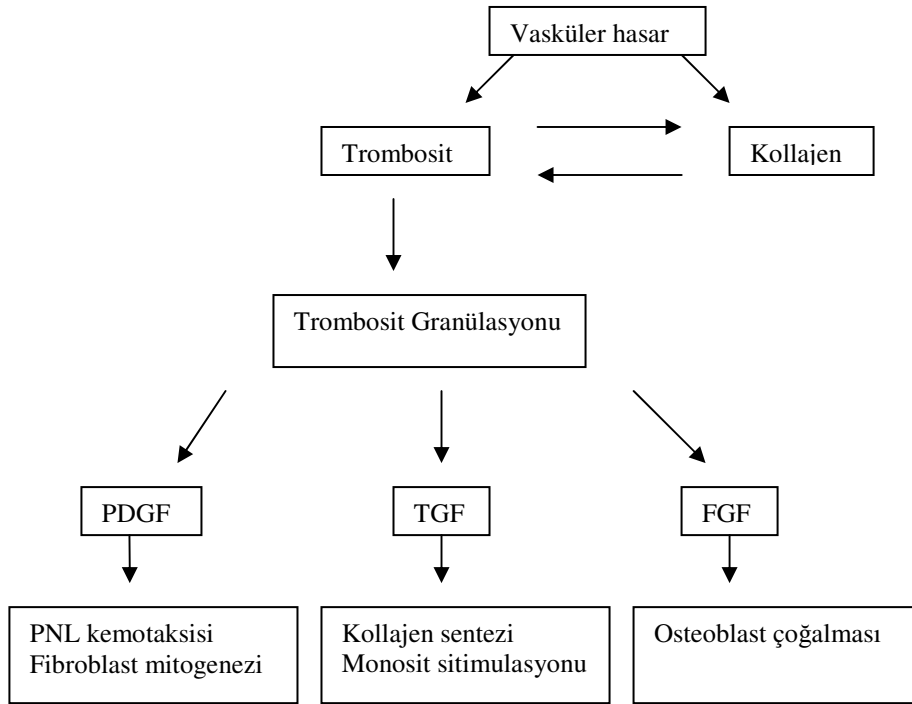
Uzatma sırasında distraksiyon bölgesinde oluşan yeni kemiğe İlizarov tarafından rejenerat adı verilmiştir (36-38). Yeni kemik oluşumu, intramembranöz ve endokondral olmak üzere iki ana tipte meydana gelir. Distraksiyon osteogenezisinde meydana gelen kemikleşme baskın olarak intramembranöz tiptedir. Burada mezanşim dokudaki fibroblastların osteoblastlara dönüşmesi ve osteoblastların mineralize olacak olgun osteoid dokuyu oluşturması sonucunda kemikleşme olur (39). Distaksiyon osteogenezisinde oluşan rejenerat, olgunlaşmaya kadar çeşitli evrelerden geçer. Latent dönemde osteotomi bölgesi hematoma ve iltihabi hücreler içeren fibrinöz bir yapı ile dolar (40). Distraksiyon başladıktan sonra fibrovasküler bir köprü distraksiyon yönünde organize olur. Bu dönemde distraksiyonun hızı ve ritmi rejeneratın niteliğini belirleyen önemli bir unsurdur. Deneysel çalışmalarda distraksiyonun 1. haftasında fibröz ara bölge avaskülerdir ve kollajen lifleri arasında fibroblastlar vardır. Distraksiyonun ikinci haftasında fibröz ara bölgede gelişen damar sinüzoidlerine komşu ilk osteoblast hücre kümeleri görülür. Distraksiyonun üçüncü haftasında yeni kemik dokusu gelişimi, kemik trabeküllerinin organize olması ve fibröz ara bölgenin ossifikasyonu görülür. Distraksiyonun son evresinde fibröz ara bölge tamamen kemikleşir ve kemik uçları arasında köprülenme tamamlanır.

Ekstremitte eşitsizliği olan hastalarda ekstremitenin uzatılması için distraksiyon osteogenezisi başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu eşitsizlik; iskelet displazisine bağlı kısa boyluluk, tümör, enfeksiyon ve travmadan kaynaklanabilmektedir. Distraksiyon osteogenezisi; ekstremitte uzatma işleminde başarılı olmasına rağmen eksternal fiksator periyodunun uzun olması, pin dibi enfeksiyonları, eklem kontraktürleri, pin gevşemesi, gecikmiş konsolidasyon ve kırık gibi komplikasyonları mevcuttur. Distrakte kallusun kemik formasyonu hızlandırılarak bu tedavi süresi azaltılmış, komplikasyonlar da önlenmiş olur (41).

Uzatmanın değişkenliklerinden başka oluşan rejeneratın kalitesini belirleyen olumlu ve olumsuz bazı faktörler bulunmaktadır. Sigara kullanımı; osteoblast fonksiyonlarını azaltıp yeni kemik oluşumunu geciktirerek (42), operasyon öncesi uygulanan radyasyon osteoprogenitör hücrelere zarar vererek (43), birden fazla kemoterapötik ajanın kullanılması ve proteinden fakir diyet ise mineralizasyonu azaltarak (44,45) oluşan rejeneratın yapısını zayıflatmaktadır.

Son yıllarda osteogenesisin niteliğini ve hızını artırmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Kallusun distraksiyonu ve konsolidasyonu sırasında uygulanan mekanik ve elektriksel stimulus, lokal kemik iliği implantasyonları ve sistemik bazı ilaçlar oluşan kallusun yapısını ve dayanıklılığını artırmaktadır. Ekstrakorporal şok uygulaması, kemik mineral dansitesini ve kemik formasyonunu aktive ederek kallus maturasyonunu hızlandırır (46). Düşük yoğunluklu pulsed ultrasound uygulanması kemik mineral dansitesini artırır, sert kallus oluşmasını sağlar ve daha az fibröz doku oluşumuna yardımcı olur (47). Lokal uygulanan fibroblast büyüme faktörü, osteojenik protein-1, osteoblastik hücreler, transforming büyüme faktörü-B, vasküler endotelial büyüme faktörü ve demineralize bone matrix kallus yapısını ve dayanıklılığını artırmaktadır (48-53).

Kortikotomi sonrası latent periyodun kırık iyileşmesinin başlangıç safhasından hiçbir farkı yoktur (40). Kortikotomi alanını karşılıklı çaprazlayan kan ve lenf damarlarının yaralanmasıyla bu uçlar arasındaki kemik iliğinde ve etrafında kan ve lenf sıvısı toplanır. Kanamanın durmasını ve pıhtılaşmayı sağlamak için trombositler hasarlanan bölgede kollajene yapışıp pıhtılaşma faktörlerini ve granülleri içindeki büyüme faktörlerini salgırlar. Bu büyüme faktörleri PDGF, TGF  $\alpha$ - $\beta$ , EGF, IGF, FGF'dir (54).



Şekil-1: Trombosit aktivasyonu ile salgılanan büyüme faktörlerinin etki mekanizması  
(Basic Pathology Kumar Cotran Robbins 66-67)

PDGF makrofajların ve PNL'lerin kemotaksisini, fibroblast ve düz kas hücrelerinde ise hem kemotaksisi hem mitogenezi uyarır. Ayrıca hayvan modellerinde yara iyileşmesinin etkili bir destekleyicisidir. TGF- $\alpha$ ; mezenşimal, epitelyal, endotelial hücrelerin büyümesini ve endotelial hücrelerin kemotaksisini ve anjiogenezi uyarır. TGF- $\beta$ ; monositleri uyararak FGF, PDGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar, kollagen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak bilinir, ayrıca matriksi organize edebilme özelliği nedeni ile remodeling oluşumunda görev yapar (55). Bouletreau ve ark. (56) osteotomi sonrası 3. günde TGF mRNA seviyesinde 2.5 kat artış olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada distraksiyonun erken safhasında TGF- $\beta$  mRNA seviyesi 3 katına çıkmış ve distraksiyon boyunca yüksek kalmış, konsolidasyon periyodunun sonunda ise normale düşmüştür. EGF; epitel hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlar için kemotaktik etkisi ayrıca anjiogenezi ve kollagenazı aktive edici özelliği vardır. IGF; osteoprogenitör

hücrelerin mitoz ve farklılaşmasını stimule eder (55). Distrakte edilen kallusta IGF seviyesi zamana bağlı olarak değişiklik gösterir. Distraksiyonun erken periyodunda serum IGF seviyesinde bir artış gözlenmiş, distraksiyonun 20. gününde ve konsolidasyonun 20. günlerinde düşüş tespit edilmiştir. FGF osteoblast çoğalmasını artırır ve kemik yapımını hızlandırır, total distraksiyon periyodunu kısaltır (56).

