

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DİZİN FOKAL OSTEOKONDRAL DEFEKTİNDE
MİKROKIRIK VE TROMBOSİTTEN ZENGİN
PLAZMA UYGULAMASI**

(Tavşanlarda Deneysel Çalışma)

UZMANLIK TEZİ

Dr. M. Efe MİREL
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nurzat ELMALI

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/160
proje numarası ile desteklenmiştir**

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalıştığım sürece, desteğini esirgemeyen, beni teşvik edip yönlendiren, bilgi ve deneyimleriyle eğitime, uzmanlık tezimin konusunun seçimine ve hazırlanmasına yaptıkları katkılarında dolayı danışman hocam sayın Prof. Dr. Nurzat ELMALI'ya, yaptığım çalışmalarında her zaman destek, ilgi ve anlayışını gördüğüm, yetişmemde katkıları olan hocam sayın Prof. Dr. Ahmet HARMA'ya, sayın Prof. Dr. Kadir ERTEM'e, sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARAKAPLAN'a ve sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fatih KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Son olarak, varlıkları ile bana güç ve destek veren, bu çalışmam ve uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarını eksik etmeyen, sabır ve anlayışıyla bana çok destek olan biricik eşim Dilek MİREL'e, babasından yaptığı fedakârlıklarla belki de en çok teşekkürü hak eden sevgili oğlum Derin Kutay MİREL'e, bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve tüm yetilerimi borçlu olduğum sevgili anne ve babama, ayrıca ihtisasım süresince birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma, tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Dr. M. Efe MİREL

2013 Malatya

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
RESİM LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Eklem Kıkırdağı.....	4
2.2. Hücreler (Kondrositler).....	5
2.3. Matriks.....	6
2.3.1. Kollajenler.....	6
2.3.2. Nonkollajen Proteinler (Glikoproteinler).....	8
2.3.3. Proteoglikanlar.....	9
2.4. Matriks Metalloproteinazları.....	11
2.5. Kıkırdak Hasarı ve Onarımı.....	11
2.6. Trombositler.....	13
2.6.1. Trombosit Granülleri.....	13
2.6.2. Trombositlerin Doku İyileşmesindeki Rolü.....	13
2.7. Trombosit Zengin Plazma (TZP).....	14
2.7.1. Trombosit Zengin Plazma İçerikleri.....	14
2.7.2. Büyüme Faktörleri.....	14
2.7.3. TZP'deki Growth Faktörlerin Etki Mekanizmaları.....	18
2.7.4. Trombosit Zengin Plazmanın Avantajları.....	19
2.7.5. TZP'nin Kullanım Alanları.....	19
2.7.6. TZP Tipleri.....	20
3. MATERYAL VE METOD.....	21
3.1. Çalışma Grupları.....	21
3.2. Trombositten Zengin Plazma (TZP) Hazırlanması.....	22
3.3. Cerrahi Teknik.....	23
4. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME.....	28

5. BULGULAR.....	31
5.1. Makroskopik Bulgular.....	31
5.2. İstatistiksel Analiz.....	34
5.3. Mikroskopik Bulgular.....	34
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
7. ÖZET.....	51
8. ABSTRACT.....	52
9. KAYNAKLAR.....	53



RESİM LİSTESİ

Resim 1. Santrifüj edilen otolog kandan elde edilen TZP	22
Resim 2. Cerrahi teknik diz eklemine makroskopik görüntüsü	24
Resim 3. Diz eklem kırıkta defekt ve mikrokirik oluşturulması	24
Resim 4. Periostun alınması ve defekte tespitin şematik görünümü	25
Resim 5. Periostun sutureasyonu ve fibrin glue uygulanması sonrası görüntüsü	26
Resim 6. Defekt içerisine periostun üst kutbundan TZP uygulanması	26
Resim 7. (A) grubunun defekt alanının 12.hafta makroskopik görüntüsü (ok)	32
Resim 8. (B) grubunun defekt alanının 12.hafta makroskopik görüntüsü (ok)	32
Resim 9. (C) grubunun defekt alanının 12.hafta makroskopik görüntüsü(ok)	33
Resim 10. (D) grubunun defekt alanının 12.hafta makroskopik görüntüsü(ok)	33
Resim 11. Tüm grupların 12. hafta yüzey skorlamaları	37
Resim 12. Tüm grupların 12. hafta matriks skorlamaları	37
Resim 13. Tüm grupların 12. hafta hücre dağılım skorlamaları	38
Resim 14. Tüm grupların 12. hafta hücre canlılık skorlamaları	38
Resim 15. Tüm grupların 12. hafta subkondral kemik skorlamaları	39
Resim 16. Tüm grupların 12. hafta kalsifiye kırıkta skorlamaları	39
Resim 17. A grubu H&E boyama ile mikroskopik görüntüsü	40
Resim 18. B grubu H&E boyama ile mikroskopik görüntüsü	40
Resim 19. C grubu H&E boyama ile mikroskopik görüntüsü	41
Resim 20. D grubu H&E boyama ile mikroskopik görüntüsü	41

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Eklem kıkırdağı matriksinin yapısal makromolekülleri	10
Tablo 2: Büyüme faktörleri ve eklem kıkırdağında etkileri	16
Tablo 3: International Cartilage Repair Society (ICRS) histolojik değerlendirme skalası	29
Tablo 4: Çalışmadaki dört grubun istatistiksel olarak karşılaştırılması	36



SİMGELER VE KISALTMALAR

PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü (platelet derived growth factor)
IGF	İnsuline like growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
rhBMP-2	Recombinant human bone morfojenik protein
PTH	Paratiroid hormon
TGF- β	Transforming growth factor- beta
PG	Prostoglandin
HKBF	Hyalen kıkırdak benzeri fibrokartilaj
IL-I	İnterlökin-1
dk	Dakika
SZP	Süperfacial zone protein
COMP	Cartilage oligomericprotein
TIMP	Tissue induced metalloproteinase inhibitors
CDI	Cartilage derived inhibitor
GH	Growth Hormon
H&E	Hemotoksilen eosin
MSA	Multiplication stimulating activity
TZP	Trombositten zengin plazma
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü – Alfa
EGF	Epidermal growth factor
TB	Toluidin blue
H	Saat
IgG	İmmünglobulin G
Ort	Aritmetik ortalama
SS	Standart sapma
im	İntra muskuler
iv	İntra venöz
Ark.	arkadaşları
Kg	Kilogram

HGF	Hepatocyte Growth Factor
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
RNA	Ribonükleik asit
PF- 4	Platelet faktör – 4
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
TZF	Trombositten zengin fibrin



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağı deforme edici kuvvetlere karşı direnç gösteren ve eklemlerimizdeki kemik yüzeylerini kaplayan, pürüzsüz, kaygan ve dayanıklı bir dokudur (1,2). Tam kat hasarında dokunun kendini onarma kapasitesi oldukça sınırlıdır. Bu yapının osteoartrit ve travma gibi nedenlerle hasarı milyonlarca insanı etkileyen yaygın bir problemdir. İyileşmesindeki temel sorun, orijinal eklem kıkırdağı dokusuna uygun, dayanıklı bir kıkırdak elde edilmesinde karşılaşılan ciddi güçlüklerdir. İyileşme, hyalen kıkırdak yerine fibröz kıkırdak ile olmakta ve bu tamir dokusu hyalen kıkırdağa göre biyomekanik olarak daha az dirençli ve çok kısa ömürlü olmaktadır (3).

Oldukça kompleks yapıda olan eklem kıkırdağında hücrelerin hacimsel oranı % 1.7 olup, neredeyse asellüler kabul edilir (4). Kan, lenf damarları ve sinirleri yoktur. Eklem yüzeyinden subkondral kemiğe ilerledikçe farklı tabakalardan oluşmaktadır. Yüzeyel, orta ve derin tabakalarındaki hücre ve ekstrasellüler matriksi oluşturan yapıların yoğunluk ve dağılımları farklılıklar gösterir (1,2). Ekstrasellüler matriksin kollajen yapısı gerilme kuvvetine karşı dayanıklılığını sağlarken, proteoglikan yapısı ise sıkışmaya karşı direncini yansıtır (5).

Eklem kıkırdağının iyileşme kapasitesinin kısıtlı olduğu yüzyıllardır bilinmektedir. 1743 yılında Hunter, "Bir kere bozulunca bir daha onarılamadığını"

belirtmiştir (6). Hunter'dan günümüze; eklem kıkırdağına bakış oldukça değişmiş ve statik bir doku olarak değil, daha dinamik bir doku olarak ele alınmaya başlanmıştır (7). Eklem kıkırdağının biyoloji, patofizyoloji ve biyomekaniği konusundaki bilgilerimiz özellikle son çeyrek asırda oldukça artmıştır (8).

Oldukça dayanıklı olan ve normal fizyolojik şartlarda seksen – doksan yıl bozulmadan kalabilen eklem kıkırdağı; travma veya enflamatuvar hastalıklar nedeniyle zarar görebilir ve/veya ilerleyici bir dejenerasyon sürecine girerek daha erken yaşlarda osteoartrit ile sonuçlanabilir (1,2,9). Hemen hemen herkeste yaşa bağlı olarak kıkırdaklarda fibrilleşme şeklinde yapısal bozukluklar görülebilirken, bunların subkondral kist ve osteofitlerle karakterize osteoartrite yol açıp açmadığı kesin değildir (10). Ancak, eklem kıkırdağındaki mekanik yaralanma, hücre apoptozisine neden olarak dejeneratif değişiklikleri başlatabilir (11).

Eklem kıkırdağında oluşan akut travmatik yaralanmalar daha çok genç hastalarda özellikle de spor yaralanmaları sonrasında görülmektedir (10). Bu yaralanmalar; kıkırdakta sınırlı kalan yüzeysel yaralanmalar ve subkondral kemiğe penetre olan yani osteokondral yaralanmalar olarak iki gruba ayrılabilir. Kıkırdakta sınırlı kalan yaralanmalarda; kondrositler çoğalıp toplansalar ve yeni matriks oluşturmaya başlasalar bile defekti onarmada yetersiz kalırlar (1,2,9).

Subkondral kemiğe penetre olan yaralanmalar ise; hyalen kıkırdak benzeri fibrokartilaj (HKBF) onarım dokusunun oluşması ile iyileşir. Bu onarım dokusu histolojik olarak hyalen kıkırdağa benzese bile, bir süre sonra bu dokuda genellikle dejeneratif değişiklikler oluşmaktadır (12). Fokal osteokondral defektlerin en sık nedeni Osteokondritis Dissecans'tır (10) ve Osteokondritis Dissecans tanısı alan hastaların uzun dönem takibinde, ilerleyici ve geri dönüşsüz bir hastalık olan osteoartrit oranının arttığı gösterilmiştir (13).

Kanlanma ve iyileşme potansiyeli iyi olmayan bu dokunun onarımına yardımcı yöntemler, klinik ve deneysel olarak birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bunlardan; eklem debridmanı, otojen periost greftleri ile onarım, otolog kondrosit transplantasyonu, mikrokirik oluşturulması, sitokinlerin etkilerinin azaltılması, osteokondral otogreft–

allogreftler, demineralize kemik matriksi ve büyüme faktörleri uygulamaları gibi yöntemler birçok çalışmada araştırılmıştır. Fakat bu yöntemlerin hiçbirisi hyalen kıkırdığın rejenerasyonunu sağlayamamıştır (14-20).

Osteokondral onarımın sağlanmasında, defektin durumu dışında yapılan tedavinin maliyeti de önemli etkidir. Greft materyallerinin maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle araştırmacılar farklı çalışmalara yönelmişlerdir. Bu amaçla, sadece hastanın kanı alınarak, otolog yolla elde edilen trombosit zengin plazma (TZP) uygulamaları değişik patolojilerin tedavisinde giderek artan sıklıkta yapılmaktadır.

TZP'nin hasarlı kondrositlerde potent bir kemotaktik ve mitojenik faktör olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir (15,19,20). Biz bu çalışmada, tam kat focal osteokondral defektlerin onarımında TZP'nin kıkırdak onarımı sürecine etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eklem Kıkırdağı

Hyalen kıkırdak yapısında olan eklem kıkırdağı, sinir ucu ve kan damarları içermemesi ile diğer destek doku tiplerinden ayrılır.

Hyalen kıkırdak mavimsi beyaz renkte olup esnek ve elastiki bir yapıya sahiptir (21-24). Hyalen kıkırdağın biyokimyasal ve histolojik yapısı sayesinde altındaki subkondral kemiği koruyucu özelliği mevcuttur (16). Yetişkin eklem kıkırdağı histolojik olarak dört tabakaya ayrılmaktadır (Resim 1). Hücre tipleri ve moleküler bileşimleri tabakalar arasında farklılık göstermekte ve bu tabakalar arasındaki morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel farklılıklar eklem yüzeyinden olan derinliğe göre değişmektedir (25,26).

1- Yüzeyel tabaka (superficial zone): Yüzeyel tabaka bir ile üç kat yassı hücre içeriğine sahip olup, bütün eklem kıkırdağı hücrelerinin % 10'unu oluşturur. Bu hücreler kendi ekstrasellüler matriks proteinlerini üretebilirler. Eklem bazal membran içermediğinden bu tabaka bazal membrana eşdeğer davranır. Yüzeyel tabaka kıkırdağı vücut sıvılarından ayırmakta ve içerdiği hücreler irritasyona hassas olup inlerlöklin-1 (IL-1)'e güçlü yanıt verirler (25,26).

2- Orta tabaka (middle zone): Bu tabaka matriks içerisine yerleşmiş sferik yapıdaki eklem kondrositlerinden oluşur. Bu hücreler eklem kıkırdağının yaklaşık % 80'ini meydana getirir (25,26).

3- Derin tabaka (deep zone) : Derin tabakadaki kondrositler; mor renk boyanırlar ve kollajenler, proteoglikanlar, glikoproteinler ve indirgeyici enzimler gibi ekstrasellüler matriks komponentlerini üretebilirler. Eklem lokalizasyonuna bağlı olarak tek hücre şeklinde veya chondrons denilen fonksiyonel koloniler şeklinde bulunabilir (25,26).

Tidemark (tidemark zone): Histolojik boyama ile görünür hale gelen, hücreden bağımsız 10 mikrometre (μm) kalınlığında bir çizgidir. Kalsifiye ve kalsifiye olmamış kıkırdak arasında yer alan ve moleküler içeriği bilinmeyen bir tabakadır. Kalsiyum içeren mineral depozitlerinin burada biriktiği bilinmekle birlikte, metabolik artıkların toplandığı bir bölge olduğu söylenebilir. Bu çizgi yaş arttıkça yukarıya doğru yer değiştirir (25,26).

4- Kalsifiye tabaka (calcified zone): Kondrositlerin en derindeki tabakası olup alttaki kemikle bir sınır oluşturur. Kemikten farklı olarak kalsifikasyonları daha seyreklerdir. Ayrıca subkondral kemik hemotoksilen-eosin ile pembe-kırmızı boyanırken, kalsifiye kıkırdak tabakası açık mor boyanır. Kemik yapısındaki besinlerin kıkırdağa difüzyonunda bir bariyer gibi davranma özelliğine sahiptir (25,26).

2.2. Hücreler (Kondrositler)

Mezenşimal hücreler embriyonel hayatın altıncı haftasında perikondrium kanallarının genişlemiş alanlarında öncü kıkırdak hücreleri halinde görülmeye başlar. Kondrositler mezenşimal hücre ailesinden olup bu öncü hücrelerden gelişirler. Kondrositler, oval veya yuvarlak çekirdekli, çekirdeğe yakın hücre merkezinde bir çift sentriol ve iyi gelişmiş bir golgi aygıtı içeren hücrelerdir (25,26).

Kondrosit membranı pek çok iyon kanalları içerir. Bu iyon kanalları sayesinde eklemdaki kondrositler, mekanik yüklenmelere iyon değişimi ile cevap verirler. Bunlardan potasyum kanalları ve kalsiyum kanalları elektrofizyolojik çalışmalarla tanımlanmıştır (25,26).

İntegrinler, kondrosit hücrelerin yüzey proteinlerini oluştururlar. Hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisini sağlayan integrinler " α ve β subunitlerinden oluşur. Eklem kondrositleri çoğunlukla " $\alpha3\beta1$ " ve " $\alpha V\beta3$ " kombinasyonlu integrinleri içermektedir. İntegrinler bağlanma ve sinyal taşıma kapasitesi seçiciliği gösterir. Dinlenmekte olan

kondrositte integrin seviyeleri çok düşük seviyelerdeyken, metabolik olarak aktif kondrositte ise integrin seviyeleri oldukça yüksektir ve yeni integrin subtipleri gelişir.

Kondrosit membranında yerleşen diğer spesifik reseptörler sayesinde çevredeki matrikse rağmen hormon ve doku sinyalleri kondrosit membranınca taranabilir. Hyaluronan reseptörleri, matriks metabolizmasında ve kondrosit matriksin hücre yüzeyine toplanmasında temel rolü oynar. Proteoglikanlar, hyaluronan reseptörleri ile kondrositlere bağlanırlar.

Kondrositler pek çok doku hormonu ve büyüme faktörlerine spesifik reseptörler yolu ile cevap oluşturabilirler. Bu faktörler arasında "asidic fibroblast growth factor (aFGF)", "basic fibroblast growth factor (bFGF)", "insulin like growth factor (IGF)", "Paratiroid hormon (PTH)", "transforming growth factor- β (TGF- β)" sayılabilir. Bu hormon reseptör ilişkisi ile kırıkta gelişimi ve erişkin kırıkta metabolizmasının düzenlenmesi sağlanabilir. Ayrıca bu ilişki makromoleküllerin sentezinde anabolik aktivite sağlamaktadır (25,26).

Kondrosit metabolizmasını etkileyen histamin, serotonin, interlökin-1 (IL-1), β -endorfin gibi katabolik mediyatörlerden IL-1'in reseptörü de iyi tanımlanmıştır. IL-1 reseptör konfigürasyonunda varyasyonlar saptanmakta ve bu varyasyonların artrit patolojisinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Kondrositler normal metabolizmaları esnasında bir miktar prostoglandin E2 ve prostoglandin F2a (PGE2- PGF2a) da üretir. IL-1 stimülasyonu ile PG sentezi 10 kat artmakta ve bu olay tamirin ve enflamasyonun stimülasyonunda yardımcı rol oynamaktadır (25,26).

Yetişkin bir organizmada aktif halde olmayan kondrositlerin metabolizma hızı çok düşüktür. Kondrositler erişkin hayat boyunca hücre proliferasyonu göstermez. İmmatür dönemde ve gelişim sürecinde, enzimatik olarak indirgenip doku kültürlerine konulduğunda, kırık iyileşmesi sürecinde, kondrosit metabolik olarak aktiftir. Aktif dönemde ise ekstrasellüler matriks üretiminde artış görülür. Ayrıca immatür kırıkta, proteoglikan içeriği ve bağlayıcı protein içeriği bakımından zengindir. Sonuç olarak hem yetişkin bir organizmada, hem de hayatın daha erken evrelerinde kondrositler, membrandaki spesifik reseptörleriyle enflamasyon ve travma gibi akut olaylara reaksiyon gösterebilir (26).

2.3. Matriks

Kıkırdak matriksi daha fazla doku sıvısı, daha farklı tiplerde, konsantrasyonlarda ve organizasyonlarda makromoleküller içermeleri nedeniyle diğer bağ doku matrikslerinden farklılık gösterir. İçerdiği bu doku sıvısı kıkırdak ağırlığının % 60-80'ini oluştururken yapısal makromoleküller kıkırdak ağırlığının % 20-40'ını oluştururlar. Kollajen lifler ve kondromukoproteinler kondrositler tarafından sentezlenerek matriksi oluştururlar. Matriksin homojen bir makroskopik görünümü varken moleküler yapısı üç sınıf yapısal makromolekülden oluşur. Bunlar kollajenler, nonkollajen proteinler (glikoproteinler) ve proteoglikanlardır (23,25).

2.3.1. Kollajenler

Kollajenler eklem kıkırdağının kuru ağırlığının % 50'sini oluşturur. On beş makromolekül protein içeren bir ailedir. Bu proteinler karakteristik helikal aminoasit zincirleri içerir. Eklem kıkırdak kollajeni oldukça dayanıklı, hayat boyu değişmeden kalan ve yarılanma süresi 50-300 gün olan bir yapıya sahiptir.

Kollajenin, kıkırdağın şeklini koruma ve tensil kuvvetini sağlama görevi vardır. Ayrıca diğer yapısal makromoleküller olan proteoglikanlar ve glikoproteinler kollajen yapı üzerine tutunmaktadırlar. Böylece kollajen, eklem kıkırdağına kuvvet uygulandığında proteoglikan akışına karşı koyabilmektedir (24).

Eklem kıkırdağı içeriğini Tip II, VI, IX, X ve XI olmak üzere en az beş tip kollajen oluşturur. Tüm bu kollajen tipleri, temel ve en küçük moleküller olan, " $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ " adı verilen protokollajenlerin farklı şekil ve sayılarda birleşmesiyle oluşmaktadır.

Eklem kıkırdak kollajeninin % 90'ını oluşturan ve onu deri, kemik ve fibröz doku kollajeninden ayıran yapı, üç adet $\alpha 1$ protokollajen içeren Tip II kollajendir. Tip II ve Tip XI kollajenler eklem kıkırdağını oluşturan kollajen fibrillerinin merkezinde bulunur. Bu merkez yapı etrafında tabakalar halinde Tip II kollajen molekülleri ve fibrilin yüzeyine yapışmış Tip IX kollajen yer alır. Fibrildeki kollajen tiplerinin çeşitliliği, kollajen fibrillerin büyüklüğünü ve şeklini belirlemektedir. Diğer minör kollajen tipleri bu majör fibril ağı arasında dağılmış halde bulunur.

Tip IX kollajenin bir kondroitin sülfat yan zinciri içerir. Bu molekül kollajen fibril ile proteoglikan arasında çapraz bir bağ meydana getirir. Bu özelliği dolayısıyla makromolekülleri fonksiyonel bir kompleks oluşturabilmek için biraraya getirebilir

(Kollajen fibril–proteoglikan agregat kompleksi). Tip VI kollajen fibril yapısında olmayan üç boyutlu bir ağ oluşturur ve kondronlar içerisinde bulunurlar. Tip VI kollajen, yüksek germe (tensil) stresi altındaki sinovyal doku, gözdeki trabeküler ağ gibi dokularda bulunur. Eklemdeki görevi de germe stresini dağıtmaktır. Tip X kollajen, fetal büyüme plağı kıkırdağının hipertrofik tabakasında bulunmaktadır. Tip VI kollajen gibi Tip X kollajen de ağ şeklinde olup, fibril yapısında değildir. Ayrıca Tip X kollajen, protokollajen içermez. Ancak diğer kollajen molekülleriyle çapraz bağlarak protokollajen moleküllerini alır. Bu olayın fetal kıkırdak dokunun kalsifikasyonunda önemli olduğu düşünülmektedir.

Deri, kemik ve fibröz doku Tip I kollajen yapısındadır. Defektli eklem kıkırdağı fizyolojik iyileşmeye bırakılırsa yeni oluşan tamir dokusunda Tip I kollajen yoğunluğu artmış olarak gözlenir. Tip II kollajen ise düşük orandadır. Bu fibröz kıkırdak şeklinde iyileşen kıkırdak doku defektinin tipik özelliğidir (25,27).

2.3.2. Nonkollajen Proteinler (Glikoproteinler)

Bu moleküller proteinle birlikte küçük miktarda oligosakkarit ve monosakkarit de içerirler. Bu moleküllerin bazıları matriksin makromoleküler yapısının organizasyonunda ve devamlılığında görev alır. Bu yüzden doku çimentosu olarak da adlandırılır. Geri kalan moleküller ise kondrositler ile diğer matriks molekülleri arasındaki ilişkide görev alır (25,26). Kıkırdağın majör glukoproteini, "cartilage oligomericprotein (COMP)"dir. Ağ şeklinde bağlanan beş monomerden oluşur. Kıkırdak harici matriksin majör glukoproteini, fibronektindir. Normal kıkırdakta çok düşük miktarda olup, oranının artması patoloji göstergesidir. Kondrokalsin eklem kıkırdağında bol miktarda bulunan ve kalsiyum bağlayan bir glukoproteindir. Laminin kondrositlerin perisellüler matriksinde bulunur. Laminin kıkırdak dışı dokularda bazal membranın majör komponentidir. Kıkırdakta bazal membran olmadığından görevi tam bilinmemektedir (26). Tüm bu makromoleküllerden; kartilaj spesifik Tip II kollajen, büyük agregan proteoglikan ve hyaluronan kıkırdak matriksinin esas komponentleridir. Bu üç molekül birlikte doku kuru ağırlığının % 90'ını oluştururlar. Bu üç majör elementle birlikte bulunan diğer kollajenler, küçük proteoglikanlar ve glikoproteinler ağırlık olarak olmasa da fonksiyonel olarak çok önemlidirler (25,26).

2.3.3. Proteoglikanlar

Protein çekirdeklere kovalen bağ ile bağlı polisakkarit zincirlerinden oluşan makromoleküllerden oluşur. Bu moleküllerin temel yapısını karbonhidratlar oluşturur. Eklem kıkırdağı en az üç tip proteoglikan içerir (25,26).

a. **Agregan proteoglikan:** Büyük miktarda kondroitin sülfat ve keratan sülfat içerir. Kıkırdağın majör proteoglikanlarıdır. Kompresyon kuvvetlerine karşı dokuya verdikleri sertlik ve dayanıklılığı matriksin interfibriler aralığının büyük bir kısmını doldurarak sağlarlar.

b. **Nonagregan proteoglikan (biglikan):** Amino-terminal uca yakın bir adet dermatan sülfat veya kondroitin sülfat zinciri içerir.

c. **Nonagregan proteoglikan (dekorin):** Amino-terminal uca yakın iki adet dermatan sülfat veya kondroitin sülfat zinciri içerir (Tablo I).



Tablo 1: Eklem kıkırdağı matriksinin yapısal makromolekülleri (28,29)

MOLEKÜL	YERİ	FONKSİYON
KOLLAJENLER		
Tip II kollajen	Makrofibrilin ana komponenti	Germe (tensil) kuvveti sağlar
Tip VI kollajen	Perisellüler alandaki mikrofibrillerde	Germe kuvvetinin dağılımı
Tip IX kollajen	Makrofibril yüzeyine çapraz bağlanır	Fibril–interfibriler bağlantı
TipX kollajen	Perisellüler kafes yapısında bulunur. Hipertrofik kondrositlerce sentezlenir.	Yapısal destek.. Fötal kıkırdak kalsifikasyonu
Tip XI kollajen	Makrofibrilin içinde ve üzerinde bulunur	Tip II kollajen ile fibril yapısının çekirdeğini oluşturur.
Tip XII– XIV kollajen	Olasılıkla makrofibrilin yapısına katılırlar	Bilinmiyor.
PROTEOGLİKANLAR		
Agregan	Major proteoglikandır. G1 bölgesiyle hyaluronan bağlar en fazla derin tabakada bulunur.	Kompresif dayanıklılık sağlar
Decorin	Eklem yüzeyi ve perisellüler alanda bulunur	Makrofibril yapının düzenlenmesi
Biglican	Aggregan'a benzer	Bilinmiyor
Fibromodulin	Dört keratan sülfat zinciri içerir	Decorin gibi
Lumican	İmmatürken keratan sülfat içerir	Decorin gibi
Syndecan	Hücre yüzeyinde bulunur.	
Perlecan	Heparan sülfat içerir.Hücre yüzeyinde bulunur	Hücre–matriks yapışmasında görevli
Superficial zone protein (SZP)	Eklem yüzeyi ve sinovyal sıvıda bulunur Yüzeyel tabaka hücrelerince sentezlenir.	Eklem kayganlığında görev alır
GLİKOPROTEİNLER		
COMP (Cartilage Oligomeric protein)	Trombospondin ailesinden beş kollu bir molekül	Tip II kollajen bağlar ve karmaşık makrofibriler yapıda görev alır.
Kondrokalsin	Eklam kıkırdağında bolca bulunur	Kalsiyum bağlar
Laminin	Perisellüler alanda bulunur.	Bilinmiyor.
Kondroadherin	Lökin'den zengin bir proteindir	Hücre–matriks bağlanmasında görevli
GLİKOZAMİNOGLİKANLAR		
Hyaluronan	Aggregan'ın G1 bölgesine ve bağlayıcı proteine bağlanır. Kollajen fibril ile etkileşir.	Aggregan'ın matrikste tutulması
Keratan sülfat	Agregan ve fibromodulin yapısında bulunur.	
Heparan sülfat	Perlecan ve syndecan yapısında bulunur.	
Kondroitin sülfat	aggregan ve Tip IX kollajen yapısında bulunur.	

2.4. Matriks Metalloproteinazları

Matriks metalloproteinazları kıkırdak matriksinin intrinsik komponentleri olup, stromelizin, jelatinaz, kollajenaz ve membran birleşik metallo proteinaz şeklinde sınıflandırılır. Kollajenazlar endoproteinazdır, üçlü heliks kollajen yapısındadır. Jelatinazlar indirgenbilir. Hem kollajenazlar hem de jelatinazlar kollajen harici diğer matriks proteinlerini de indirger. Stromelizinler pekçok substratı indirgeyebilir. Bunların arasında proteoglikanlar da bulunur. Proteoglikanlar indirgenince hyaluronan gibi molekülleri bağlayamaz (22,23,26).

Metalloproteinazlar kollajen fibrillerin ve proteoglikan bileşiklerin makro yapılarını parçalayarak matriks moleküllerinin normal döngüsünü bozar. Normal kıkırdakta metalloproteinazların ne kadar olduğu bilinmemektedir. Metalloproteinazların osteoartrit gelişmesinde ve ilerlemesinde rol aldığı düşünülmektedir (26).

Metalloproteinaz inhibitörleri "Tissue induced metalloproteinase inhibitors (TIMP)" olarak bilinir. TIMP I, II ve III ile "cartilage derived inhibitor (CDI)" olmak üzere dört izoformu bilinmektedir. CDI lenfatik sistemde sentezlenip kıkırdakta depolanır, kıkırdakta üretilmez. Bu inhibitörler kollajen gibi matriks proteinlerine bağlanarak kıkırdak matriksinin metalloproteinazlar tarafından indirgenmesini büyük oranda önler (25,26).

2.5. Kıkırdak Hasarı ve Onarımı

Eklem kıkırdak hasarı restorasyonundaki zorluklar kondrositlerle ilgilidir. Kondrositler izole yapılarına rağmen çevreden gelen mekanik etkilere, sitokinlere, büyüme faktörlerine cevap verebilir. Kondrositlerin stimülatörlerindeki değişiklikler eklem kıkırdağı yıkımının ve dejenerasyonunun sebebi olabilir. Diğer bütün biyolojik sistemlerde olduğu gibi eklem kıkırdağının da doğal yapısını koruyabilmesi için belli bir dengesi vardır. Başlangıçta sentez sabit kalmasına karşın denge zamanla yıkım lehine döner ve bu andan itibaren hastanın semptomları başlar (16,30-32).

Aşın mekanik stres veya enzimatik indirgenme matriks makromoleküler yapısını bozar. Ayrıca protein eksiklikleri, vitamin A, C, D eksiklikleri, yüksek enerjili radyasyona maruz kalmak da kıkırdak hücre dizilimini bozar. Çeşitli hormon tedavisi gören hastalarda da kıkırdak hasarına sıklıkla rastlanmaktadır (16,25).

Başlangıçta Tip II kollajen konsantrasyonu değişmeden kalır. Ancak, kollajen ağı hasar görebilir ve agregan protein konsantrasyonu azalmasına paralel olarak proteoglikan agregasyonu azalabilir. Matrikste su konsantrasyonu artar. Matriksin sertliği azalır ve geçirgenliği artar. Matriksteki bu bozulmayı kondrosit algılar ve buna cevaben matriks sentezini, proliferasyonunu ve indirgenmesini artırır. Bu cevap dokuyu tamir edebilir, doku statüsünü değiştirebilir, ya da kırıkta hacmini arttırabilir. Kondrositlerin aktivitesi yıllarca artmış olarak kalabilir. Yalnız katobolik aktivite anobolik aktiviteyi aşarsa veya eklem kırıkta tamamen kaybolup subkondral kemik açığa çıkarsa kondrosit cevabı belirgin olarak azalır (16,25). Herhangi bir nedenle harap olan kırıkta alanında nekrotik ve atrofik değişiklikler olur. Defekt perikondrium veya çevre fasyalardan ilerleyen bağ dokusu ile doldurulur. Bu bağ doku granülasyon dokusu şeklindedir. Yetişkinlerde tamir bu gevşek granülasyon dokusunun kırıkta dokuya dönüşmesi ile tamamlanır. Bu dönüşümlerde başlıca uyaranlar dış mekanik etkenlerdir (25). Tamir dokusundaki pek çok hücrenin sinovyumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Eğer subkondral kemik tabakaya penetrasyon varsa kemik iliğinden de hücreler gelebilir (17). Periosteal greftler ve otolog kırıkta hücreleri kullanıldığında tamir dokusundaki hücrelerin sadece % 7-8' inin transplante edilen dokudan geldiği görülmüştür (17,33).