Trombositten zengin plazma (TZP) konsantre trombositlerin hazırlanmasıyla elde edilir ve PDGF, TGF  $\beta$ 1- $\beta$ 2, IGF I gibi birçok büyüme faktörünü içerir. İlk defa 1990' lı yılların başında kardiyovasküler cerrahide, daha sonra plastik cerrahide mandibuler defektlerin onarılmasında uygulanmıştır. Ortopedik cerrahide ilk kullanım alanı diabetik yaralar ve omurga füzyonu olmuştur (57). Sethi (58) deneysel çalışmasında; tavşan omurgasına füzyon amacıyla uygulanan iliak kanat kemik greftine TZP enjekte ederek mekanik ve histolojik olarak incelemiş, TZP'nin osteoblastik aktiviteyi ve mineralizasyonu arttırdığını saptamıştır. Trombositten zengin plazmanın biyolojik etkilerinin daha iyi anlaşılmasıyla daha geniş kullanım alanı elde edilmiştir. TZP'nin içindeki trombosit sayısı normal kan düzeyinin 4-5 katı olması yeterlidir. Periferik kandaki trombosit sayısı  $\text{mm}^3$ 'te  $135-309 \times 10^3$  iken trombositten zengin plazmada  $\text{mm}^3$ 'te  $960 \times 10^3$  ölçülmüştür. Büyüme faktörlerinin miktarında da  $\text{mm}^3$ 'de % 200-700 oranında artış tespit edilmiştir (59). TZP'nin içindeki trombosit sayısını belirleyen faktörlerden en önemlisi TZP'nin elde edilmiş şeklidir. Bu işlem hızlı olmalı ve steril şartlarda gerçekleşmelidir.

Tibiada deneysel distraksiyon osteogenezisi uygulandığında, distraksiyon alanında yeni kemik oluşumunun ilk radyografik bulgularının osteotomiden ortalama  $20 \pm 5$  gün sonra görüntülenebildiği gösterilmiştir. Osteotomize edilen kemik uçlarından başlayan yeni kemik oluşumunun, normal şartlar altında birbirleri ile en erken  $29 \pm 7$ . günlerde köprüleşmeyi sağladıkları görülür (14). Uzatma süresi boyunca oluşan rejeneratın kalitesi, invaziv olmayan tekniklerle ölçülebilir. Bunlar konvansiyonel radyografi, ultrasonografi ,

kantitatif bilgisayarlı tomografi , dual enerji x-ışını absorpsiyometrisi ve kantitatif teknesyum sintigrafisidir. Bu tetkik metodları arasında rejenerat ile ilgili en iyi bilgiyi distraksiyonun her aşamasında KBT vermektedir (60,61). KBT ile kemik dansitesinin saptanmasında ölçüm birimi Hounsfield Unit (HU)'dir. Havanın dansitesi -1000 HU, suyun dansitesi 0 HU olarak kabul edilir (62). Havanın ve suyun dansiteleri kullanılarak ölçüm cihazının kalibrasyonu yapılır.

Deneyisel distraksiyon osteogenezisi konusundaki çalışmalarda, yeni oluşan kemiğin mekanik özellikleri; torsiyon, germe veya eğme kuvvetlerine karşı gösterdiği cevabın incelenmesi ile değerlendirilmektedir. Bunların içinde torsiyonel test, kemiğe gelen yükün tüm kemik boyunca düzenli biçimde dağılmasını sağlaması ve kemikteki en zayıf yerin tespitinde kemiğin boyundan etkilenmemesi nedeniyle özellikle uzun kemikler için uygun bir mekanik değerlendirme yöntemidir (63,64).

Deneyisel araştırma amacıyla yapılan distraksiyon osteogenezisinde, temin edilmelerindeki kolaylık, eksternal fiksator uygulanabilirliği ve uzatma süresince yapılması planlanan araştırmalara uyum sağlayabilmeleri açısından sıklıkla sıçan, tavşan ve köpek kullanılmaktadır. Bu canlılarda kullanılacak fiksatorler kolay uygulanabilir, hayvan anatomisine uygun, deney süresince zarar vermeyen ve yaşam koşullarını olumsuz etkileyen nitelikte olmalı; pratik bir uzatma işlemine izin vermeli ve yeterli stabiliteyi sağlamalıdır. Kemirgenlerdeki deneyisel ekstremite uzatma girişimlerinde kullanılmak üzere S.Green ve ark (24) tarafından geliştirilen *ilizarat* eksternal fiksator, istenilen nitelikleri sağlayan bir cihaz olması nedeniyle çalışmamızda kullanılmıştır. İlizarat fiksator, iki 5/8 lik halkadan oluşur. Halkalarda kirşner tellerinin horizontal planda geçebilmesi için iki sıra halinde delikler ve kirşner tellerini halkalara sabitlemek için bu deliklere dik yerleşimli yivli delikler mevcuttur. Her iki halka, uzatmayı sağlayacak teleskopik bir mekanizmayla birbirlerine bağlıdır. 5/8 lik halkalar, tibiadaki uygulamalarda diz fleksiyonuna izin vererek diz hareketlerinin kısıtlanmamasını sağlarlar.



Çalışmamızda, lokal enjekte edilen TZP'nin ekstremitte uzatma girişimi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu nedenle oluşturulan deneysel distraksiyon modeli kullanılarak, TZP'nin rejenerat oluşumundaki etkileri kantitatif bilgisayarlı tomografi ile kemik dansitesi ölçümü, mekanik test ve histolojik incelemeler ile incelendi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada ortalama ağırlığı 1795±127 gr (1600-2000 gr) olan 10-12 haftalık 12 Yeni Zelanda cinsi tavşan rastgele seçilerek 2 gruba ayrıldı. Distraksiyon osteogenezisi, sağ tibialarına osteotomi uygulanarak ve ilizarat eksternal fiksator kullanılarak sağlandı. Cerrahi girişiminin 1. 2. ve 3. haftalarında birinci gruptaki tavşanların osteotomi hattına 3 cc trombosit zengin plazma perkutan olarak enjekte edildi. İkinci grup , kontrol amacıyla kullanıldı ve cerrahi dışında herhangi bir girişim yapılmadı.

Tavşanlarda herhangi bir beslenme kısıtlamasına gidilmedi. Cerrahi girişim sonrasında 3. 4. ve 5. haftalarda yeni oluşan rejeneratın kemik yoğunluğu kantitatif bilgisayarlı tomografi ile ölçüldü ve röntgenografileri alındı.

Altıncı hafta sonunda tavşanlar yüksek doz Tiopental (Pentotal , Abbot S. P. A. Aprilla LT İtaly) ile öldürüldü. Tavşanların sağ tibiaları çıkarılarak mekanik teste tabi tutuldular. Mekanik test sonrası kemikler, dekalsifikasyon ve histolojik inceleme için patoloji departmanında işleme tabi tutuldular.

Tavşanlara uygulanan cerrahi işlem ve tıbbi uygulamalar etik ilkelerine uyularak ve UÜTF etik kurulunun onayı ile gerçekleştirildi. (27.3.2004 / 18).

### Cerrahi Teknik

Tavşanlar kas içine uygulanan 80 mg/kg ketamin hidroklorür (*Ketalar*, Pfizer İlaç San. Ltd.Şt., İstanbul, Türkiye) ve 12 mg/kg ksilazin (*Rompun*, Bayer Türk Kimya San. Ltd.Şt., İstanbul, Türkiye) ile uyutuldu. Profilaktik olarak her bir tavşana 250 mg. sefazolin sodyum (*Sefazol*, Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş. İstanbul, Türkiye) kas içine uygulandı. Tavşanların sağ alt ekstremiteleri mekanik kıl temizliği ve yıkamadan sonra Povidin iyodin ile

boyanarak cerrahi örtüm uygulandı. Distal halka ayak bileği ekleminin 1,5 santim üzerinde kalacak biçimde sağ tibialarına ilizarat eksternal fiksator sistemi yerleştirildi. Proksimal ve distal halkalar, birbirlerine 90 derece açılı olacak şekilde perkütan uygulanan 1,2mm'lik, ucu yivli 2'şer kirşner teli ile tibialara sabitlendi. Kirşner tellerinin yollanmasında elektrikli motor kullanıldı ve her iki kemik korteksi geçildi, halkalar arasındaki açıklık ilizarat fiksator sisteminin kapalı konumda olmasına dikkat edilerek ayarlandı

İlizarat fiksatorün uygulanmasından sonra proksimal ve distal halkaların arasından, medial kruris bölgesine 2cm'lik longitudinal insizyon yapıldı. Periost korunarak, insizyon hattına paralel kesildi, distal tibiofibüler birleşim yerinin hemen distalinden tibiaya 1 mm'lik drill ile her iki korteksten geçen delikler açıldı. Bu seviyede, osteotom ile tibia osteotomize edildi.