Oluşan bu tamir dokusu normal hyalen kırıkta mekanik ve kimyasal olarak farklıdır. Pek çok araştırmacı kemik iliği hücrelerini tamir olayında kullanabilmek için defektli subkondral kemiğe kadar derinleştirirler. Böylece defekt birkaç ayda fibrokartilajinöz doku ile dolar. Genel olarak tüm deneysel metodlarda oluşan tamir dokusu normal dokuya göre daha yumuşaktır. Yük karşısında daha kırılabilir bir dokudur ve morfolojisiyle kimyasal bileşimi farklıdır. Ortalama bir yıl sonra tamir sahasına komşu kırıkta progresif dejenerasyon saptanır. Bu dejenerasyon tamir dokusuna da yayılır. Yenileyen bu dejenerasyon operasyon tekniğinden, defektin kenar stresinden veya bozulmuş eklem mekaniğinden kaynaklanabilmektedir (17,33,34). Eklem kırıkta hasarının tamirinde amaç, eklem kırıktağının tam restorasyonu, ağrıların ortadan kaldırılması, azalan veya kaybolan eklem hareketinin ve eklem fonksiyonunun yeniden kazanılması olmalıdır.

2.6. Trombositler

Trombositler kemik iliğinin multinükleer yapıdaki megakaryosit diye adlandırılan hücrelerinden oluşur. Megakaryosit parçaları sistemik dolaşıma girince trombosit olarak adlandırılırlar. Trombositlerin dolaşımdaki ömrü 9–10 gündür. Başlıca karaciğer tarafından üretilen trombopoetin hormonu trombosit yapımını uyarır ve trombositlerin çoğalmasını kontrol eder. Trombositler çapları 1.5–3.0 µm arasında değişen ve çok sayıda granül içeren renksiz hücrelerdir. Eritrositler gibi, çekirdeksiz ve diskoid yapıdadırlar. Hücre zarının sitoplazma içine doğru parmak şeklinde girmesi sonucu oluşan ve yüzeye açılan kanaliküler sistemine sahiptirler. Ayrıca RNA ve birkaç farklı granül tipi içerirler.

2.6.1. Trombosit Granülleri

Granüllerin içerdikleri maddeler hemostazda ve iltihaplara verilen tepkide rol alırlar.

- **Trombosit lizozomları veya Lambda granülleri:** Asit hidrolazlar içeren, 175–200 nm çapındaki granüllerdir.
- **Alfa granülleri:** Fibrinojen, faktör V, vitronektin, trombospondin, Von Willebrand faktörü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörlerini içeren, 300–500 nm çapındaki granüllerdir.
- **Delta granülleri:** ADP, ATP, kalsiyum iyonları, pirofosfat ve serotonin içeren, 250–300 nm çapındaki granüllerdir.

2.6.2. Trombositlerin Doku İyileşmesindeki Rolü

İn vitro veriler, trombositlerin ve içeriklerinin kemotaktik, migrasyonu hızlandırıcı, mitojenik etkileri ile doku iyileşmesinde rol oynadıklarını göstermektedir. Hücre seviyesinde bu süreç tam olarak bilinmese de içerdikleri granüllerden salınan büyüme faktörleri üzerinde durulmaktadır.

Trombositlerde bulunan alfa granülleri çok sayıda büyüme faktörü içerir. Bu büyüme faktörlerinin başlıcaları TGF-β (Transforming Growth Factor Beta), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), IGF-1 (Insuline Like Growth Factor-1), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ve PF-4 (Platelet faktör) dür (35). Bu büyüme

faktörlerden en iyi bilineni olan TGF- β kollajen sentezini ve depolanmasını uyaran en önemli uyarılardan biridir ve doku iyileşmesi ve fibrozis gelişmesinde önemli rol oynar (36). Potent fibrinojenik sitokinlerden biri olan TGF- β 'nın yüksek seviyelerinin patolojik fibrozis oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir (37).

Bu özellikleri nedeniyle trombositlerin lokal uygulanmasının ortama salınan büyüme faktörleri aracılığı ile hasarlı doku iyileşmesini de olumlu etkileyeceği düşünülmektedir.

Trombositten zengin plazma, çok miktarda trombosit ve dolayısıyla büyüme faktörü elde edilmesine yarayan ucuz, kolay ve minimal girişimsel yöntemlerle elde edilebilen bir kan ürünüdür ve gerek klinik uygulamalarda gerekse de deneysel çalışmalarda büyüme faktörü uygulanması amacıyla kullanılır.

2.7. Trombosit Zengin Plazma (TZP)

2.7.1. Trombosit Zengin Plazma İçerikleri

Hastadan alınan otolog venöz kanın santrifüj işlemine tabi tutulmasıyla elde edilir. Trombositlerde bulunan alfa granüllerin içindeki büyüme faktörlerin yara iyileşmesini olumlu şekilde etkilemesinden yola çıkılmıştır. Alfa granüllerin içinde büyüme faktörlerinden ön plana çıkanlar; PDGF (platelet derived growth faktör), TGF- β (trombosit growth faktör), VEGF (vasküler endotelial growth faktör), IGF-1 (insülin like growth faktör), PF- 4 (platelet faktör). Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada trombosit konsantrasyonunu arttırınca büyüme faktörlerinde lineer bir artış olduğu bildirilmiştir (35). Bu nedenle trombositten zengin plazma vererek ortamdaki trombosit miktarını yani GF konsantrasyonunu arttırma düşüncesinden yola çıkılarak kullanılmaya başlanmıştır (Tablo II).

2.7.2. Büyüme faktörleri

Çok az miktarları bile hücrel aktiviteyi etkileyebilen proteinlerdir. Hücrel fonksiyonları endokrin, parakrin, otokrin veya intakrin mekanizmalarla sağlar. Farklı faktörlerin görevleri ve etkileri ile ilgili yeni buluşlar sürmektedir (31,38-43).

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki, çoğunlukla tirozin kinaz

uyarılarak sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörü bulunur. Büyüme faktörlerinin o bölgedeki konsantrasyonu ve reseptöre bağlanan miktarı, elde edilecek sonucu belirler. Matriks de, büyüme faktörlerinin çözünebilirliğini değiştirerek, hücrenel aktiviteleri düzenleyecek faktör konsantrasyonunun değişmesini sağlayabilir. Ayrıca matriks, büyüme faktörlerinin bağlanıp çözülmesini ayarlayarak, ortamdaki faktörler için rezervuar görevi görür. Yine matriks, herhangi bir hücrenin, herhangi bir büyüme faktörüne vereceği yanıtı belirleyebilir (31,38–43).

İskelet sistemiyle ilgili primer düzenleyici büyüme faktörleri; IGF, FGF, TGF- β , PDGF ve rhBMP'dir (tablo II). IGF, ilk kez Daughaday ve Salmon tarafından tanımlanmıştır (44,45). Bu araştırmacılar hipofizektomi yapılan ratlarda büyüme hormonu (GH)'nin invitro olarak kıkırdakta sülfat emilimini stimüle ettiğini bulmuşlardır. GH tedavisi verilen hayvanlarda "sulphation factor" denilen bir madde tanımlanmıştır (44). Bu buluş dolaşımında GH etkisini yöneten bir faktör olduğu yönündeki araştırmalara hız vermiş ve somatomedin bulunmuştur. Birkaç yıl sonra da IGF –I tanımlanmıştır. En son olarak da rat karaciğer hücrelerinde bulunan ve IGF –II'ye benzeyen bir otokrin faktör olan "MSA (multiplication stimulating activity)" tanımlanmıştır (29,45,46).

Büyüme faktörleri, proliferasyon, migrasyon, matriks sentezleme ve ayırma gibi birçok hücrenel aktiviteyi etkilemektedirler. FGF, IGF ve TGF- β 'nın kondrosit metabolizmasını ve kondrogenezisi etkilediği gösterilmiştir. Kemik matriksi bu moleküllerle birlikte, BMP ve PDGF'yi de içerir. Bu nedenle, kemiğin açığa çıkmasına neden olan osteokondral yaralanmalar veya subkondral penetrasyon, mikrokırık, osteotomi gibi girişimler, kıkırdak onarımında önemli rol oynarlar (28,29).

Kondral ve osteokondral kayıpların büyüme faktörleriyle lokal tedavisi sadece subkondral kemiğe penetrasyon uygulamasından daha üstündür. Yapılan bir deneysel çalışmada, kobay dizinde kısmi kalınlıkta kondral kayıp oluşturulmuş ve buraya TGF- β kontrollü salınımı yapan fibrin matriks yerleştirilmiştir. TGF- β nın kıkırdak tamirini uyardığı gösterilmiştir. Kondral defekti dolduran hücreler buraya sinovyal dokudan göçüp, fibröz matriks oluşturmuşlardır. Hücrelerin büyüme faktörlerine yanıtı yaş ilerledikçe azalmaktadır (31,38–43).

Genç yaştaki kişilerdeki kondral veya osteokondral kayıpların büyüme faktörleriyle tedavisi umut vericidir. Ancak bu tedavi yaklaşımı ileri araştırmalarla

desteklenmelidir. Çünkü büyüme faktörleri eklem içindeki kıkırdakla beraber, tüm dokularıda etkilemektedirler.

Tablo 2: Büyüme faktörleri ve eklem kıkırdağında etkileri (28,29,47)

BÜYÜME FAKTÖRÜ	TEMEL ETKİSİ
IGF-I (Somatomedin-C)	Kıkırdak sentezini stimüle eder Osteoblast proliferasyonunu artırır Kemik matriks proteininde artışa sebep olur
IGF-II	Mitojenik, anabolik, genel olarak IGF-I den daha az etkili
FGF-1 (asidik fibroblast growth faktör)	Mitojenik, angiogenik, hücre ayrışmasında etkili
FGF-2 (bazik fibroblast growth faktör)	Mitojenik, angiogenik, hücre ayrışmasında etkili
TGF- β	Anjiogenezisi artırır Osteoblastlara ve endotelial hücrelere kemotaktik etki yapar Osteoklastları inhibe eder
BMP	Kemik formasyonu indükleyici
PDGF	DNA protein sentezini stimüle eder Mezenkimal hücrelere mitogenetik etki eder Endotelial hücrelere anjiogenetik etki eder
VEGF	Damar permeabilitesini artırır
PF- 4	Nötrofil ve fibroblastlara kemotaktik etki yapar

Epidermal growth factor (EGF); birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında salınır. Hücrelerin çoğunda EGF'e ait reseptörler bulunur. En çok sayıda reseptör epitel hücrelerde bulunur; ancak endotel hücreler, fibroblast ve düz kas hücrelerinde de reseptörler vardır. Epitel hücreler, endotel ve fibroblastlar için kemotaktik özelliği vardır. Anjiogenezi ve kollajenaz aktivitesini uyarıcı özelliğe sahiptir.

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF); mezenkimal hücreler için mitojen olarak ilk kez bulunan bu faktörün anjiogenezi uyardığı ve yara iyileşmesinde rolü olduğu gösterilmiştir.

Hem asidik hem de bazik olmak üzere iki tip FGF tanımlanmıştır. Bazik FGF'ün damarlanmayı uyarıcı özelliği yaklaşık 10 kat fazladır. Endotelial hücreler FGF'yi hem sentezler hem de ona yanıt verirler. Her iki tip FGF de endotel proliferasyonu ve motiliteyi arttırarak neovaskülarizasyonu hızlandırır.

PDGF; lokal olarak üretilen ve lokal olarak etki gösteren bir growth faktördür. Trombositlerin alfa granülleri içinde bulunur. 32000 dalton ağırlığında bir glikoprotein olan PDGF, 2 disülfid bağıyla bağlanmış bölümden oluşur. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF benzeri büyüme faktörleri salgırlar. Trombositlerin içinde depolanırlar (31,38–43).

PDGF yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Trombositlerde ve yara iyileşmesinin erken evresinde oluşan sıvının içerisinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. PDGF fibroblastları, osteoblastları ve kondrositleri içeren mezenkimal orijinli hücreler için potent bir mitojenik ve kemotaktik faktördür ve böylece doku rejenerasyonunu ve onarımını arttırma yeteneğinde olduğuna inanılmaktadır. PDGF reseptörleri kondrositleri içeren bir takım hücre tipleri üzerinde tanımlanmıştır ve reseptörlerin sayısı IL–I gibi inflamatuvar sitokinlerin varlığıyla düzenlenmektedir (31,38–43).

PDGF, kollajen, hyalüran ve fibronektin sentezini uyarır; ayrıca kollajenaz aktivitesini arttırır (31,38–43).

PDGF ve yara iyileşmesinde aktif olan diğer büyüme faktörlerinin rolüne ait indirekt kanıtlar, mikrofraktürle tedavi edilen kırıldak defektlerine verilen iyileşme cevabında görülebilir. Bu prosüdür kondral lezyonun içinde ve etrafında artroskopik delici ile subkondral kemik içinde mikroperferasyonlar oluşturmayı içerir. Kemiğin mekanik bütünlüğü deliklerin dikkatli bir şekilde açılmasıyla sağlanır. Artroskopik delici subkondral kemiğe geçtiğinden emin olmak ve kanamayı gözleyebilmek için 2-4 mm lik derinliğe kadar ilerletilir. PDGF gibi büyüme faktörleri defekt bölgesine salınırlar, bunlar kırıldak etrafındaki hücreler üzerinde kemotaktik ve mitojenik etkiler gösterirler ve mezenkimal kök hücrelerini infiltre ederler. Bu, yeni doku formasyonu için

otolog hücrelerle oluşturulan yapı iskelesinin yerleştirilmesi ile genişletilebilen zenginleştirilmiş bir çevre sağlar (31,38–43).

Somatomedinler (insülin benzeri büyüme faktörleri); esas olarak hepatosit ve fibroblastlarca sentezlenir ve fibroblast proliferasyonunu uyarmada PDGF ile birlikte çalışır. PDGF ve FGF gibi maddeler, hücrelerin, hücre siklusuna erken girmelerini sağlayan (G0 ve G1) kompetans faktörü olarak davranırlar. İnsülin, EGF ve somatomedinler de progresyon faktörü olarak davranır ve hücre siklusunun diğer basamaklarının ilerlemesini sağlar (S1,G2, M) (31,38–43).

IL–I; ilk olarak endojen bir pirojen ve lenfosit proliferasyon uyarıcısı olarak tanımlanmıştır. . Epitel hücreleri, polimorf nüveli lökositler, monosit ve lenfositler için kemotaktik; fibroblastlar için değildir. IL–1, fibroblast proliferasyonunu, araşidonik asit metabolizmasını, kollajen sentezini, kollajenaz ve hyalüronidaz aktivitesini uyarır. Vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. İnterlökin–2 (IL–2); ise esas görevi T hücre büyüme faktörü olarak davranmaksa da, yara iyileşmesinde rol oynayabilir (31,38–43).

TGF– β ; trombositler, makrofajlar, lenfositler, kemik, böbrek gibi farklı dokulardan izole edilmiştir. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur, hasarlanan bölgeye degranülasyonla salınır. Makrofajlar tarafından kendi üretimini otokrin yolla düzenler. Ayrıca monositleri uyarak FGF, PDGF, TNF– α , IL–I gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar. Hemen hemen tüm hücrelerin TGF– β için reseptörü vardır ve en azından teorik olarak TGF– β ile uyarılabilirler (31,38–43).

Tümör nekroz faktörü–alfa (TNF– α); adını ilk olarak, in vitro tümör hücreleri için sitostatik veya sitosidal bulunduğu için almıştır. Sonraları, tümör hücrelerinin olduğu kadar, normal hücrelerin de TNF reseptörlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Fibroblastlar için mitojenik özellik taşır; kollajen ve kollajenaz biyosentezi ve PgE2 salınımını uyarır. In vitro, endotel proliferasyonunu inhibe etmesine rağmen anjiogenezi uyarıcı etkisini, ikinci bir mesajcı yoluyla yaptığı sanılmaktadır. Bir seri hücrel fonksiyonu düzenleyen değişik faktörlerin salınmasını uyarır (31,38–43).

2.7.3. TZP'deki Growth Faktörlerin Etki Mekanizmaları

Yaralanma sonrası kanama ile plazmanın o bölgeye gelmesiyle ortamdaki trombosit miktarı artar ve bu trombositlerin parçalanmasıyla alfa granüller ortaya çıkar. Bu granüllerin de lizise uğramasıyla growth faktörler ortama salınır. Bu faktörlerin

kemotaksis, hücre proliferasyonu, angiogenezis, ekstraselüler matriks şekillenmesi, remodeling üzerine olumlu etkileri mevcuttur (48).