Osteotomi bölgesinin yıkanmasından sonra kirşner telleri, 3x5 mm'lik metrik-3 vidalarla ilizarat fiksator halkalarına sabitlendi. Periost 4/0 vicryl, cilt 3/0 prolene ile primer dikildi. Cerrahi sonrasında, tavşanlar kafeslerine konarak uyanmaları beklendi. Deney süresince cerrahi girişime veya anestezije bağlı komplikasyon gözlenmedi

Tüm tavşanlarda, cerrahi girişimi takiben altı günlük bekleme süresinin bitiminde uzatmaya başlandı. Uzatma hızı ve ritmi 2x0.25 mm / gün olacak şekilde yapıldı, işleme 20 gün devam edilerek bu süre sonunda yaklaşık 10 mm'lik uzatma sağlandı. Deney boyunca tavşanların hareketlerini kısıtlayıcı herhangi bir girişimde bulunulmadı, kirşner uygulanan bölgelerine hergün povidon iyod ile pansuman yapıldı.

### **Trombositten Zengin Plazmanın Hazırlanması**

Ketamin hidroklorür ve ksilazin ile uyutulan tavşanın femoral veninden yaklaşık 20 ml venöz kan alınarak cihazın içinde bulunan kaba yerleştirildi. Her 20 ml kan için 1 ml sitrat kullanıldı. Daha sonra bu kap özel olarak

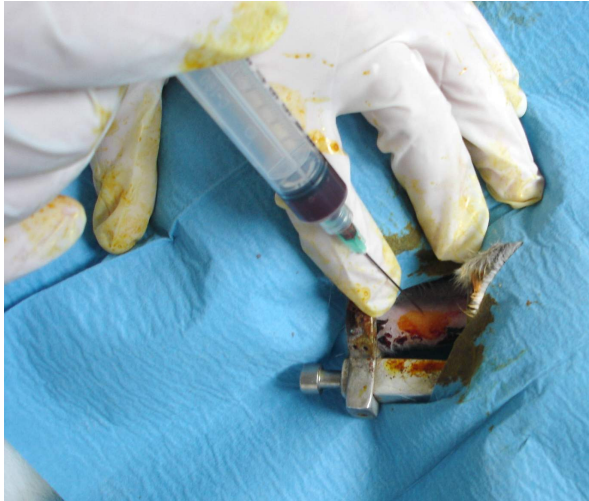
hazırlanmış bir santrifüj cihazına yerleştirilerek 14 dakika yüksek devirde santrifüj edildi. Bu işlem sonunda kabın içindeki özel bölümde, alt tarafı kırmızı üst tarafı beyaz renkte olan 2 ayrı kısım oluşmuştu. Trombositten fakir olan üstteki beyaz kısım özel bir enjektör yardımıyla uzaklaştırıldı. Kalan yaklaşık 3 ml'lik trombositten zengin plazmaydı ve başka bir enjektörle çekilerek uygulanmak üzere hazır tutuldu.



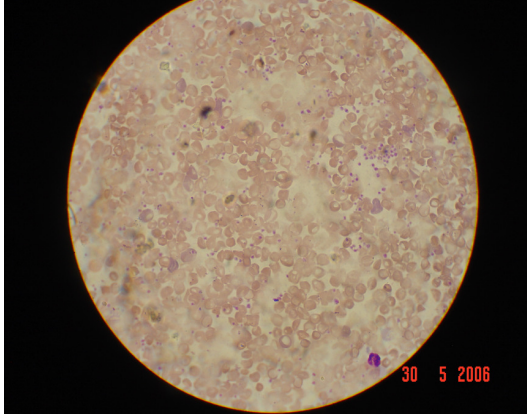
Şekil-2 Trombositten fakir plazmanın uzaklaştırılması



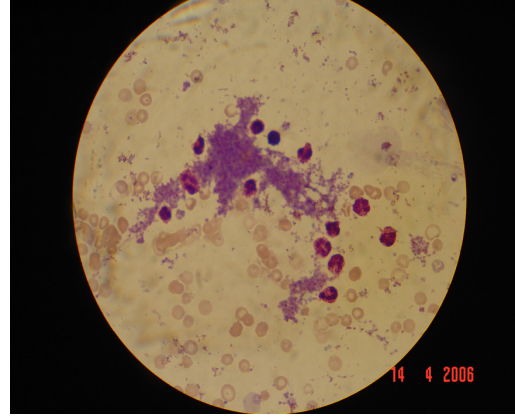
Şekil-3 Trombositten zengin plazmanın elde edilmesi



Şekil-4 Trombositten zengin plazmanın uygulanması



Şekil-5 Tavşan kanı periferik yayması



Şekil-6 Trombositten zengin plazmanın periferik yayması

### **Kemik Dansitesi Ölçümü**

Cerrahi girişimi takip eden 3, 4, 5. haftalarda UÜTF Radyoloji anabilim dalının yardımı ile bilgisayarlı tomografi kullanılarak rejeneratın kemik mineral yoğunluğu kantitatif yöntem ile ölçüldü (Siemens Osteo Ct Somotom HiQ,Almanya ). Ölçüm öncesi cihazın standardizasyonu su, hava ve model DPA/QDR-1 Anthropomorphic Spine Phantom ile yapıldı. Ölçüm birimi olarak "Hounsfield Units" (HU) kullanıldı. İlk ölçümde tavşanların sağlam tibialarına ait kortikal kemiklerin dansiteleri ölçüldü ve referans değer olarak kaydedildi.

Tavşanlar KBT ölçümleri sırasında ketamin hidroklorür ve ksilazin ile uyutuldu. Uzatma bölgesinin proksimalindeki kortikal kemikten başlanarak 2mm aralıklarla distaldeki kortikal yapı görüntülünceye kadar aksiyel tarama yapıldı. Rejeneratın en iyi görüldüğü aksiyel kesitten, her seferinde 3 farklı noktadan olmak üzere dansite ölçümü yapılarak değerler kayıt edildi. Sonraki ölçümlerin aynı bölgeden yapılabilmesi amacı ile, ölçümlerin yapıldığı kesit seviyesi ilizarat fiksator üzerine işaretlendi. Aynı seansta tibiaların radyografileri çekilerek oluşan rejeneratın niteliği değerlendirildi.

### **Mekanik Değerlendirme**

Uzatma yapılan sağ tibia kemiklerinin mekanik özellikleri Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi mekanik laboratuvarında torsiyonel test cihazı ile ( SMI MKII Torsion Testing Machine, TecQuipment Ltd. Nottingham,NG10 2AN, İngiltere) ölçüldü. Tibianın torsiyon test cihazına uygulanabilmesi için uçlarına sıvı polyester kullanılarak kalıp döküldü. Polyesterin tam katılaşmasından sonra tibialara torsiyonel yüklenme ile test edildi. Torsiyon cihazı ile mekanik yüklenmenin başlangıcında, dijital olarak ölçülen moment değerinde belirlenen ilk değişim anından sonra açısız değerler ve tork direncini ölçen cihazlar sıfırlanarak test verilerinin kaydedilmesine başlandı. Bu şekilde test cihazı ile kemikler arasında olabilecek uyumsuzluklar ortadan kaldırıldı. Torsiyon açılarına karşılık gelen tork değerleri belirlendi ve kayıt edildi.

İşleme kemikte kırık oluşuncaya kadar devam edilerek kemiğin maksimum moment ve maksimum torsiyonel açılanması saptandı. Tork direncini gösteren moment değerlerinin birimi newtonmetre (Nm), açı birimi derece cinsinden kayıt edildi.

## **Histoloji**

. Histolojik inceleme için tibialar % 10'luk formik asit solüsyonu içinde 15 gün bekletilerek dekalsifiye edildi. Daha sonra rejenerattan longitudinal ve transvers planlarda alınan doku parçaları dehidratasyonu takiben parafin bloklara gömüldü. Bu örneklerden 4 µm' lik kesitler alınarak hemotoksilen eozin ile boyandılar. Histolojik değerlendirmede, eksternal ve internal kallus oluşumu, endokondral ve intramembranöz kemikleşmenin varlığı, iyileşme bölgesindeki damarlanmanın durumu ve yeni oluşan kemik trabeküllerinin özellikleri incelendi.

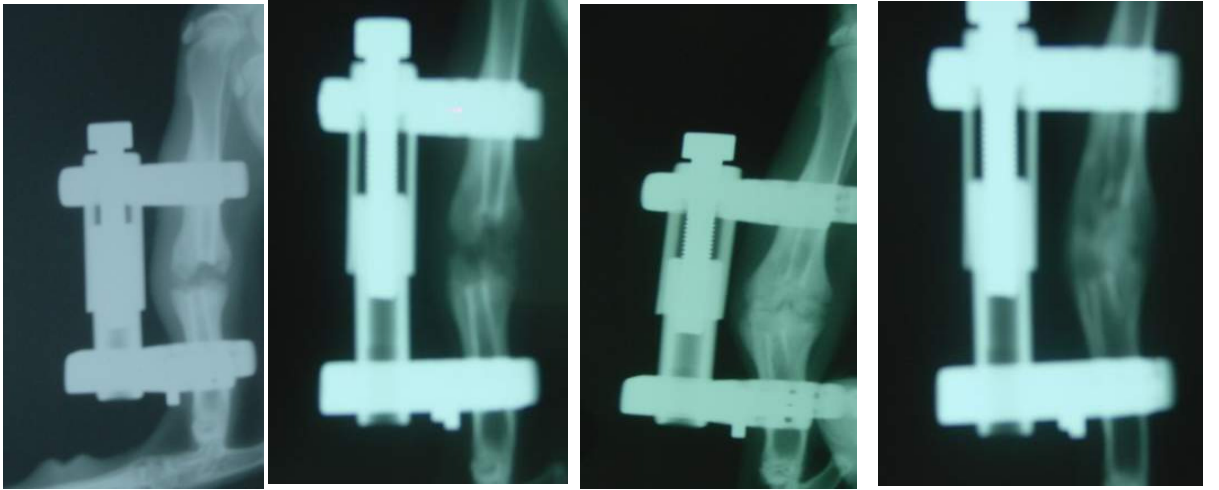
## İstatistiksel Değerlendirme

Bilgisayarlı tomografi ile kantitatif dansite ölçüm sonuçları haftalık olarak kayıt edildikten sonra, her tavşan için elde edilen üç dansite sonucunun ortalaması o haftanın, rejeneratın dansitesi olarak alındı. Dört hafta sonunda elde edilen tüm sonuçların standart sapmaları hesaplanarak, haftalara göre hem TZP enjekte edilen, hem kontrol grubundaki tavşan tibialarının dansiteleri grup içinde ve gruplar arasında karşılaştırıldı. Bu analizlerde SPSS 13 istatistik programı kullanıldı. Değerler bağımsız değişkenler için t testi ile gruplar arasında, Wilcoxon Signed Ranks testi ile grup içinde değerlendirildi.

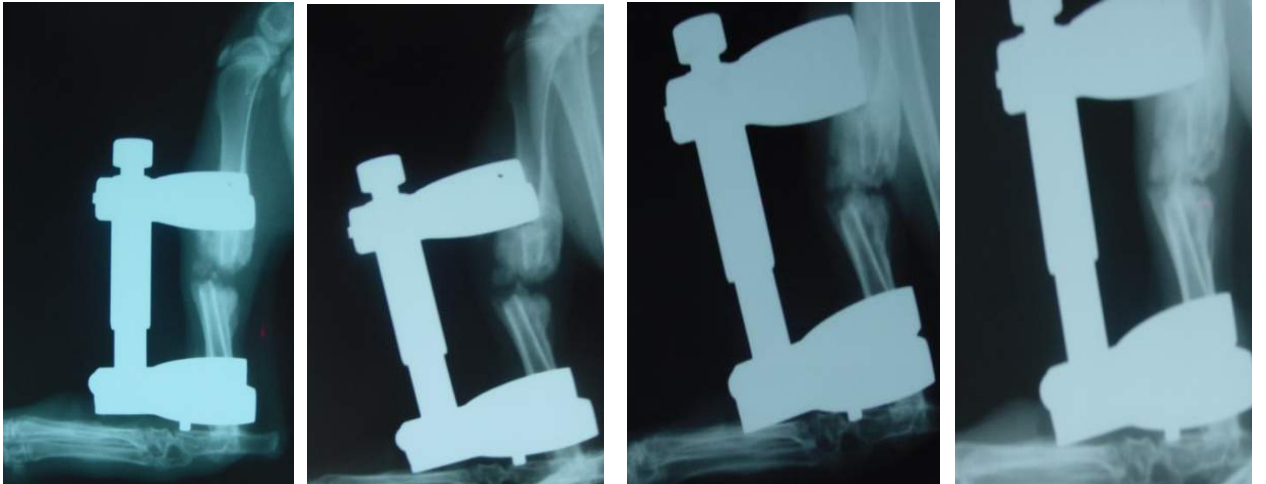
Mekanik testler sonucunda elde edilen sayısal değerlerden maksimum torsiyon açısı ve maksimum tork değerleri Microsoft Excel programı ile grafik ortama dönüştürüldü. SPSS 13 istatistik programı kullanarak gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı

## BULGULAR

Cerrahi girişimden sonra, deney süresince tavşanlar ilizarat eksternal fiksatöre uyumsuzluk göstermediler ve uzatma işlemini iyi tolere ettiler. Eksternal fiksatöre bağlı ek zedelenme ve çivi yolu enfeksiyonu gelişmedi.



Şekil-6 TZP enjekte edilen gruptaki bir tavşanın 3,4,5, ve 6. haftalardaki seri radyografileri (soldan sağa)



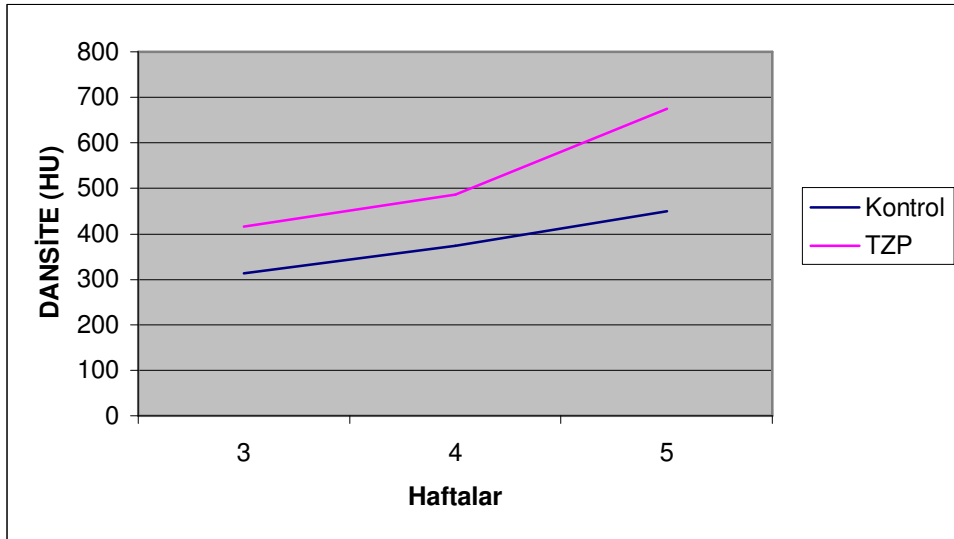
Şekil-7 Kontrol grubundaki bir tavşanın 3,4,5, ve 6. haftalardaki seri radyografileri (soldan sağa)



## Kemik Dansitometrisi Sonuçları

Oluşan rejeneratın bilgisayarlı tomografi ile dansite ölçümlerinde, üç farklı noktadan elde edilen değerlerin aritmetik ortalaması alınarak standart sapmaları (STD) hesaplandı.