2.7.4. Trombosit Zengin Plazmanın Avantajları

- 1- Adeziv etkisi sayesinde alıcı sahadaki greft materyalinin stabilitesini arttırması
- 2- Büyüme faktörleri sayesinde iyileşmekte olan dokuların vaskülarizasyonunun hızlandırılması
- 3- Alıcı ve verici alanda operasyon sırasında ve sonrasında kanamanın azalması
- 4- Yumuşak doku iyileşmesinin hızlandırılmasına yardımcı olması
- 5- Kemik replasman materyalleri ile kombine kullanılarak rejenerasyonun arttırılmasını sağlaması
- 6- Doku uyumlu olması
- 7- Orijinal donörden alındığında otojen materyal olduğu için immün reaksiyona sebep olmaması
- 8- Enfeksiyöz hastalıkların geçiş riskinin bulunmaması
- 9- Toksik olmaması
- 10- Operasyon sırasında veya öncesinde kısa sürede hazırlanması (49)

2.7.5. TZP' nin Kullanım Alanları

Trombositten zengin plazma günümüzde iyileşmenin olduğu her alanda kendine yer bulmuştur. Genel cerrahide kolon anastomozlarında, plastik cerrahide defekt kapamada, diş hekimliğinde çene implantlarında kullanılmaktadır (50–52). Bununla birlikte ortopedide kırıkta defektleri, osteokondritis ve osteoartrit, ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu, tendon tamiri, kronik tendinozis, diabetik yara tedavisi, spinal füzyon, kemik defekti onarımı, menisküs tamirleri, kemik uzatma ameliyatlarıyla ilgili çalışmalar yapılmıştır (53–56). Ortopedik cerrahide, özellikle spor yaralanması geçiren hastalarda; yaralanma öncesi aktivite seviyesine dönüşünde trombosit zengin plazma uygulamasının tendon, bağ, kas ve kırıkta hastalıklarında iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi olduğu düşünülmektedir.

2.7.6. TZP Tipleri

Trombosit konsantrasyonlarının kullanımı yeni ve verimliliği tartışmalıdır. Trombosit konsantrasyonlarının elde edilmesi için çeşitli teknikler mevcuttur, fakat bu ürünlerin elde edilme yöntemlerinden her biri farklı tekniklerle yapıldığı için uygulamada karışıklıklara neden olmaktadır. Bu karışıklıklardan dolayı Dohan Ehrenfest ve ark. ları farklı trombosit konsantrasyonlarını lökosit ve fibrin içeriklerinin farklılığına göre 4 grupta sınıflandırmıştır (57–59).

- 1) **Saf-TZP (P-PRP: pure platelet rich plasma):** Anuita'nın PRGF'si, Vivostat PRF, hücre ayırıcı PRP olarak sunulan teknikleri,
- 2) **L-TZP (Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma: L-PRP):** Curasan, Regen, Plateletex, SmartPreP, PCCS, Magellan ya da GPS PRP olarak ticari kullanıma sunulan teknikleri,
- 3) **Saf TZF (saf trombositten zengin fibrin: P-PRF):** Fibrinet tekniğini,
- 4) **L-TZF (lökosit ve trombositten zengin fibrin: L-PRF):** Choukroun'un PRF tekniğini kapsayan bir sınıflama yaptılar.

Bizim çalışmamızda kullanılan Hettich Rotofix 32A (Arthrex) ile Anuita'nın tariflediği teknik olan yani Saf TZP tekniğiyle tüm deney gerçekleştirildi.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma deney hayvanları etik kurulundan onay alınmasını takiben İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı ve İnönü Üniversitesi Deney Hayvanı Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜ-DEHÜM) olanakları kullanılarak yapıldı. Çalışmamızda ortalama ağırlığı 2450 gr (1950–2900 gr) olan 36 adet matür (18 haftalık) Yeni Zelanda tipi beyaz tavşan kullanıldı. Tavşanlar standart laboratuvar diyeti ve su ile beslendi.

3.1. Çalışma Grupları

Tüm tavşanların sağ diz medial femoral kondillerinin yük taşıyan bölgesinde tam kat osteokondral defekt oluşturuldu ve defekt sahasına mikrokirik uygulandı. Bundan sonra tavşanlar her grupta 9 adet olacak şekilde dört gruba ayrıldı.

Birinci gruba tam kat osteokondral defekt oluşturulup mikrokirik uygulandı (Grup A) , ikinci gruba tam kat osteokondral defekt oluşturulup mikrokirik uygulandıktan sonra hazırlanan 2 cc TZP eklem içerisine enjekte edildi (Grup B). Üçüncü gruba tam kat osteokondral defekt oluşturulup mikrokirik uygulandıktan sonra defekt proksimal tibia anteromedialinden alınan 5x5mm periost ile örtüldü. Periost kenarlardan 4.0 vicryl ile tutturuldu ve fibrin yapıştırıcı (Beriplast- p) ile su sızmaz tarzda güçlendirildi (Grup C) (60). Dördüncü gruba tam kat osteokondral defekt oluşturulup mikrokirik uygulandıktan sonra defekt Grup C deki gibi periost grefti ile

örtüldü. Periost kenarlardan 4.0 vicryl ile tutturuldu ve fibrin yapıştırıcı ile (Beriplast-p) su sızmaz tarzda güçlendirildi. Hazırlanan 2 cc TZP periost altına, defekt içerisine enjekte edildi (Grup D). Bu grupların hepsi toplam 12 hafta takip edildi.

Grup A (n=9): osteokondral defekt+mikrokırık

Grup B (n=9): osteokondral defekt+mikrokırık +eklem içi TZP

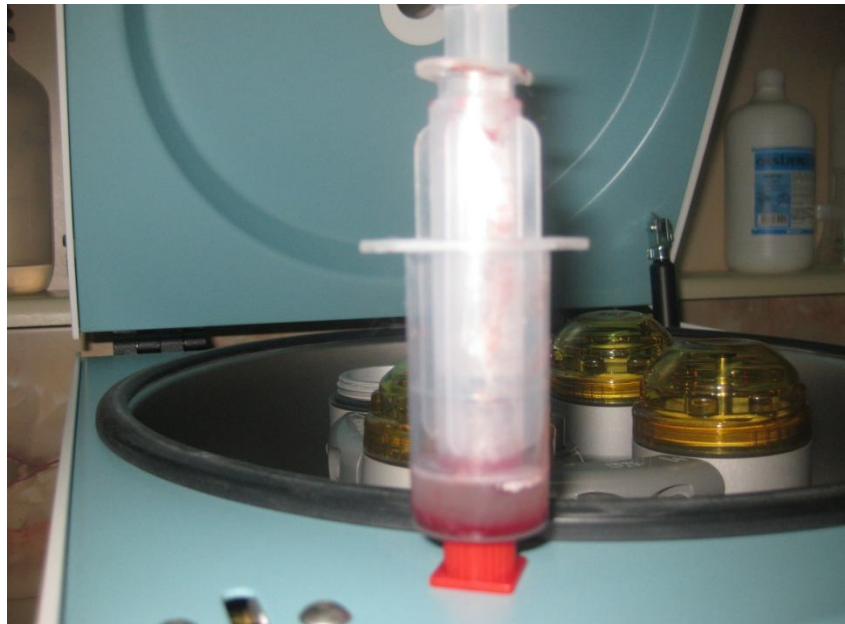
Grup C (n=9): osteokondral defekt+mikrokırık+periost

Grup D (n=9): osteokondral defekt+mikrokırık+periost +lokal TZP

3.2. Trombositten Zengin Plazma (TZP) Hazırlanması

Kan alma işlemine başlamadan önce, 1 ml ACD-A (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution, NoClot 400, Cytosol Laboratories, INC) ACP Doublesyringe system (Arthrex)'in dış şırıngasına çekildi sonrasında tavşanların kulak arkası venlerinden 9ml venöz kan daha alınarak, 1500 rpm ile 5 dakika santrifuj edildi (Hettich Rotofix 32A) ve eritrosit ve lökositten ayrıştırılarak elde edilen yaklaşık 2.5 ml plazma iç şırıngaya çekildi (Resim 1).

Üretici referansına göre ACP ile 3 kat artmış trombosit sayısı ve 2-6 kat artmış büyüme faktörleri (EGF, VEGF, TGF- β , PDGF) elde edilmektedir (61,62).



Resim 1: Santrifüj edilen otolog kandan elde edilen TZP

3.3. Cerrahi Teknik

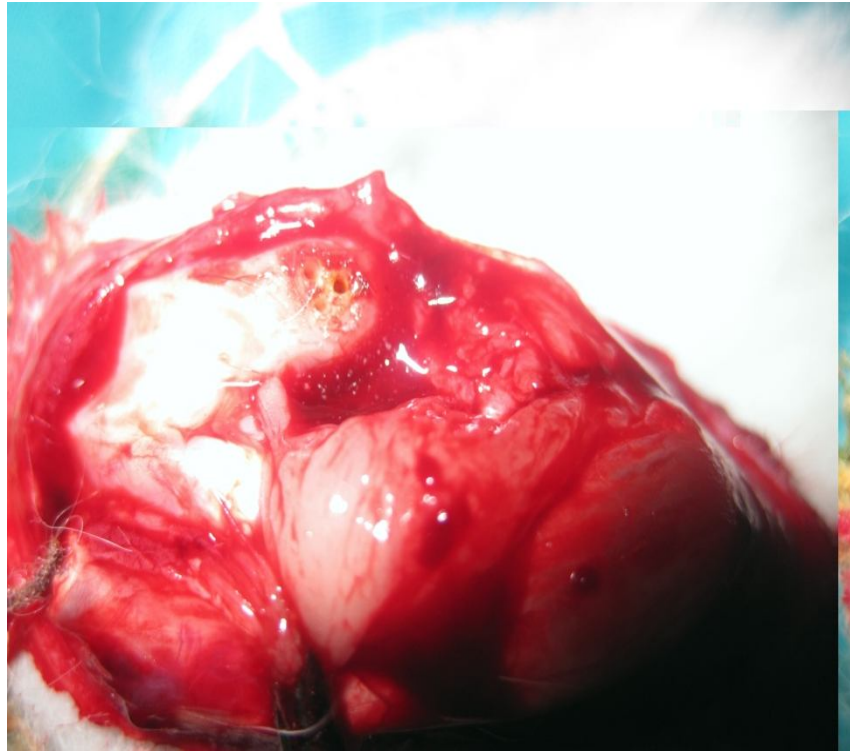
Tüm tavşanlar operasyondan 12 saat önce aç ve susuz bırakıldılar. Ameliyattan bir saat önce tüm tavşanlara profilaktik olarak 75 mg/ kg sefazolin sodyum (Sefazol®–Mustafa Nevzat İlaç sanayi) i.m. yolla verildi. Ameliyatlarda anestezi yöntemi olarak tavşanlarda enjeksiyon anestezi uygulandı. Bu amaçla sedasyon için Xylazine hidroklorid 10 mg/kg (Rompun % 2 Bayer), anestezi amacıyla Ketamin hidroklorür (Ketalar®–Parke & Davis) 50 mg/kg dozunda i.m. olarak uygulandı. Daha sonra operasyon için tavşanların sağ dizi traş edildi. Bütün tavşanlar operasyon masasına almayı takiben, sağ diz bölgesi povidone–iodine (Betadine®) solüsyonu ile boyandı. Ameliyat sahası açıkta kalacak şekilde steril örtülerle örtüldü. Sağ diz bölgesinde 3 cm.lik orta hat longitudinal insizyonla cilt, cilt altı faysa geçildikten sonra, parapatellar medial artrotomi ile patella laterale disloke edilerek diz eklemine ulaşıldı (Resim 2). Medial femoral kondilin yük taşıyan bölgesinde, 2.7 mm.lik matkap ucu ve el perforatörü (Aesculap®) kullanılarak, Hui ve ark.nın tarif ettiği yöntemle 3 mm. çapında, 6 mm. derinliğinde tam kat osteokondral defekt oluşturuldu (17).

Defektte meydana gelen kanama ve oluşan mikro debrisler serum fizyolojik ile yıkanarak uzaklaştırıldı. A grubundaki tavşanlarda oluşturulan defektin ortasından Mithoefer ve ark. nın tarif ettiği yöntemle 0.8 mm. Kirshner teli ile subkondral kemiğe kadar uzanan 3 mm. derinliğinde ve birbirinden en az 2 mm. uzaklıkta üç kez delinerek mikrokırık oluşturuldu (63) (Resim 3). Grup B deki tavşanlarda Grup A daki gibi aynı şekilde osteokondral defekt oluşturuldu ve mikrokırık uygulandı. Daha sonra hazırlanan TZP eklem içerisine enjekte edildi. C grubundaki tavşanlarda Grup A daki gibi aynı şekilde defekt oluşturulup mikrokırık uygulandı. Daha sonra tibia anteromedialinden alınan 5x5 mm periost defektin üzerine dikilerek defekt kapatıldı ve fibrin glue (Beriplast–p) ile periostun defektin kenarından su sızmaz tarzda kapalı olması sağlandı (Resim 4 ve 5) (60). Grup D deki tavşanlara Grup C deki işlemler uygulandı (osteokondral defekt + mikrokırık + periost). Daha sonra hazırlanan aynı miktar TZP periost altından defekt içerisine uygulandı (Resim 6).

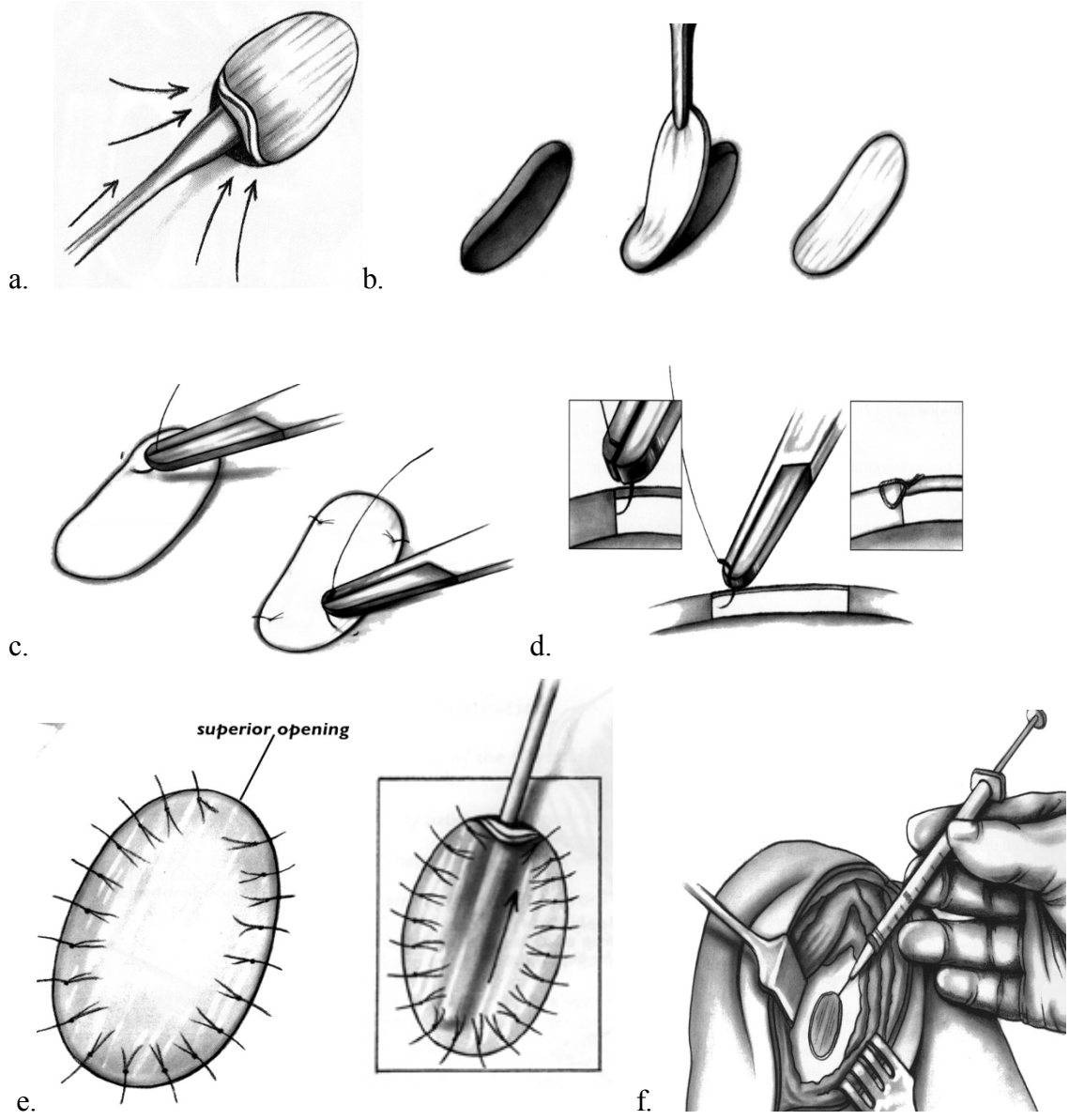
Tüm gruplarda işlemler tamamlandıktan sonra patella redükte edildi. Eklem kapsülü 4/0 keskin iğneli vicryl ile suture edildi. Cilt 3/0 keskin iğneli ipek ile usulüne uygun kapatıldı. Ameliyat bölgesi tekrar Betadine® ile silindi.



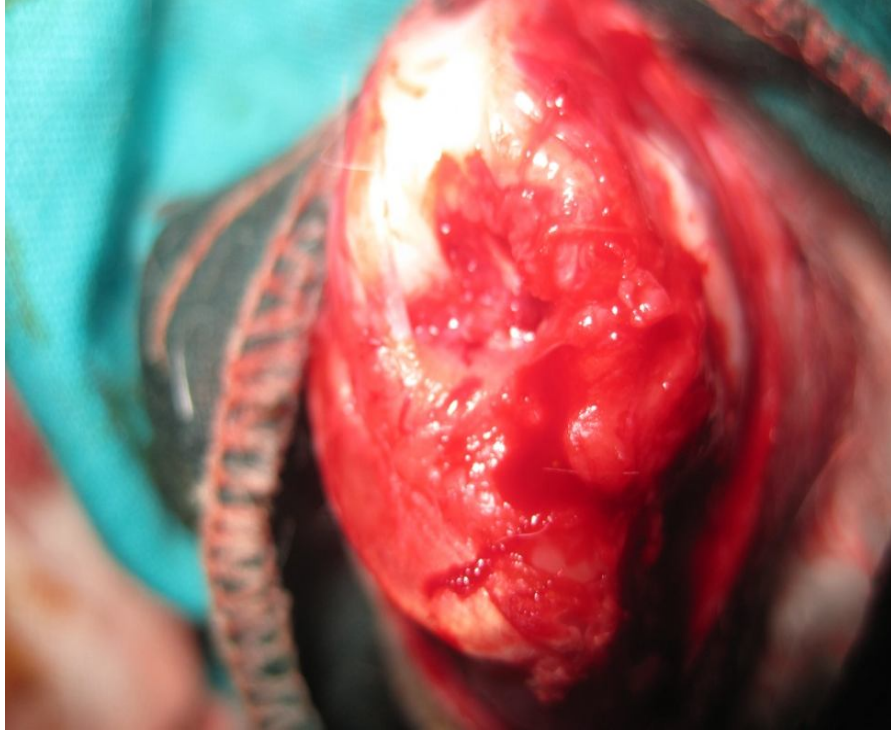
Resim 2: Cerrahi teknik diz ekleminin makroskopik görüntüsü



Resim 3: Cerrahi teknik diz ekleminin makroskopik görüntüsü, defekt ve mikrokırık oluşturulması



Resim 4: Periostun alınması ve defekte tespitinin şematik görünümü



Resim 5: Periostun sütürasyonu ve fibrin glue uygulanması sonrası görüntüsü



Resim 6: Defekt içerisinde periostun üst kutpundan TZP uygulanması

Tavşanlar anestezi etkisinden kurtulup uyanana dek diğer tavşanlardan izole edildi. Daha sonra normal günlük aktivitelerini yapacak şekilde atel uygulamadan kafeslerine alındı. Tavşanlara herhangi bir hareket kısıtlaması uygulanmadı. Ameliyat sonrası ilk üç günde, günde iki doz olacak şekilde 75 mg/kg sefazolin sodyum (Sefazol®) profilaksi amaçlı i.m. olarak yapıldı. Cerrahi sonrası ilk 10 günlük dönemde, A grubundan iki, B grubundan iki, C grubundan bir ve D grubundan iki tavşan gastroenterit ve enfeksiyon nedeniyle kaybedildi. Tüm gruplara ait hayvanlar 12. haftanın sonunda % 7.5'lük potasyum klorür (KCl-Biosel) enjekte edilerek sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası sağ dize aynı insizyonla girilerek femoral kondiller açığa çıkarıldı. Daha sonra elektrikli testere yardımıyla diz eklemi suprakondiler bölgeden osteotomize edildi ve oluşturulan defektlerin fotoğrafı çekilip, makroskopik skorlaması yapıldı. Daha sonra histopatolojik inceleme yapılmak üzere % 10'luk tamponlanmış formalin solüsyonuna alındı, oda sıcaklığında 48 saat bekletildi.

4. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında % 10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edilen kemik dokular çeşme suyunda yıkandıktan sonra % 5'lik nitrik asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Eklem yüzeyindeki lezyonlu alanlar örneklenerek rutin doku takip işlemi uygulandı. Parafine gömülen kemik dokulardan elde edilen 5µ kalınlığındaki kesitler hematoksilin–eozin (H&E) boyandı ve ışık mikroskopunda iki patolog tarafından kör değerlendirildi.

Mikroskopik olarak; eklem yüzeyini döşeyen hyalen kıkırdak ve kıkırdak komşuluğundaki kemik doku incelendi. Eklem yüzeyinde düzensizlik, matriks oluşumu, hücre dağılımı, hücre canlılığı, subkondral kemik ve kalsifiye kıkırdak değerlendirildi.

Histolojik değerlendirme, H&E ile boyanan kesitlerde onarıma ait değişiklikleri gözlemlemek için " International Cartilage Repair Society (ICRS) histolojik değerlendirme skalası" kullanılarak yapıldı. Değerlendirme skalasındaki skor, "3" (normal kıkırdak) ile "0" (tamir olmamış kıkırdak) puan arasında olacak şekilde, altı kriterden oluşmaktadır (64) (Tablo III).

Tablo 3: International Cartilage Repair Society (ICRS) histolojik değerlendirme skalası
(64)

Özellik	Skor
Yüzey pürüzsüz, devamlı kesintili, irregüler	3 0
Matriks hyalen miks: hyalen/fibrokartilaj fibrokartilaj fibröz doku	3 2 1 0
Hücre dağılımı kolumnar miks: kolumnar/ kluster kluster dezorganize	3 2 1 0
Hücre canlılığı çoğunlukla canlılık kısmi canlılık <% 10 canlılık	3 1 0
Subkondral kemik normal artmış remodeling kemik nekrozu/granulasyon dokusu ayrışma/kırılma/baziste kallus	3 2 1 0
Kalsifiye kıkırdak normal anormal/uygunsuz lokalizasyon	3 0

1.kriter; **yüzey**: Düz, kaygan bir yüzey normal eklemin temel özelliğidir.

2.kriter; **matriks**: Hyalen kıkırdığın yapısındaki kollojen ve proteoglikanların yapılanması ile eklem yüzünün viskoelastisite özelliğini sağlar.

3.kriter; **hücre dağılımı**: Kıkırdak tabakasının orta ve alt zonunda kolumnar hücre dizilimi görülmesi normal maturasyonu gösterirken, bu dizilimin bozulması ise anormal maturasyonu gösterir.

4.kriter; **hücre canlılığı**: Matriks turnover'ı için gereklidir.

5.kriter; **subkondral kemik**: Eklemin geometrisini ve yüklenme paternini belirler.

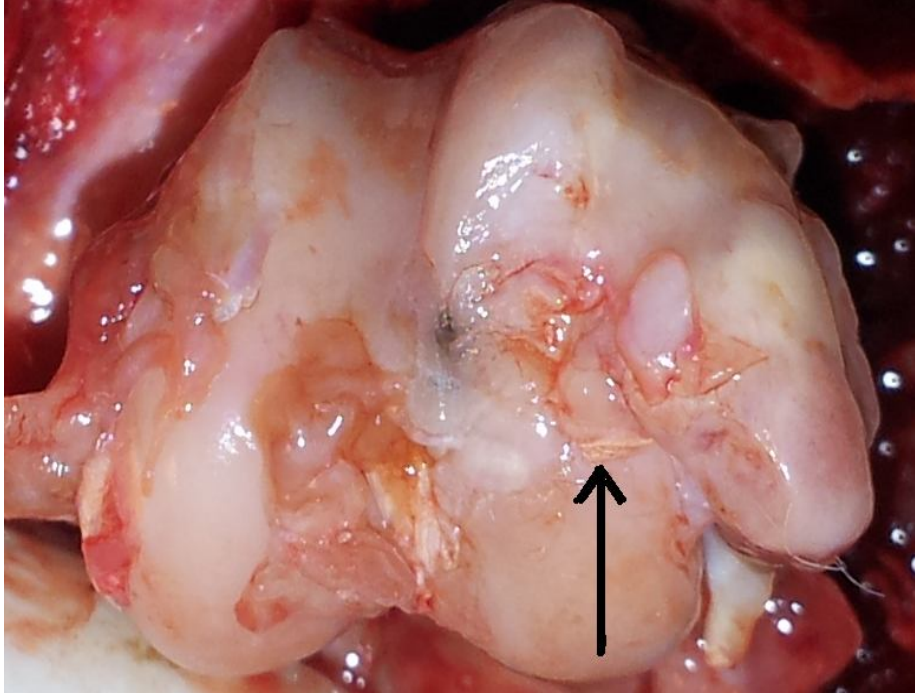
6.kriter; **kalsifiye kıkırdak**: Kıkırdak tabakasında mineralizasyon olması patolojik bir fenomen olup, fonksiyonel bir yetersizliğin göstergesidir.

5. BULGULAR

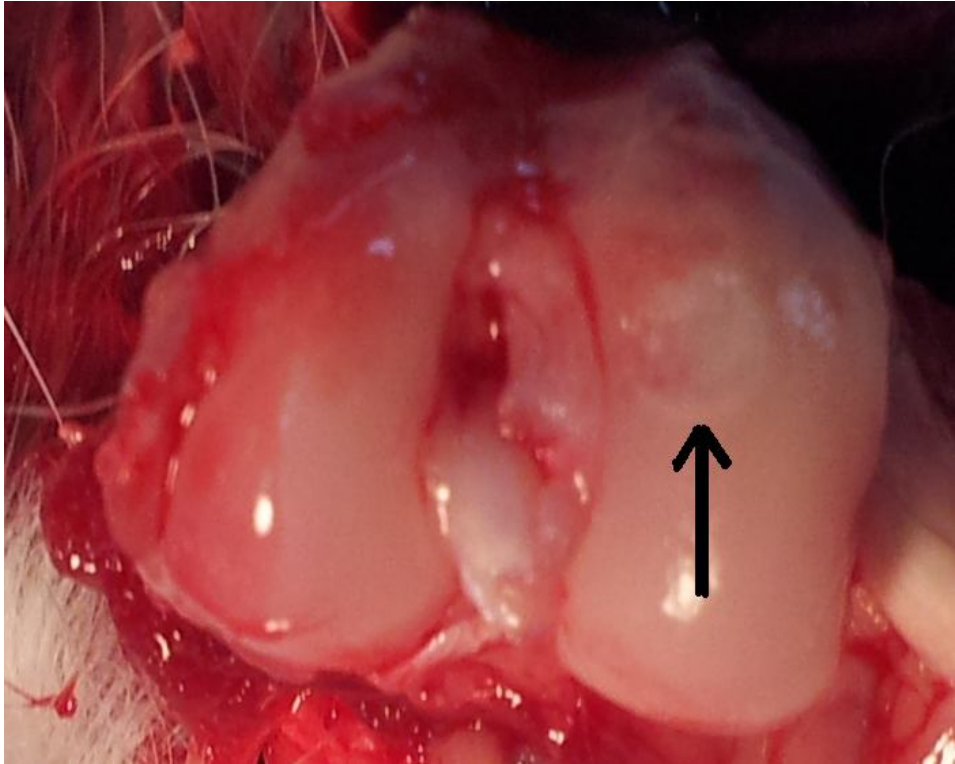
5.1. Makroskopik Bulgular

Dokular histolojik inceleme için fikse edilmeden önce her defekt gros olarak incelendi ve defektin son hali fotoğraflandı. Tamir dokusunun bitişindeki normal kıkırdaktan farkı değerlendirildi. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında 12. hafta sonunda (A) ve (C) grupları kendi aralarında, (D) ve (B) grupları da kendi aralarında benzer makroskopik özellikler gösterirlerken, (D) ve (B) grupları, (A) ve (C) gruplarından daha iyi makroskopik iyileşme göstermekteydiler. Onikinci haftada hem (D) hem de (B) grubundaki tamir kıkırdağının rengi ve yapısı bitişindeki normal kıkırdağa çok benziyordu. Defektlerde düzenli doku ile iyi bir devamlılık vardı ve hemen hemen tümüyle hyalen kıkırdak alanları ile doluydu. (A) ve (C) grubunda ise defektin rengi morumsu beyazdı ve çoğu defekte yüzey düzensizliği devam ediyordu. (D) ve (B) gruplarında defektteki onarım dokusunun yüzeyi (A) ve (C) grubundaki defekte göre daha düz ve düzenliydi.

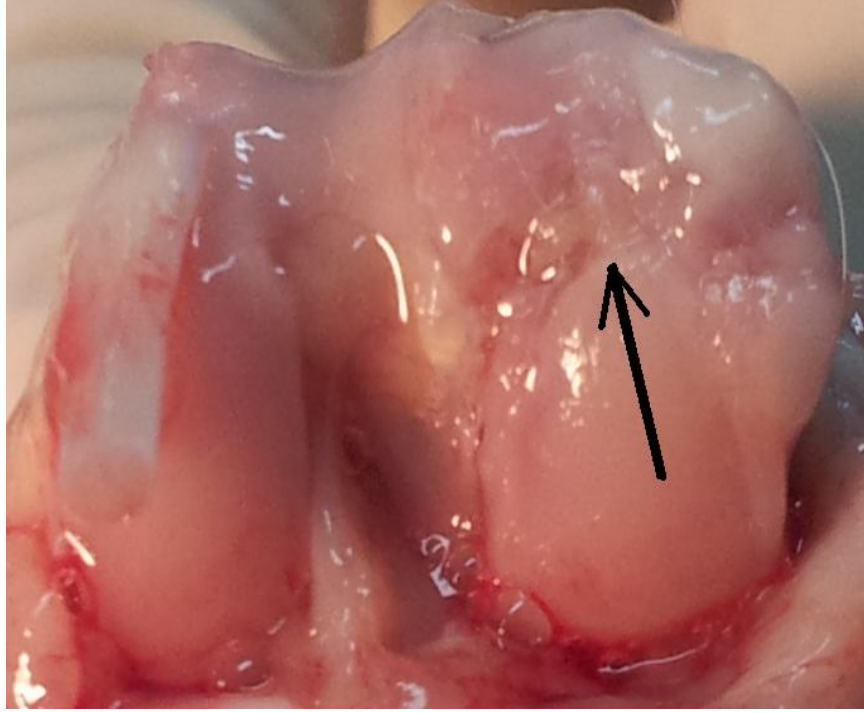
Tüm bu bulgular ışığında, makroskopik iyileşmede her dört grubun kıkırdağı gözlemlenmiş oldu ve TZP uygulanan (D) ve (B) gruplarında, (A) ve (C) gruplarına göre iyileşme yönünden daha iyi sonuçlar gözlemlendi.



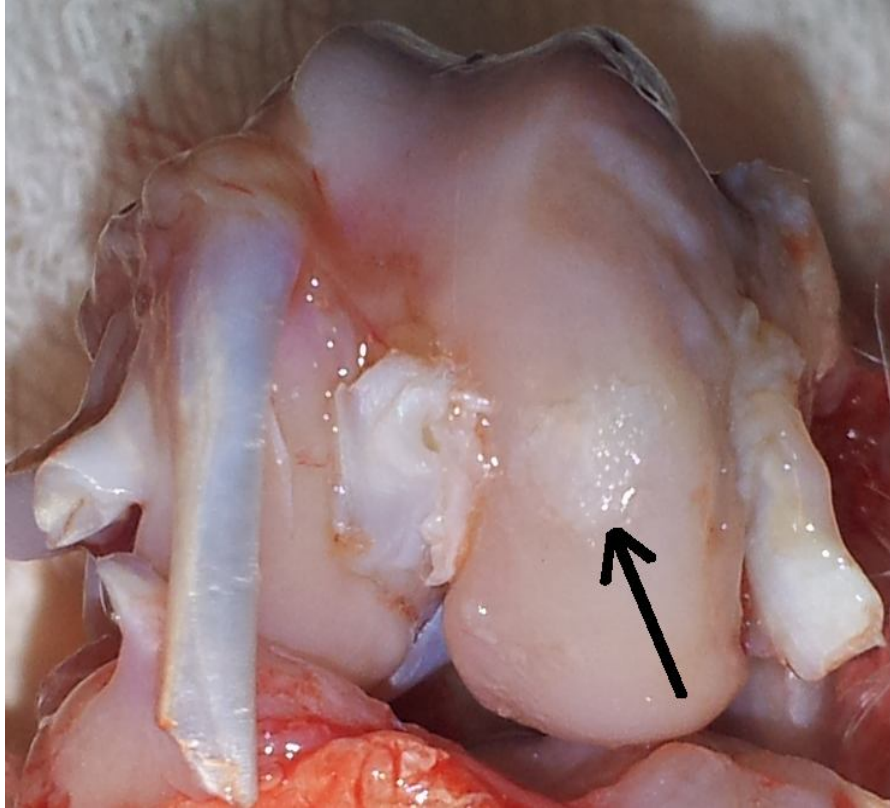
Resim 7: (A) grubunun defekt alanının 12.hafta makroskopik görüntüsü (ok)



Resim 8: (B) grubunun defekt alanının 12.hafta makroskopik görüntüsü (ok)



Resim 9: (C) grubunun defekt alanının 12.hafta makroskopik görüntüsü (ok)



Resim 10: (D) grubunun defekt alanının 12.hafta makroskopik görüntüsü (ok)

5.2. İstatistiksel Analiz

Gruplar arası histopatolojik farklılıkları incelemek için araştırma verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS for Windows version 13.0 ve Medcalc version 12.3.0 istatistiksel yazılım programları kullanıldı. Ölçülebilir değişkenlere ilişkin tanımlayıcı ölçütler ortanca (Min–Max) olarak sunuldu. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal–Wallis varyans analiz ve Conover Post–hoc testi kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.3. Mikroskopik Bulgular

Histolojik değerlendirme, H&E ile boyanan kesitlerde International Cartilage Repair Society (ICRS) histolojik değerlendirme skalası kullanılarak yapıldı. Bu skala kullanılarak tamir sırasındaki değişiklikler incelendi. Değerlendirme için defekt ortasından alınan bir kesit kullanıldı (64).