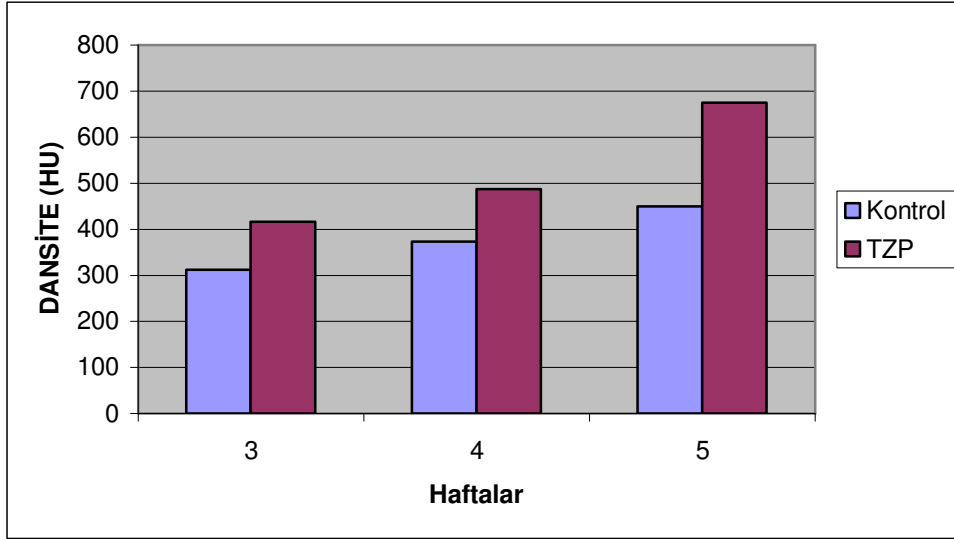
Üçüncü haftadaki ilk KBT değerlendirmelerinde kontrol grubunun uzatma bölgesinde kemik dansitelerinin ortalaması 313 HU ölçülürken, TZP uygulanan grupta 416 HU olarak bulundu. Uzatma işleminin henüz devam etmekte olduğu bu ilk kemik dansitesi ölçümlerinde, kontrol grubunun ortalama dansitesi, TZP uygulanan gruba göre % 32 oranında düşüktü. Dördüncü haftada kontrol grubunun dansite ortalaması 374 HU, TZP uygulanan grupta 487 HU iken, beşinci haftada bu değerler sırası ile 450 HU ve 675 HU olarak ölçüldü. Grupların kemik dansiteleri birbirleri ile kıyaslandığında her 3 hafta ölçümünde de TZP uygulanan grubun değerleri belirgin biçimde yüksekti. (3.hafta için  $p=0.000$  ,  $t=8,243$  ; 4. hafta için  $p=0.000$ ,  $t=11.679$  ve 5. hafta için  $p=0.000$ ,  $t=11,696$ )



Şekil-8 Grupların haftalara göre rejenerat dansitesinin değişimi

Tablo 1 : Gruplarda ölçülen rejenerat dansitesi değerleri

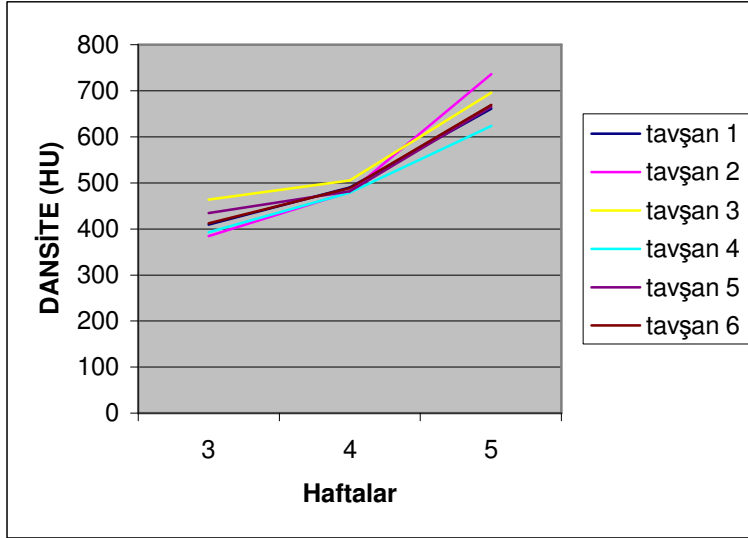
Grup		3. hafta	4. hafta	5. hafta
Deney grubu	Ortalama	416.18	487.60	675.36
	Standart sapma	29.13	9.94	37.82
Kontrol grubu	Ortalama	313.31	374.10	450.00
	Standart sapma	9.25	21.62	28.22



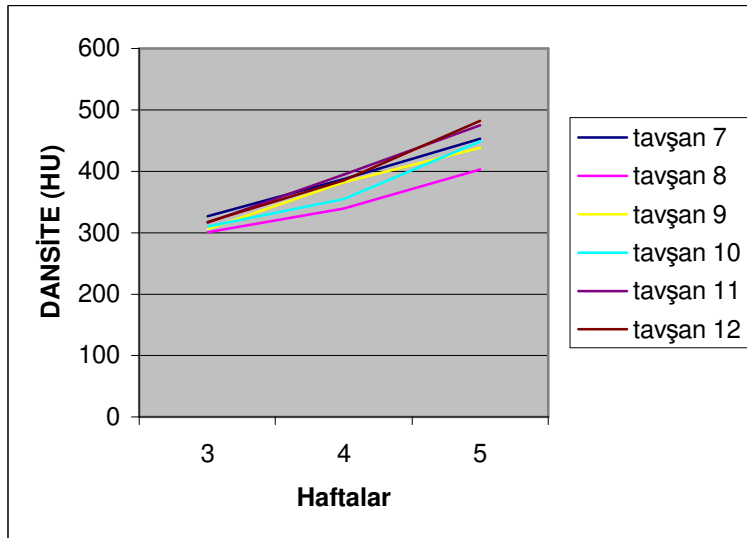
Şekil-9 Grupların kemik dansitesi ölçümlerinin haftalara göre değişimi

Deney sonunda kontrol grubundaki tavşanların rejeneratlarında saptanan dansite artışı, ilk ölçümlerine göre %43.65, TZP enjekte edilen

grupta ise %62.27 oranındaydı. Haftalık dansite artışları karşılaştırıldığında heriki grupta da 3. ile 4. , 4. ile 5. ve 3 ile 5. haftaların değerlerindeki artış anlamlı boyuttaydı (3-4. haftalarda  $p=0.02$ , 4-5. haftalarda  $p=0.02$ , 3-5. haftalarda  $p=0.02$ ).



Şekil-10 TZP enjekte edilen gruptaki tavşanların rejeneratlarındaki dansite değişimi



Şekil-11 Kontrol grubundaki tavşanların rejeneratlarındaki dansite değişimi

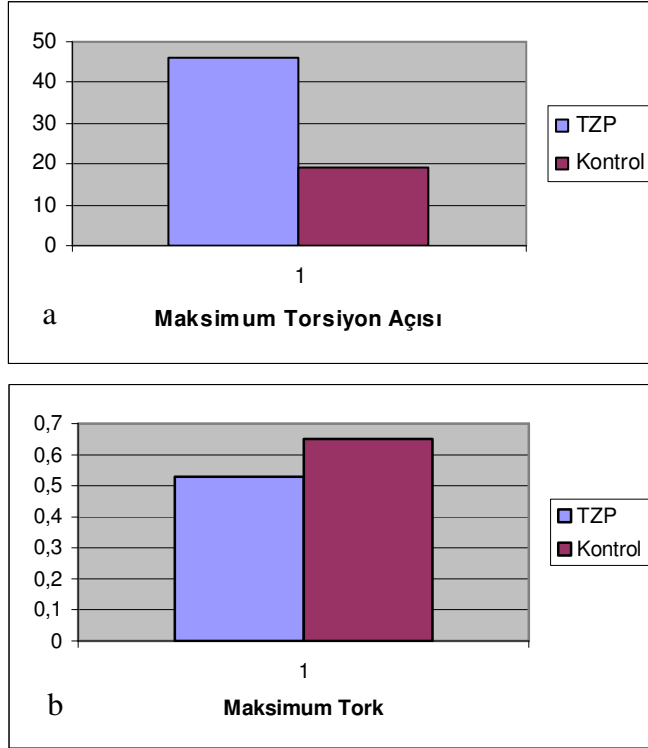
## Mekanik Test Sonuçları

Tavşanların tibiaları, torsiyonel test sırasında kemiğin maksimum tork direncinin aşıldığı noktada oblik, spiral tipte kırıldılar. Kırık hatları, kemiklerin ucundaki polyster kalıplara yakın bölgeden başlayarak, rejenerat bölgesine doğru uzanan biçimdeydi. Mekanik testlerde maksimum torsiyon açıları ve maksimum tork değerleri kullanıldı.