Yüzey; kıkırdak yüzeyi yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu saptandı ($p=0.0027$). Farklılığı yaratan gruplar incelendiğinde (A) grubu ile (B) grubu arasında, (A) grubu ile (D) grubu arasında ve (D) grubu ile (C) grubu arasında farklılık bulunurken ($p < 0.05$), diğer gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo IV). (A) grubunda olguların tamamında (C) grubunda ise 5 olguda (% 62.5) defektin kenarında sağlam eklem kıkırdağının kesintiye uğradığı görüldü ve defekt alanının yüzeyinde çukurluk vardı. Bu iki grup arasında anlamlı farklılık yoktu ($p > 0,05$).

(B) grubunda 3 olguda (% 42.8) defektin kenarında sağlam eklem kıkırdağının kesintiye uğradığı görüldü ve defekt alanının yüzeyinde çukurluk vardı. (D) grubunda ise olguların tümünde defektin kenarında sağlam eklem kıkırdağının kesintiye uğramadığı ve defekt alanının yüzeyinde çukurluk olmadığı görüldü. Bu iki grup arasında anlamlı farklılık yoktu ($p > 0,05$).

(B) ve (D) grubundaki kıkırdak yüzey iyileşmesi, (A) grubu ve (C) grubundaki olguların kıkırdak yüzey iyileşmelerinden daha iyi sonuçlanmıştır ($p < 0,05$).

(B) ile (D) grupları arasında ve (A) ile (C) grupları arasında kıkırdak yüzey iyileşme kriteri açısından anlamlı istatistiksel fark olmamasına rağmen (D) grubu (B) grubundan ve (C) grubu (A) grubundan daha iyi kıkırdak yüzey iyileşmesiyle sonuçlanmıştır.

Matriks; matriks yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu saptandı ($p=0.0011$). (A) grubunda 2 olguda (% 28,5) fibrokartilaj, 5 olguda (% 71,4) miks;hyalen/fibrokartilaj dokudan oluşuyordu. (C) grubunda ise 5 olguda (% 62,5) miks; hyalen/fibrokartilaj, 3 olguda da (% 37,5) fibrokartilajdan oluşuyordu. (B) grubunda ise 5 olguda (% 71,4) miks; hyalen/fibrokartilaj, 2 olguda (% 28,5) hyalen kıkırdak oluşuyordu. (D) grubunda ise 1 olguda (% 14,3) miks; hyalen/fibrokartilaj, 6 olguda (% 85,7) hyalen kıkırdak oluşuyordu. Farklılığı yaratan gruplar incelendiğinde (A) grubu ile (C) grubu arasında ayrıca (A) grubu ile (B) grubu arasında farklılık bulunmazken ($p>0.05$), kalan diğer gruplar arasında istatistiksel farklılık bulundu ($p<0.05$) (Tablo IV).

Hücre dağılımı; hücre dağılımı yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu saptandı ($p=0.0008$). (A) grubunda 6 olguda (% 85,7) miks; kolumnar/cluster, 1 olguda (% 14,3) cluster hücreler şeklindeydi. (C) grubunda ise 8 olguda (% 100) miks; kolumnar/cluster hücreler şeklindeydi. (B) grubunda ise 3 olguda (% 42,9) miks; kolumnar/cluster, 4 olguda (% 57,1) kolumnar hücreler şeklindeydi. (D) grubunda ise 1 olguda (% 14,3) miks; kolumnar/cluster, 6 olguda (% 85,7) kolumnar hücreler şeklindeydi. Farklılığı yaratan gruplar incelendiğinde (A) grubu ile (C) grubu arasında ayrıca (D) grubu ile (B) grubu arasında farklılık bulunmazken ($p>0.05$), kalan diğer gruplar arasında istatistiksel farklılık bulundu ($p<0.05$) (Tablo IV).

Hücrelerin canlılığı; hücre canlılığı yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu saptandı ($p=0.0018$). (A) grubunda 5 olguda (% 71,5) kısmi hücre canlılığı, 2 olguda (% 28,5) <10 hücre canlılığı şeklindeydi. (C) grubunda 4 olguda (% 50) kısmi hücre canlılığı, 2 olguda (% 25) <10 hücre canlılığı, 2 olguda (% 25) çoğunlukla hücre canlılığı şeklindeydi. (B) grubunda 3 olguda (% 42,8) kısmi hücre canlılığı, 4 olguda (% 57,2) çoğunlukla hücre canlılığı şeklindeydi. (D) grubunda 7 olguda (% 100) çoğunlukla hücre canlılığı şeklindeydi. Farklılığı yaratan gruplar incelendiğinde (A) grubu ile (B) grubu arasında yine (A) grubu ile (D) grubu arasında ayrıca (C) grubu ile (D) grubu arasında farklılık bulunurken ($p<0.05$), diğer gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo IV).

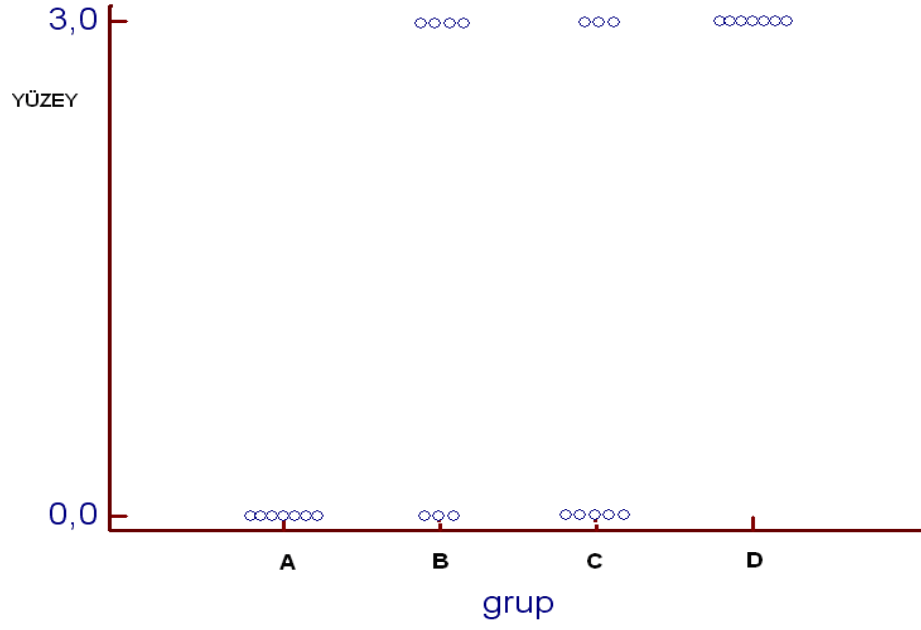
Subkondral kemik; subkondral kemik yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu saptandı ($p=0.0002$). (A) grubunda 3 olguda (% 42,9) artmış remodelling, 4 olguda (% 57,1) kemik nekrozu ve granülasyon dokusu görüldü. (C) grubunda ise 5 olguda (% 62,5) artmış remodelling ve 3 olguda (% 37,5) kemik nekrozu

ve granülasyon dokusu görüldü. (B) grubunda ise 5 olguda (% 28,5) artmış remodelling ve 2 olguda (% 71,4) normal subkondral doku görüldü. (D) grubunda ise 7 olguda (% 100) normal subkondral doku görüldü. Farklılığı yaratan gruplar incelendiğinde (A) grubu ile (C) grubu arasında farklılık bulunmazken ($p>0.05$), kalan tüm gruplar arasında istatistiksel farklılık bulundu ($p<0.05$) (Tablo IV).

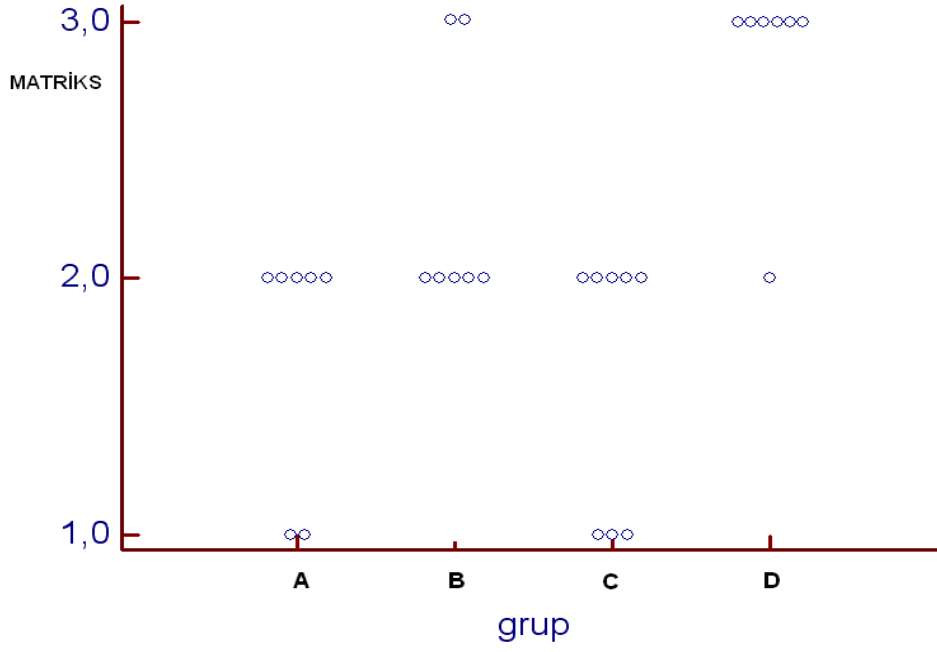
Kalsifiye kıkırdak; kalsifiye kıkırdak yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu saptandı ($p=0.0272$). (A) grubunda 5 olguda (% 71,4) anormal/uygunsuz lokalizasyon, 2 olguda (% 28,6) normal kalsifiye kıkırdak dokusu görüldü. (C) grubunda 5 olguda (% 62,5) anormal/uygunsuz lokalizasyon, 3 olguda (% 37,5) normal kalsifiye kıkırdak dokusu görüldü. (B) grubunda 2 olguda (% 28,6) anormal/uygunsuz lokalizasyon, 5 olguda (% 71,4) normal kalsifiye kıkırdak dokusu görüldü. (D) grubunda 7 olguda (% 100) normal kalsifiye kıkırdak dokusu görüldü. Farklılığı yaratan gruplar incelendiğinde (A) grubu ile (D) grubu arasında ayrıca (C) grubu ile (D) grubu arasında farklılık bulunurken ($p<0.05$), diğer gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo IV).

Tablo 4: Çalışmadaki dört grubun istatistiksel olarak karşılaştırılması

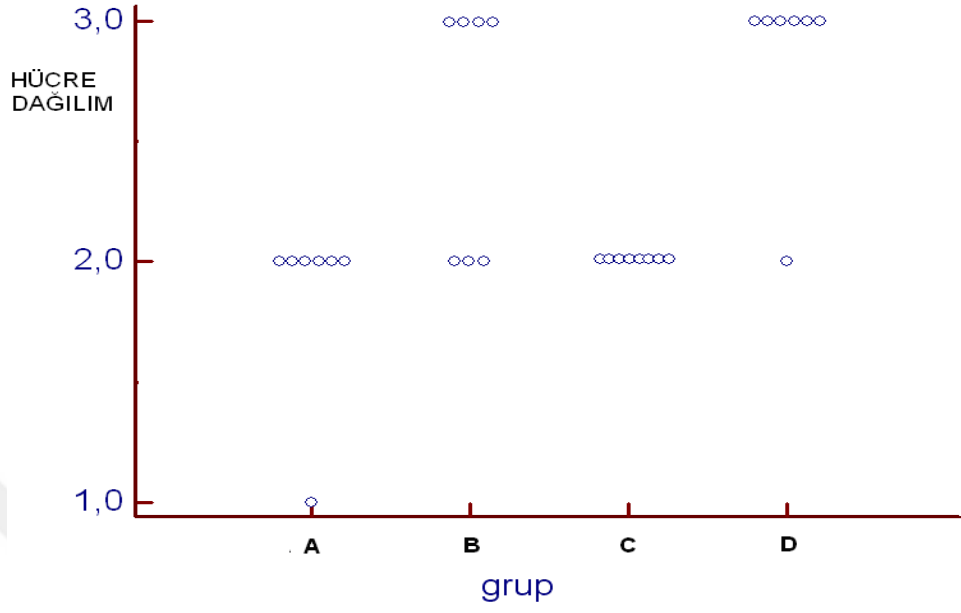
Grup	Yüzey Ortanca (min-maks)	Matriks Ortanca (min-maks)	Hücre dağılımı Ortanca (min-maks)	Hücre canlılık Ortanca (min-maks)	Subkondral kemik Ortanca (min-maks)	Kalsifiye kıkırdak Ortanca (min-maks)
A(n=7)	0 (0-0)	2.0 (1-2)	2.0 (1-2)	1.0 (0-1)	1.0 (1-2)	0 (0-3)
B(n=7)	3.0 (0-3)	2.0 (2-3)	3.0 (2-3)	3.0 (1-3)	2.0 (2-3)	3.0 (3-3)
C(n=8)	0 (0-3)	2.0 (1-2)	2.0 (2-2)	1.0 (0-3)	2.0 (1-2)	0 (0-3)
D(n=7)	3.0 (3-3)	3.0 (2-3)	3.0 (2-3)	3.0 (3-3)	3.0 (3-3)	3.0 (3-3)
P	0,0027	0,0011	0,0008	0,0002	0,0018	0,0272



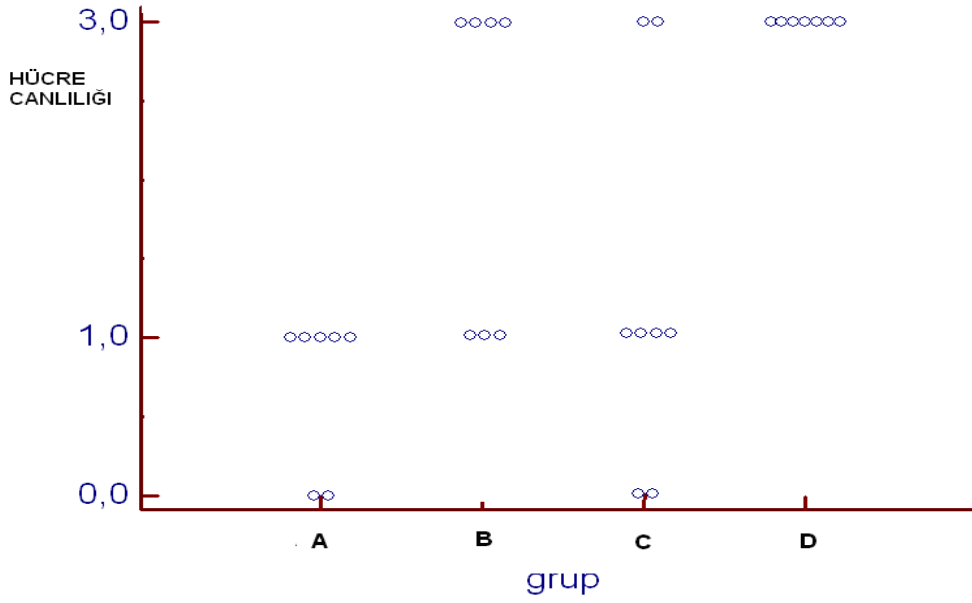
Resim 11: Tüm grupların 12. hafta yüzey skorlamaları



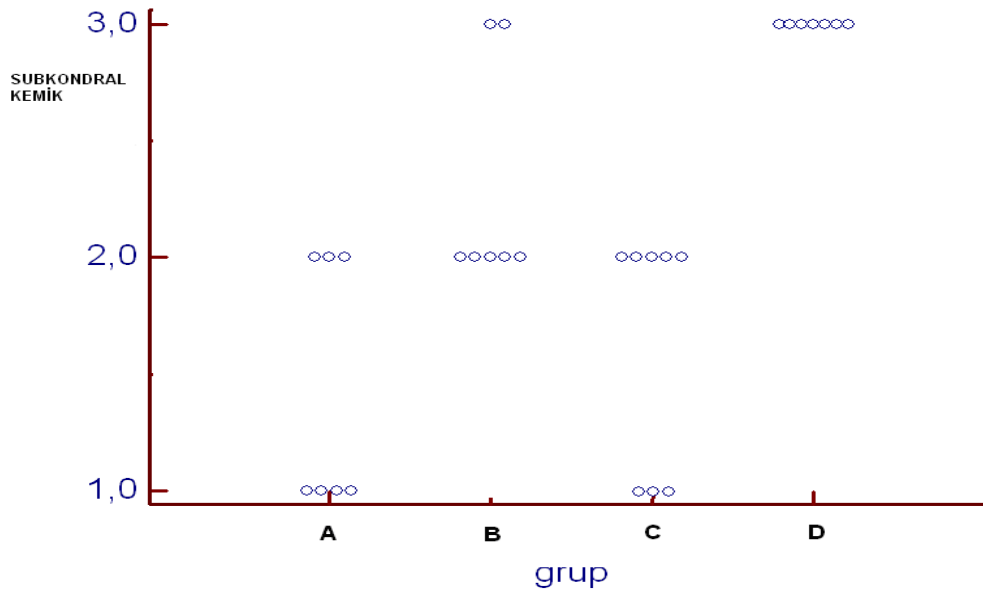
Resim 12: Tüm grupların 12. hafta matriks skorlamaları



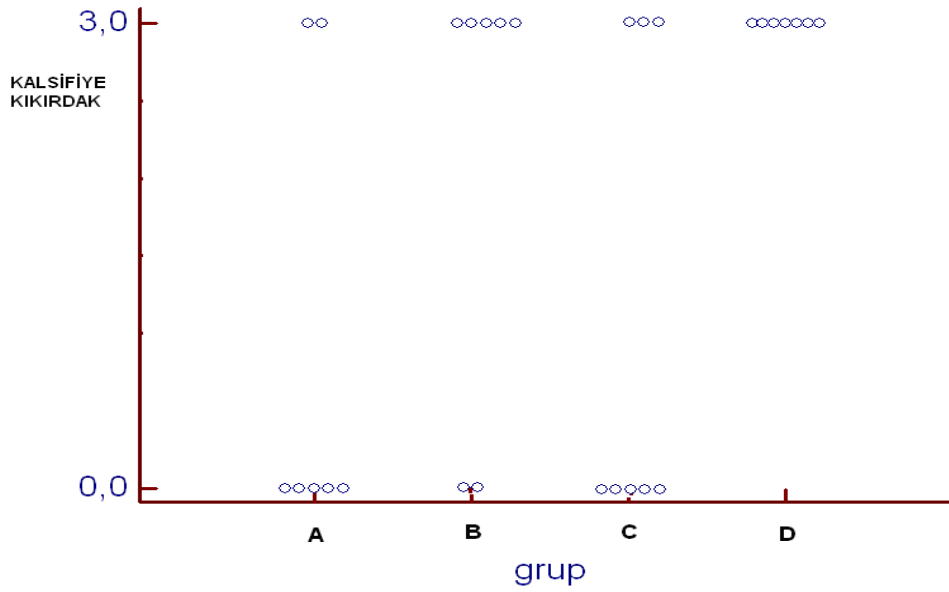
Resim 13: Tüm grupların 12. hafta hücre dağılım skorlamaları



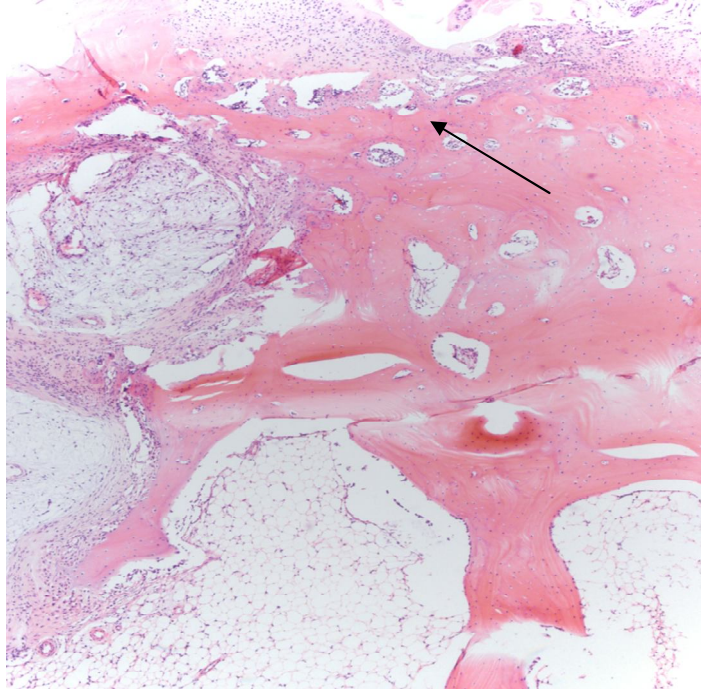
Resim 14: Tüm grupların 12. hafta hücre canlılık skorlamaları



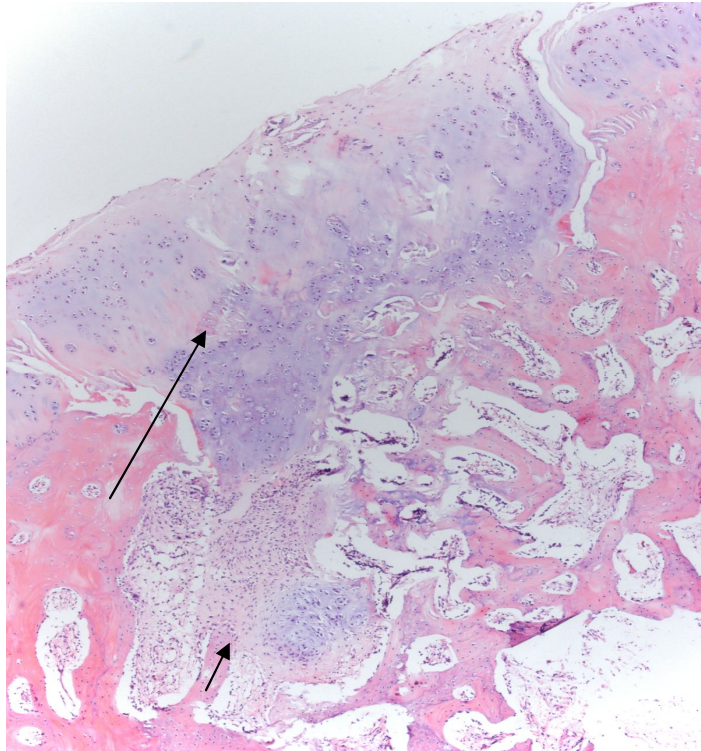
Resim 15: Tüm grupların 12. hafta subkondral kemik skorlamaları



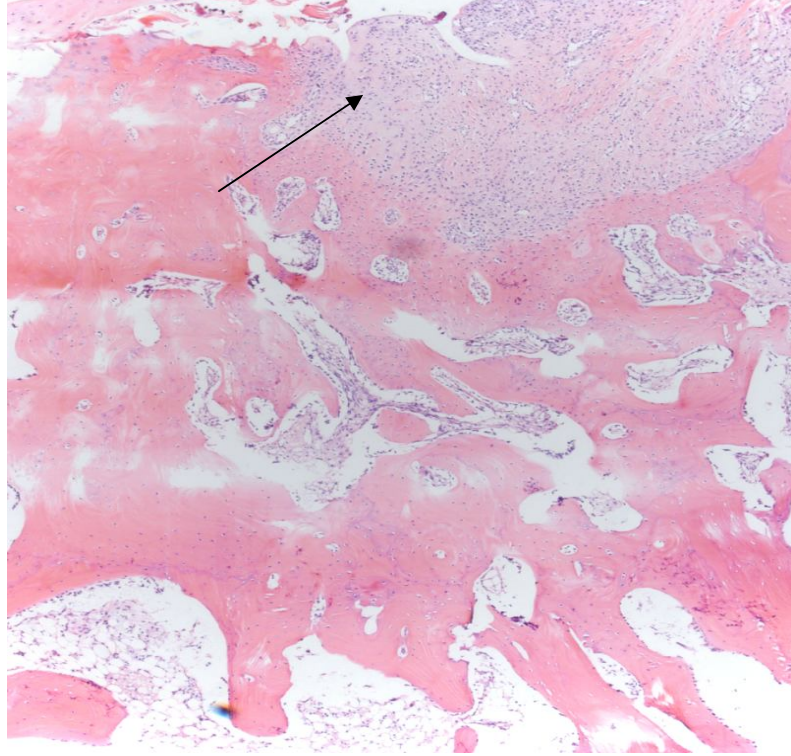
Resim 16: Tüm grupların 12. hafta kalsifiye kıkırdak skorlamaları



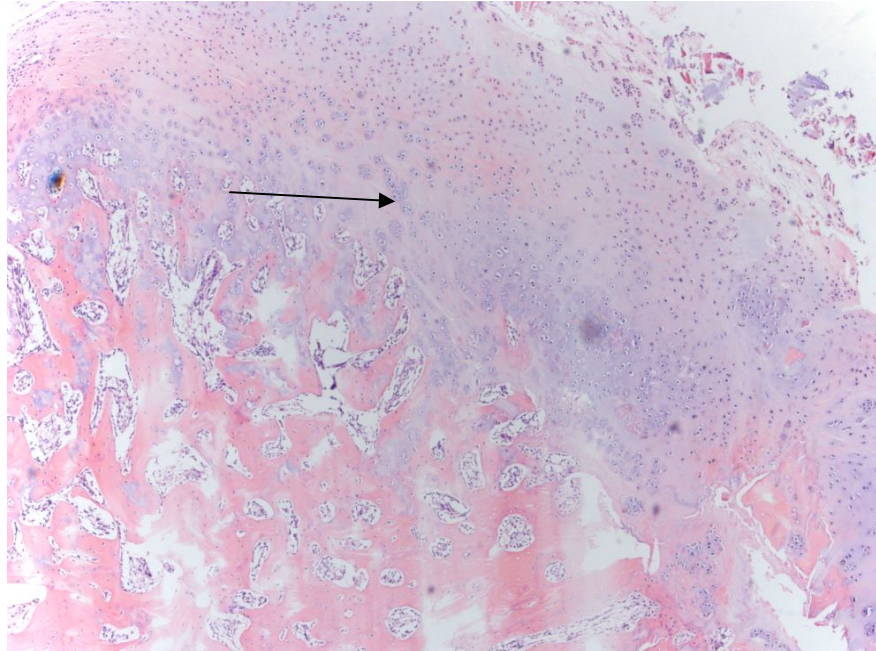
Resim 17: A grubu H&E boyama ile mikroskopik görüntüsü (Ok: Parçalanmış kıkırdak alanı ve bağ dokusu ile iyileşme)



Resim 18: B grubu H&E boyama ile mikroskopik görüntüsü (kıkırdak ve bağ dokusu ile iyileşme alanı: uzun ok: reperatif kıkırdak oluşumu, kısa ok: bağ dokusu ve inflamasyon)



Resim 19: C grubu H&E boyama ile mikroskopik görüntüsü (ok: Bağ dokusu ile iyileşme alanı oluşumu)



Resim 20: D grubu H&E boyama ile mikroskopik görüntüsü (ok: Yüzeyde devamlılık gösteren, canlı kondrositleri içeren yeni (reperatif) kıkırdak ile iyileşme oluşumu)

1. Her dört grup değerlendirildiğinde, A ve C grubu ile B ve D grubu kendi aralarında benzer sonuçlar elde edildi.
2. A grubunda tüm kriterlerde B ve D grubuna göre düşük sonuç elde edilirken, C grubuna göre benzer sonuç elde edildi.
3. B grubunda tüm kriterlerde A ve C grubuna göre yüksek sonuç elde edilirken, D grubuna göre benzer sonuç elde edildi.
4. A grubunda tüm kriterlerde C grubuna göre benzer sonuç elde edilmesine rağmen tüm gruplar içerisinde en kötü iyileşmenin A grubunda olduğu görüldü.
5. D grubunda tüm kriterlerde B grubuna göre benzer sonuç elde edilmesine rağmen tüm gruplar içerisinde en iyi iyileşmenin D grubunda olduğu görüldü.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Eklem kıkırdağı deforme edici kuvvetlere karşı direnç gösteren ve eklemlerimizdeki kemik yüzeylerini kaplayan, tam kat hasarında kendi kendini onarma kapasitesi oldukça sınırlı olan bir dokudur. İyileşmesindeki temel sorun, orijinal eklem kıkırdağı dokusuna uygun, dayanıklı bir kıkırdak elde edilmesinde karşılaşılan ciddi güçlüklerdir. İyileşme, hyalen kıkırdak yerine fibröz kıkırdak ile olmakta ve bu tamir dokusu hyalen kıkırdağa göre biyomekanik olarak daha az dirençli ve çok kısa ömürlü olmaktadır (3).

Eklem kıkırdağına bakış zamanla oldukça değişmiş ve statik değil, daha dinamik bir doku olarak ele alınmaya başlanmıştır (7). Eklem kıkırdağının biyoloji, patofizyoloji ve biyomekaniği konusundaki bilgilerimiz özellikle son yıllarda oldukça artmıştır (8).

Eklem kıkırdağında oluşan akut travmatik yaralanmalar daha çok genç hastalarda özellikle de spor yaralanmaları sonrasında görülmektedir (10). Bu yaralanmalar; kıkırdakta sınırlı kalan yüzeysel yaralanmalar ve subkondral kemiğe penetre olan yani osteokondral yaralanmalar olarak iki gruba ayrılabilir. Kıkırdakta sınırlı kalan yaralanmalarda; kondrositler çoğalıp toplansalar ve yeni matriks oluşturmaya başlasalar bile defekti onarmada yetersiz kalırlar (1,2,9). Subkondral kemiğe penetre olan yaralanmalar ise; hyalen kıkırdak benzeri fibrokartilaj (HKBF)

onarım dokusunun oluşması ile iyileşir. Bu onarım dokusu histolojik olarak hyalen kırıkdağa benzese bile, bir süre sonra bu dokuda genellikle dejeneratif değişiklikler oluşmaktadır (12).

Hayvan deneylerinde kırıkdağın iyileşmesi genellikle makroskopik, histolojik ve mekanik olarak değerlendirilir. Histolojik değerlendirmede en önemli parametrelerden biri; defektin ekstrasellüler matriks ile dolmasıdır. Osteokondral defektlerin değerlendirilmesinde birinci strateji; kırıkdağın restorasyonunun derecesi, boyutu, integrasyonu, yüzeyin düzgünlüğü ve matriks morfolojisine göre tanımlanmasıdır. Mekanik değerlendirme ise yeni kırıkdağın normal kırıkdağa göre elastisitesi ve permeabilitesi kıyaslanarak yapılır (65). Çalışmamızda histolojik değerlendirme ICRS Visüel Değerlendirme Skalasına göre yapılmış olmasına rağmen mekanik olarak değerlendirilememesi literatüre göre bir eksikliklerdir.

Kanlanma ve iyileşme potansiyeli iyi olmayan bu dokunun onarımına yardımcı yöntemler, klinik ve deneysel olarak birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bunlardan; eklem debridmanı, otojen periost greftleri ile onarım, otolog kondrosit transplantasyonu, mikrokirik oluşturulması, sitokinlerin etkilerinin azaltılması, osteokondral otogreft-allogreftler, demineralize kemik matriksi ve büyüme faktörleri uygulamaları gibi yöntemler birçok çalışmada araştırılmıştır. Fakat bu yöntemlerin hiçbirisi hyalen kırıkdağın rejenerasyonunu sağlayamamıştır (14-20).