Tablo 2 : Grupların ortalama maksimum torsiyon açısı ve tork değerleri

Grup		Maksimum Torsiyon Açısı (derece)	Maksimum Tork (Nm)
Deney grubu	Ortalama	46.50	0.53
	Std Deviasyon	25.31	0.23
Kontrol grubu	Ortalama	19.33	0.65
	Std Deviasyon	2.80	0.33
Toplam	Ortalama	30.20	0.59
	Std Deviasyon	20.36	0.28

Distraksiyon osteogenezisi yapılan tibiaların Mekanik testlerinde TZP enjekte edilen grubun maksimum torsiyon açıları kontrol grubuna oranla daha büyüktü ( $p=0.024$ ). Maksimum tork değerleri açısından, gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu ( $p=0.589$ ).



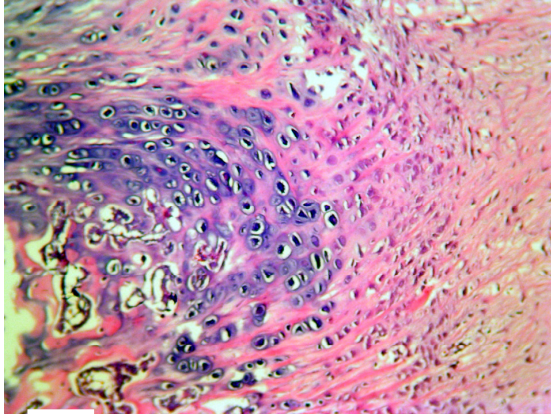
Şekil-12 Grupların maksimum tork (a) ve maksimum torsiyon açısı (b) sonuçları

## Histolojik Değerlendirme Sonuçları

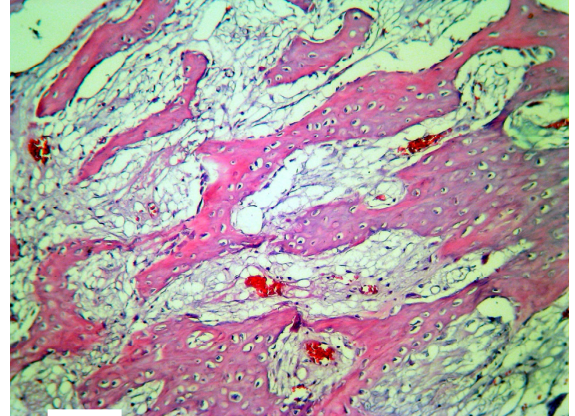
Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerin incelenmesinde, eksternal ve internal periostal kallus dokusunun geliştiği izlendi. Rejenerat bölgesinde sayıca artmış, iyi biçimlenmiş ve osteoblastlarla çevrelenmiş olan kemik trabekülleri, yer yer birbirleri ile birleşerek bir kemik ağı oluşturmakta ve genelde kırık hattına uzunlamasına yönelmekteydiler. Bu trabeküllerin arasında konjesyone görümlü bol damar yapısı içeren genç bağ dokusu vardı. Bu bölgelerdeki kıkırdak adalarının olgun hiyalen kıkırdak özelliğinde olduğu ve yer yer endokondral kemikleşme odakları barındırdığı izlendi. Bu

odaklarda dağınık halde bulunan kondrositler, distraksiyon yönüne paralel sütunlar halinde dizilmişlerdi ve hipertrofiye görünümdeyiler. Daha nadir olmak üzere fokal alanlarda sıklıkla periosteal olarak direkt bağ dokusundaki osteoblastlardan yeni kemik trabeküllerinin oluştuğu intramembranöz kemikleşme alanları izlendi. İki tavşanda kallus dokunun matür kemik yapısını kazandığı ve yeni oluşan kemik trabekülleriyle distrakte kemik uçlarının birbirine bağlandığı görüldü. Yeni oluşan kemiğin orjinaline göre daha az kompakt görünümde olduğu ve yeni korteksin de daha ince olduğu görüldü.

TZP enjekte edilen grupta, kontrol grubuna benzer şekilde eksternal ve internal periosteal yeni kemik oluşumu izlenmiştir. Dört tavşanda kallus dokusunun şekillenerek normal kemik yapısını kazandığı ve distrakte edilen kemik uçlarının birbirine bağlandığı dikkati çekti. İki tavşanda internal alanda düzensiz, organize olmamış kallus dokusu izlendi.

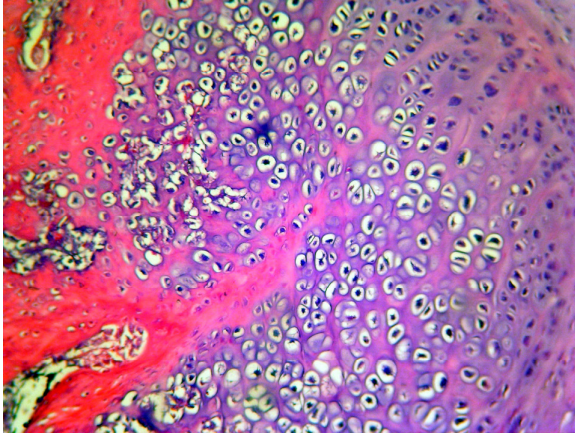


a

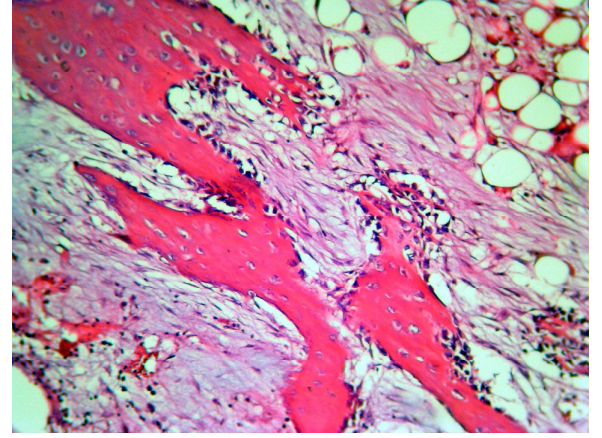


b

Şekil-13 Kontrol grubundaki rejeneratın histolojik görünümü [ a- endokondral ossifikasyon ( $\times 100$ ), b- intrabembranöz ossifikasyon alanında yeni oluşan kemik trabekülleri ( $\times 200$ ) ]



a



b

Şekil-14 TZP enjekte edilen gruptaki rejeneatın histolojik görünümü [ a- endokondral ossifikasyon , b- intramembranöz ossifikasyon ]

## TARTIŞMA

Doku iyileşme süreci , doku tamirini artırmak için uyum içinde hareket eden çok sayıda büyüme faktörünü içerir. Bu büyüme faktörleri kemik iyileşmesini olumlu etkiledikleri için ortopedik cerrahide kullanılabilecek bir yöntem olarak görülmüşlerdir. Büyüme faktörlerinin salınımı trombositler tarafından gerçekleştirilmektedir. TZIP, plazmanın düşük volümünde daha fazla trombosit içeren formudur ve distraksiyon osteogenezisinde bu konu ile ilgili apılmış deneysel çalışma yoktur. TZIP içediği büyüme faktörleri sayesinde distraksiyon osteogenezisinin her aşamasında etkilidir. PDGF; fibroblastların mitogenezini, anjiogenezini artırmakta ve endosteal osteoblastların rejenerat sahasına transferini kolaylaştırmaktadır. TGF-β kollajen sentezini ve monosit stimülasyonunu artırmaktadır. IGF kemik yapımını hızlandırır ve organize eder. Fibroblastlar; distraksiyon sahasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluşturur, osteojenik hücrelerle birlikte etkileşime girerek matriksin organizasyonunu sağlar ve kolajen sentezler. Kollajen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığını artırır. Fibroblastlar distraksiyonun birinci haftasında görülmeye başlarlar. Osteoblastlar; mineralizasyonu sağlarlar ve içerdikleri veziküllerde yüksek konsantrasyonlarda kalsiyum ve fosfat iyonları, adenosin mono fosfat, adenosin tri fosfat, alkalenfosfat, kalsiyum bağlayan protein ve fosforin içerirler. Bu veziküllerin salınmasıyla matriks kalsifikasyonu başlar. Osteoblastlar da fibroblastlar gibi distraksiyonun birinci haftasında görülmektedir. Kollajen sentezi ve anjiogenezis distraksiyonun ikinci haftasında oluşmaya başlamaktadır. İlk TZIP enjeksiyonu hücre yapımını hızlandırmak için distraksiyonun birinci haftasında, ikinci enjeksiyon vaskülerizasyonu artırmak için ikinci haftada ve üçüncü enjeksiyon kemik matürasyonunu artırmak için üçüncü haftada enjekte edilmiştir.

Distraksiyon osteogenezisini sırasında gelişen yeni kemik dokusu oluşumunu olumlu ve olumsuz etkileyen birçok etken vardır. Mekanik olarak ekstremitelere yük verdirilmesi (mekanik kompresyon), ultrasonografik uyarım,



elektromanyetik uyarım, elektrik uyarımı, kısa dalga akım tedavisi yeni kemik gelişimini hızlandırıcı etkenlerdendir. Kalsiyum sülfat, trikalsiyum fosfat, çitosan, otolog ve allogreftler, kemik iliği ekstraları gibi osteoindüktif etkili biyomateryallerin; büyüme ve paratiroid hormonları, östrojen ve prostoglandin E2'nin de distraksiyon osteogenezisine olumlu etkileri vardır. Bunların yanında kemik morfojenik proteini (BMP) ve çeşitli büyüme faktörlerinin (VEGF,FGF,TGF) klinik ve deneysel çalışmalarda distraksiyon osteogenezisinde kemik gelişiminin niteliğini ve hızını olumlu etkilediği gösterilmiştir (8,65). Ekstremitte uzatma amacıyla yapılan cerrahi girişimlerde periostun ve kemik iliğinin zarar görmesi, distraksiyonun hız veya ritminin artırılması, eksternal fiksatorün stabilitesinin ve rijiditesinin yeterli olmaması veya uzatma bölgesinde enfeksiyonun varlığı gibi nedenler ise kemik iyileşmesinin yetersiz olmasına veya gecikmesine yol açarlar. Ayrıca radyoterapi, kemoterapi, steroid veya steroid dışı antienfamatuar ilaçların kullanımı, sistemik hastalıklar gibi doku kanlanması ve metabolizmayı etkileyen nedenler de distraksiyon osteogenezisinde kemik iyileşmesine olumsuz etkide bulunurlar. Doku iyileşme süreci , doku tamirini artırmak için uyum içinde hareket eden çok sayıda büyüme faktörünü içerir. Hayvanlardaki çalışmalarda trombosit kökenli büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi polipeptid büyüme faktörlerinin yumuşak doku tamirini artırdığı gösterilmiştir. Çeşitli hücreler, büyüme faktörleri ve proteinler bir diğeri ile etkileşime girerek, yaranın kısa zamanda ve yeterli bir şekilde tamirini sağlar. Yaralanma yada cerrahi girişim sonucu damar bütünlüğü bozulduğunda, trombositler açığa çıkan kollajen proteinlerine yapışarak, adenosin difosfat, serotonin ve tromboksan içeren granüller açığa çıkarırlar. Bu moleküller hemostatik mekanizmaya katılarak pıhtı oluşumunu başlatır. Diğer trombositler de bu bölgeye çekilerek trombosit tıkaçını oluşturur. Bu tıkaç fibrin olarak adlandırılan çözülmeyen protein fibrin ağı ile güçlendirilerek pıhtılaşma süreci tamamlanır.

Çalışmamızda, TZP'nin distraksiyon osteogenezisinde oluşan rejenerat miktarını artırdığı ve mineralizasyonu hızlandırdığı KBT ile dansitometrik olarak gösterilmiştir. TZP uygulanan tavşanlarda saptanan kemik dansitesi değerleri deney boyunca artış göstermiştir. Bu bulgular TZP'nin distraksiyon periyodu boyunca etkili olduğunu düşündürmektedir. Histolojik incelemede elde edilen bulgularda kemik dansitometrisi sonuçlarını desteklemektedir. Yasui N ve ark (66), sıçanda distraksiyon osteogenezisini histoloji ve farklı kollajen tiplerinde in situ hibridizasyon tekniği ile inceleyerek, distraksiyonun erken döneminde baskın olan kemikleşmenin endokondral tipte olduğunu, geç dönemde ise intamembranöz kemikleşmenin öne çıktığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda her iki grupta da çoğunlukla intramembranöz ve yer yer endokondral kemikleşme şeklindedir. TZP enjekte edilen grupta dört tavşanda kallus dokusunun şekillenerek normal kemik yapısını kazandığı ve distrakte kemik uçlarının birbirine bağlandığı dikkat çekerken kontrol grubunda bu sayı iki tavşanla sınırlı kalmıştır. Bu da TZP' nin daha hızlı ve yoğun rejenerat oluşumunda katkıda bulunduğunu kanıtlamaktadır.

Kemik iyileşmesi ve distraksiyon osteogenezisi modellerinde kemiğin mekanik dayanıklılığı çekme, eğme ve torsiyon ile test edilebilir. Torsiyonel test, distraksiyon osteogenezisi uygulanan uzun kemiklerin dayanıklılığını değerlendirmede en uygun fizik koşulları sağlaması nedeniyle çalışmamızda kullanılmıştır. Mekanik test sonucunda uzatma yapılan tavşan tibialarının TZP enjeksiyonuna bağlı olarak dayanıklılıklarının arttığı saptanmıştır. Mekanik testin uygulandığı dönemde rejeneratın olgunlaşmasının henüz tamamlanmaması ve elastik yapıda olması nedeniyle torsiyon sırasında bu bölge esnemekte ve kollajen lifleri spiral bir form almaktadır. Böylece kemik, kırılmaya neden olan tork zorlanmasına erişmeden önce daha fazla torsiyon açısını tolere edebilmektedir.

TZP' nin ilk klinik kullanımı Whitman (67) tarafından oral ve maksillofasial cerrahide olmuştur. Kemik grefti gereken olgularda, greftle birlikte TZP kullanmış, grefte çok iyi bağlandığı gözlenmiş ve daha hızlı doku

iyileşmesi elde etmiştir. TZP, oral ve maksillofasial cerrahi amaçlı girişimlerde kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin varlığı çeşitli deneysel ve klinik çalışmalar ile gösterilmiş olmasına karşın ortopedik cerrahide kullanımı fazla ilgi görmemiştir. Zhang ve arkadaşları (68) tavşanda 1 cm'lik kemik defekti oluşturarak araya gözenekli biyoseramik yerleştirmiş ve 1. gruba TZP enjekte ederken diğer gruba bir girişim uygulamamıştır. Tavşanları radyolojik, kantitatif tomografi ve histolojik olarak incelemiştir. Onikinci hafta sonunda TZP enjekte edilen grupta gözenekli biyoseramiğin etrafının tamamen kortikal kemikle çevrildiği gözlenirken, diğer grupta kortikal kemik devamlılığının oluşmadığını saptamışlardır.

Uygulanacak TZP' nin elde edilmesinde çeşitli teknikler ve cihazlar kullanılmıştır. Hazırlanan TZP'nin kolay, hızlı elde edilebilir ve güvenli olması, bunun yanında vericide minimal morbidite oluşturması önemlidir. Ayrıca TZP'nin biyolojik etkilerinin daha iyi anlaşılmasıyla içeriğindeki trombosit sayısının ve büyüme faktörlerinin belli bir konsantrasyonda olması gerektiği belirlenmiştir. Buna göre trombosit sayısının normal kan düzeyinin 4-5 katı olması yeterlidir. Çalışmamızda tavşan periferik kanındaki trombosit sayısı  $\text{mm}^3$ 'te 250-400 x  $10^9$  İken TZP deki trombosit sayısı 1.200-1.600 x  $10^9$  olarak ölçülmüştür.

Çalışmamızda elde edilen bulguların ışığında distraksiyon osteogenezisinde TZP kullanımını rejeneratı gerilmeye karşı dayanıklı kılar, mineralizasyonu artırır, kırıldak kallusun kemik kallus yapısına dönüşmesini ve kemik kallusun yeniden şekillenmesini hızlandırdığı saptanmıştır. Bu konudaki deneysel ve klinik çalışmaların artması ile distraksiyon osteogenezisinin klinik uygulamalarda TZP kullanımı ümit verici sonuçlar doğurabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Wiedemann M. Callus distraction: A New Method? *Cinical Orthop* 1996; 327:291-304.
2. Magnuson PB. Lenghtening shortened bones of the leg by operation. *Surg Gynecol Obstet* 1913;17:63-71.
3. Guarniero R. Femoral lengthening by the Wagner method. *Clin Orthop*. 1990;250:154-159.
4. Wagner H. Operative lengthening of the femur *Clin Orthop* 1978;136:125
5. De Bastiani G. Limb lengthening by callus distraction (callotasis) *J Pediatr Orthop* 1987;7:129.
6. Ilizarov GA. *Transosseous osteosynthesis-theoretical and clinical aspect of regeneration and growth of tissu*. Berlin Springer-Verlag 1992;137:257-260
7. Moseley CF. Leg lengthenng in the historical perspective. *Clin Orthop North Am* 1991;22:555-561.
8. Li G. New developments and insights learned from distraction osteogenesis. *Curt Opin Orthop* 2004;15: 325-330.
9. Kocaoğlu M. Management of stiff hipertrophic non union by distraction osteogenesis : a table 16 case . *J Orthop Trauma* 2003;17:543-548.
10. Aranson J,Shin HD. İmaging techniques for bon regenerate analysis during distraction osteogenesis. *J Pediatr Orthop* 2003;23:550-560.
- 11.Matsumota K. Advances in distraction techniques for craniofacial surgery. *J Med Invest* 2003;50:117-125.
- 12.Rhee ST, Buchman SR. Pediatric mandibular distraction osteogenesis: the present and futur. *J Craniofacial Surg* 2003;14:803-808.
13. Wang X. Distraction osteogenesis in corection of micrognathia and obstructictive sleep apnea syendrom. *Plast Reconstr Surg* 2003;112:1549-1557.
- 14.James A, Xinghu S. Experimental healing distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites. *Cinical Orthop. and Related Research*. 1994;301:25-30.

15. Aranson J, Harrison B. Mechanical induction of osteogenesis. Preliminary studies. *Ann Clin Lab Sci* 1998;18:195
16. Goodship A. The influence of induced micromovement upon the healing dog experimental tibia fractures. *J. Bone Joint Surg.* 1995; 67B: 650-652.
17. Ilizarov GA. Experimental studies of bone lengthening. *Eks. Khirurgiia Anesteziol.* 1969;14:3-7.
18. Ilizarov GA.: Clinical application of tension stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop* 1990;250:8-11.
19. Krupski W, Rapp J. Smoking and atherosclerosis. *Perspect Vasc. Surg.* 1998; 1:103-106.
20. Kryo A. Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures? *Ann Chir Gyneacol* 1993;82:54-57.
21. Marina R. Effect of rhythm and level of distraction on muscle structure. *Clinical Orthop. and Related Research* 2001;384:250-264.
22. Delloye C. Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. *Clinical Orthop* 1990;250:34-37.
23. Ilizarov GA. The tension stress effect on the genesis and growth of tissues. The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. *Clinical Orthop* 1989;238:249-257.
24. Stuart G. Muscle growth atrophy, and tissue engineering. *Orthop. and Related Research* 2002;403S.:126-132.
25. Dyachkova GV, UTENKIN AA. Extensibility of superficial fascia in elongation of the leg in experiment. *Orthop Traumatol Protez* 1980; 41:44-47.
26. Fitch RD. The effects of the ilizarov distraction technique on bone and muscle in a canine model. *Low Orthop* 1996;16:10-19.
27. Frankel Vh. The ilizarov technique. *Bull Hosp.Jt Dis* 1988;48:17-29.
28. Maffulli N. Callotasis lengthening. *Bull Hosp.Jt Dis* 1996;54:249-254.
29. Saleh M, HAMER AJ. Bifocal limb lengthening. *J Pediatr Orthop* 1993; 2:42-48.
30. Kawamura B. Limb lengthening. *Orthop Clin North Am* 1989;9:155-169.

31. Kawamura B. Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy. JBJS 1968; 50-A:851-878.
32. Kojimato H. Bone lengthening in rabbits by calus distraction. JBJS 1988; 70 B:543-547.
33. Sprul JT, Price CT. Recent advances in limp lengthening. Clinical advance. Orthop rev 1992;21:307-314.
34. Paley D. Current technique in limb lengthening. J Pediatr Orthop 1988; 8:73-75.
35. Hamanishi C. Bone mineral density of lengthened rabbit is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cell. Clin Orthop 1994; 303:250-255.
36. Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. Clin Orthop 1990;250:8-26.
37. Ilizarov GA. The tension stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of the rate and frequency of distraction. Clin Orthop 1989;238:249-281.
38. Ilizarov GA. The tension stress effect on the genesis and growth of tissues. Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. Clin Orthop 1989;239:263-285.
39. Natsuo Y, Motohiko S, Tomoatsu K et al. Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. British editorial society of bone and joint surgery. 1997;79-B,no 5,824-830.
40. Aranson J. The biology of distraction osteogenesis. Operative Orthopaedics, Ed by Chapman. JB. Lippincott Company, Philadelphia. 1993; p873-882.
41. Simpson AH. Fracture after distraction osteogenesis. JBJS 2000;82-B: 659-65
42. Stewer W. Bone healing of tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: Study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. The journal of trauma injury. Infection and critical care. 1999;46:110-115.
43. Tsuchiya H. Distraction osteogenesis after irradiation in a rabbit model: Journal of Orthop Sci 1993;10:627-633.

44. Subasi M. Effect of chemotherapeutic agents on distraction osteogenesis: Arch Orthop Trauma Surg 2001;121:417-421.
45. Pollak D. The effect of protein malnutrition and nutritional support on the mechanical properties of fracture healing in the injured rat: JPEN J Parenter Enteral Nutr 1986;10(6):564-7.
46. Narazaki K. Effect of extracorporeal shock waves on callus formation during bone lengthening. J Orthop Sci 2003;8:474-481.
47. Konstantinos N. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: An overview. Injury, Int. J. Care Injured 2006;37S:56-62.
48. Okazaki H. Stimulation of Bone Formation by Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 in Callotaxis Bone Lengthening of Rabbits. Calcif Tissue Int 1999;64:542-546.
49. Reggie J. Effect of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits. Bone 2003; 33: 248-255.
50. Tsubota S. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. JBJS 1999; 81-B:125-129.
51. Rauch F. Effects of Locally Applied Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 on Distraction Osteogenesis in a Rabbit Limb-Lengthening Model. Bone 2000; 26:619-624.
52. Eckardt H. Effects of Locally Applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. Journal of Orthopaedic Research 2003;21:335-340.
53. Yazawa M. Expression of bone morphogenetic proteins during distraction osteogenesis in rabbits. J Oral Maxillofac Surg 2003;61:587-592.
54. Gartner L. Color Textbook of Histology 1997;114-130.
55. Sprugel KH. Effects of growth factors in vivo. Am J Pathol 1987;129:601-613.
56. Bouletreau P. The molecular biology of distraction osteogenesis. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2002;30:1-11
57. Graziani F. The in vivo effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. Clin Oral Implants Res 2006;17:212-219.

58. Sethi P. The Use of Platelet Concentrate In Posterolateral Fusion: Biomechanical and Histological Analysis. 28 th Annual meeting of the International Society for the Study of Lumbar Spine (ISSLS)-Edinburgh Scotland June 2001.
59. Sherwin V. An Automated Cost-Effective Methodology For The Preparation of Growth Factor Enriched Autologous Platelet Gel. 4 th Annual Orthopaedic Tissue Engineering Meeting April 2000, Boston
60. Stewe WNU. Hiperbaric oxygen therapy mitigates the adverse effect of cigarette smoking on the bone healing of tibial lengthening: An experimental study on rabbits. *The Journal of Trauma* 1999; 47( 4): 752-759.
61. Mark DM, Mark A, Wikenheiser , Richard LM, David GL, Edmund YSC. Quantification of bone healing. Comparison of QCT, SPA, MRI AND DEXA. *Acta Orthop Scand* 1990;61(6):487-498.
62. Harp JH, Aranson J, Hollis M. Noninvasive determination of bone stiffness for distraction osteogenesis by quantitative computed tomography scans. *Clinical Orthop and Related Research* 1994;301:42-48.
63. Harp JH, Aranson J, Hollis M. Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis. *Clinical Orthop. and Related Research* 1994;301:73-79.
64. Orbay L, Frankel VH, Finkle JE, Kummer FJ. Canine leg lengthening by ilizarov technique. A biomechanical, radiologic, and morphologic study. *Clinical Orthop and Related Research* 1992; 278:265-273.
65. Ilizarov GA. *Transosseous osteosynthesis*, Ed by Gren , Springer-Verlag Berlin. 1992;137-287.
66. Yasui N. Factor affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1993;293:55-60.
67. Whitman DH. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55:1294-1299.
68. Zhang G. Experimental study of the effect of platelet-rich plasma on osteogenesis in rabbit. *Chinese Medical J* 2004;117(12):1853-1855.