Osteokondral onarımın sağlanmasında, defektin durumu dışında yüksek tedavi maliyetleri de önemli etkidir. Graft materyallerinin maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle araştırmacılar farklı çalışmalara yönelmişlerdir. Bu amaçla, sadece hastanın kanı alınarak, otolog yolla elde edilen trombosit zengin plazma (TZP) konusunda çalışmalar hızla sürmektedir.

Kırıkdağın tamirlerinin araştırılmasında tavşan, keçi, köpek, at, koyun gibi hayvan modelleri kullanılır. Kırıkdağın kalınlığı ve kondrosit miktarı bu hayvanlarda daha fazladır. Hayvanların yaşı da kırıkdağın iyileşmesini etkiler. Genç hayvanlarda kırıkdağın iyileşmesi daha hızlı ve daha fazladır (66,67). Çalışmamızda deney hayvanı olarak ortalama 18 haftalık olan Yeni Zelanda tipi beyaz tavşanları kullandık.

Eklem kırıkta defektlerine yönelik denenecek bir tedavi yönteminin öncelikle; çeşitliliği az olduğundan, kolay üretilip bakılabildiğinden ve diz eklemi de morfolojik olarak insan dizine benzediğinden; küçük bir hayvan modeli olan tavşanda denenmesi önerilmektedir (68,69).

Biz bu çalışmada, tam kat osteokondral defektlerin onarımında hasarlı kondrositlerde potent bir mitojenik ve kemotaktik faktör olduğu bilinen, birçok çalışmada osteoindüktif etkisi olduğu savunulan, TZP'nin kırıkta onarımı sürecine lokal etkilerini deneysel olarak araştırmayı amaçladık.

Dolaşımda bulunan trombositlerin α granüllerinde VEGF, FGF, TGF- β , PDGF gibi pek çok büyüme faktörü depolanmış durumdadır. Bu bilgiye dayanarak, büyüme faktörlerinin, direkt kişinin kendi kanından hazırlanması amaçlanmıştır. Farklı tekniklerle plazmadaki trombosit sayısı 2-8 katına kadar konsantre edilebilir (70-74).

Teorik olarak çok şey vaat eden TZP, ticari firmaların geliştirdiği cihazlar sayesinde daha kolay ve ucuz elde edilebilir hale gelmiştir. Bu hızlı gelişme, beklentinin yüksek olması, uygulamanın kolaylığı, otolog hazırlanması ve otolog olmayan kan ürünlerinin yan etkilerini taşımaması nedeniyle ürünün klinik uygulamalara hızla girmesini sağlamıştır.

Deneysel çalışmaları tamamlanmadan kullanıma giren TZP ile yapılan klinik çalışmalarda genelde kontrol gruplarının yetersiz olması, deneysel çalışmalara olan gereksinimi arttırmıştır.

Yapılan sınırlı çalışmalarda, TZP invitro ortamda fetal osteoblast benzeri hücrelerin fonksiyonelliğini ve rejenerasyonunu artırıp, mezenkimal kök hücrelerin ortama göçünü sağlamaktadır (75). Kawase ve Okuda'nın 2003 yılında TZP'nin periodontal ligamentte kollajen sentezini ve in vitro osteoblastik aktiviteyi arttırdığını göstermelerinden sonra Huang ve arkadaşları gingival çekilmelerde koronal ilerletme flebine TZP uygulaması yapmışlar fakat istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme artışı saptayamamışlardır (76-78). Marx tek başına kemik grefti uygulaması ile kemik grefti + TZP uygulamasını karşılaştırdığında ikili uygulamada kemik dansitesinde, kemik biçimlenmesinin hız ve derecesinde daha çok artış saptamış ve bunun PDGF ve TGF- β sayesinde olduğunu belirtmiştir (73). Kemikleşmeye ve yara iyileşmesine katkıları nedeniyle lumbar spinal füzyon hastalarında otogreft ve hidroksiapatitle birlikte

kullanılmış ve başarılı sonuçlar yanında olumsuz sonuçlar da rapor edilmiştir (72,79). A.C.Kuo ve ark. ları tarafından yapılan bir çalışmada; mikrofraktür uygulamanın kırıkta onarımı ve doku yüzey düzgünlüğünü artırdığı görülmüş, bizim yaptığımız çalışmada ise defektin kenarında sağlam eklem kırıktağının kesintiye uğradığı ve defekt alanının yüzeyinde çukurluk olduğu görüldü. Yine bu çalışmada yapılan mikrokirik ile BMP-7 kombinasyonu sadece mikrokirik uygulanan tedaviye göre iyileşme dokusunun kalitesini ve miktarını arttırmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak (D) ve (B) grubunun sonuçları sadece mikrokirik uygulanan (A) grubuna göre daha iyi iyileşme göstermiştir (80).

Aspenberg, sıçan aşil tendonunda yaptığı çalışmada da TZP uygulanan tendon defektinin tendon kopma kuvvetinde ve tendon kallusunda artış saptamıştır (81). TZP'nin ligamanlar üzerinde de benzer etkileri saptanmış ve artroskopik cerrahide kullanımı önerilmiştir (82).

Bizim çalışmamızın zayıf noktalarından biri tek bir zaman diliminde çalışmaktı (12 hafta); hayvan sayısı artırılarak farklı zaman dilimlerini içeren gruplar oluşturulması çalışmamızı daha güçlü kılabilirdi.

TZP'de trombosit konsantrasyonu yüksek, fibrinojen konsantrasyonu ise azdır. TZP'nin fibrinojen içeriği az olduğu için çok katılaşma oluşmamakta; bu nedenle yara iyileşmesini engellememekte, hatta içindeki büyüme faktörleri sayesinde iyileşmeyi hızlandırdığı düşünülmüştür (70,83,84).

Trombositten zengin plazma ile yapılan çalışmaların bir kısmı, bu ürünün osteoindüktif etkisi olduğunu savunurken, bazı çalışmalarda da klinik yararı olmadığı öne sürülmektedir (85,86).

Bu tez çalışmasında, TZP'nin osteokondral defektlerin iyileşmesine katkılarının deneysel olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla dizde osteokondral defekt ve mikrokirik oluşturulan tavşanlarda TZP uygulamasının kırıkta iyileşmesine olan etkisi araştırılmıştır.

Grup A osteokondral defekte mikrokirik uygulanan grup olarak planlanmıştır. Grup B osteokondral defekte mikrokirik yapıldıktan sonra TZP'nin uygulandığı ve TZP'nin iyileşmeye olan etkilerinin görülmesinin amaçlandığı grup olarak planlanmıştır. Grup C osteokondral defekte mikrokirik yapıldıktan sonra defektin üzerinin periost ile kapatıldığı grup olarak planlanmıştır. Grup D osteokondral defekte

mikrokırık yapıldıktan sonra periost ile kapatıldığı ve periostun altına defekt içerisine TZP uygulamasının iyileşmeye etkilerinin görülmesinin amaçlandığı grup olarak planlanmıştır.

Değerlendirmede cerrahi işlem sonrası hareketleri serbest bırakılan tavşanların 12. haftada sakrifiye edilerek eklemleri makroskopik olarak gözlemlendi ve histolojik olarak 12.hafta sonunda gruplar arasında eklem yüzeyini döşeyen hyalen kıkırdak ve kıkırdak komşuluğundaki kemik doku incelendi. Eklem yüzeyinde düzensizlik, matriks oluşumu, hücre dağılımı, hücre canlılığı, subkondral kemik ve kalsifiye kıkırdak değerlendirildi ve sonuçların istatistikî dökümanları tamamlandı.

Normal eklem kıkırdağında beklendiği gibi, pürüzsüz, parlak, yarı saydam bir doku görülmektedir. İşlemden 12. hafta sonra, (A) grubunda yeni oluşan kıkırdak dokusu ince, düzensiz, mat ve kemik temas bölgelerinde kaba görünüm mevcuttu. TZP grubunda ise yarı saydam ve pürüzsüz dokular görülebilmektedir.

Kıkırdak yüzeyi açısından yorumlandığında;

Grup (A) ile grup (B) arasında istatistiksel farklılığın olması TZP'nin içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin sadece mikrokırık uygulanan olgulara göre kıkırdak yüzey devamlılığını ve pürüzsüz yüzey iyileşmesini arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır.

Grup (A) ile grup (D) arasındaki istatistiksel farklılığın olması TZP'nin içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin ve TZP'yi daha uzun süre defekt içerisinde tutmak ve büyüme faktörlerinin etki süresini uzatmak için defektin periost ile kapatılmasının sadece mikrokırık uygulanan olgulara göre kıkırdak yüzey devamlılığını ve pürüzsüz yüzey iyileşmesini arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır.

Grup (C) ile grup (D) arasında istatistiksel farklılığın olması ise her iki grupta büyüme faktörlerinin etki süresini uzatacak olan periost uygulamasına rağmen (D) grubunda ayrıca TZP uygulanması ile daha fazla miktarda büyüme faktörünün etkisi ile kıkırdak yüzey devamlılığının ve pürüzsüz yüzey iyileşmesinin arttırıldığı şeklinde yorumlanmıştır.

Kıkırdak matriks açısından yorumlandığında;

Grup (D) ile grup (A, B, C) arasında istatistiksel farklılığın olması (D) grubunda (B) grubundan farklı olarak TZP'yi daha uzun süre defekt içerisinde tutmak ve büyüme faktörlerinin etki süresini uzatmak için defektin periost ile kapatılması, (C) grubundan farklı olarak ilave TZP uygulanması ile daha fazla miktarda büyüme faktörünün etkisi ve (A) grubundan farklı olarak TZP uygulaması ile beraber defektin periost ile kapatılmasının hyalen kıkırdak ile iyileşmeyi sağladığı şeklinde yorumlanmıştır.

Grup (B) ile grup (C) arasında istatistiksel farklılığın olması (B) grubuna uygulanan TZP'nin içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin etkisinin (C) grubuna uygulanan defektin periost ile kapatılmasıyla elde edilen iyileşme etkisinden daha yüksek kıkırdak matriks iyileşme skorları ile sonuçlandığı, bunun sebebinin ise mikrokırık bölgesinden defekt içine sızan mezenkimal hücrelerin yeterli konsantrasyona ulaşamadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Hücre dağılımı açısından yorumlandığında;

Grup (A) ile grup (B) ve grup (D) arasında istatistiksel farklılığın olması (B) grubuna uygulanan TZP'nin içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin etkisi ile (A) grubunda görülen miks: kolumnar/ kluster hücre dağılım hakimiyeti, (B) grubunda kolumnar hücre hakimiyetine bırakmakta ve hücre dağılımına olumlu yönde etki etmektedir. TZP'yi daha uzun süre defekt içerisinde tutmak ve büyüme faktörlerinin etki süresini uzatmak için defektin periost ile kapatıldığı (D) grubunda ise (A) ve (B) grubundan daha çok kolumnar hücre artışı olduğu ve hücre dağılımı açısından (D) grubunda en iyi iyileşmenin olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Grup (C) ile grup (D) arasında istatistiksel farklılığın olması ise her iki grupta periost uygulanmasına rağmen (D) grubunda ilave olarak TZP uygulanması ile daha fazla miktarda ve daha uzun süre defekt içerisinde kalan büyüme faktörünün etkisi ile daha çok kolumnar hücre artışı olduğu ve hücre dağılımı açısından (D) grubunda (C) grubundan daha iyi iyileşmenin olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Hücrelerin canlılığı açısından yorumlandığında;

Grup (A) ile grup (B) ve grup (D) arasında istatistiksel farklılığın olması (B) grubuna uygulanan TZP'nin içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin etkisi ile (A) grubuna göre, (B) grubunda çoğunlukla canlılığı olan hücre hakimiyeti sağlanarak,

hücre canlılığının artırıldığı şeklinde yorumlanmaktadır. (D) grubunda ise TZP'yi daha uzun süre defekt içerisinde tutmak ve büyüme faktörlerinin etki süresini uzatmak için defektin periost ile kapatılmasına bağlı olarak (A) ve (B) grubuna göre hücre canlılığı açısından en yüksek sonuçların elde edildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Grup (C) ile grup (D) arasında istatistiksel farklılığın olması ise her iki grupta periost uygulanmasına rağmen (D) grubunda ilave olarak TZP uygulanması ile daha fazla miktarda büyüme faktörünün daha uzun süre defekt içerisinde kalmasına bağlanmış ve (D) grubunda (C) grubuna göre daha fazla hücre canlılığı elde edildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Subkondral kemik açısından yorumlandığında;

Grup (D) ile grup (A, B, C) arasında istatistiksel farklılığın olması (D) grubunda (B) grubundan farklı olarak TZP'yi daha uzun süre defekt içerisinde tutmak ve büyüme faktörlerinin etki süresini uzatmak için defektin periost ile kapatılması, (C) grubundan farklı olarak ilave TZP uygulanması ile daha fazla miktarda büyüme faktörünün etkisi ve (A) grubundan farklı olarak TZP uygulaması ile beraber periost ile defektin kapatılması ile normal subkondral kemik oluşumunu arttırdığı şeklinde yorumlanmaktadır.

Grup (B) ile grup (C) arasında istatistiksel farklılığın olması; (B) grubuna uygulanan TZP'nin içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin etkisinin (C) grubuna uygulanan defektin periost ile kapatılmasıyla elde edilen iyileşme etkisinden daha iyi subkondral kemik iyileşmesiyle sonuçlandığı, bunun sebebinin ise mikrokırık bölgesinden defekt içine sızan mezenkimal hücrelerin yeterli konsantrasyona ulaşamadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Kalsifiye kırık açısından yorumlandığında;

Grup (A) ile grup (D) arasında istatistiksel farklılığın olması ise (D) grubunda (A) grubundan farklı olarak periost altına defekt içerisine TZP uygulanması ile daha fazla miktarda büyüme faktörünün daha uzun süre defekt içerisinde kalması sağlanmış ve bu sebeple (D) grubunda normal kalsifiye kırık elde edildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Grup (C) ile grup (D) arasında istatistiksel farklılığın olması ise her iki grupta periost uygulanmasına rağmen (D) grubunda farklı olarak TZP uygulanması ile daha

fazla miktarda büyüme faktörü daha uzun süre defekt içerisinde kalabilmiş ve bu sebeple (D) grubunda (C) grubuna göre normal kalsifiye kırıkta elde edildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Oniki haftanın kırıkta iyileşmesinin tamamlanmasında sınır olan bir süre olduğu düşünülerek çalışmamıza 12. haftada son verildi. Nitekim bu sürede hyalen veya hyalen benzeri kırıkta oluşumunu gördük.

Bizim çalışmamızda makroskobik olarak D ve B grubundaki defektlerin onarım dokusunun yüzeyi A ve C grubundaki defektlere göre daha düz ve düzenliydi.

Onikinci hafta sonunda yapılan ölçümler sonucunda TZP uygulanan grupların (D, B) arasında istatistiksel fark saptanmasa da, tüm gruplar içinde (D) grubunda en iyi iyileşme bulguları saptanırken, yine tüm gruplar içinde en yavaş iyileşme ise (A) grubunda izlendi.

Bu çalışma TZP'nin kırıkta iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu yönünde güçlü ipuçları vermektedir. TZP içindeki trombosit konsantrasyonu ve büyüme hormonu miktarı ile TZP'yi daha uzun süre defektin içerisinde tutabilen periostun uygulanması önemli bir faktördür.

Biz çalışmamızda plazmadaki trombosit oranını 3 kat arttırabildik. TZP lehine olan iyileşme ileri çalışmalarda TZP'deki trombosit konsantrasyonu arttırılarak daha güçlü hale getirilebilir.

Histolojik verileri toplu olarak yorumladığımızda, (A) ve (C) grubunda kırıkta iyileşmenin TZP uygulanan gruplara (D ve B) göre daha yavaş olduğu söylenebilir. Ayrıca grup (D) ile (B) arasında iyileşme açısından anlamlı fark izlenmese de (D) grubundaki iyileşme, (B) grubuna göre daha üstündü. Bu sonuçta TZP'nin tek başına kullanımıyla elde edilen iyileşmeye olan etkinin periostun su sızmaz tarzda kapatılması ile büyüme faktörlerinin daha uzun süre etki gösterebileceği sonucu elde edildi.

Bu deneysel çalışmanın sonucunda TZP uygulamasının dizde oluşturulan osteokondral hasarın tedavisi için olumlu sonuçları elde edilmiştir.

7. ÖZET

Amaç: Eklem kıkırdagının tam kat hasarında iyileşme, hyalen kıkırdak yerine fibröz kıkırdak ile olmakta ve bu tamir dokusu hyalen kıkırdağa göre biyomekanik olarak daha az dirençli ve çok kısa ömürlü olmaktadır. Kondrositlerde potent bir kemotaktik ve mitojenik faktör olduğu bilinen ve hastanın otolog kanından elde edilen trombositten zengin plazma (TZP) uygulamaları giderek artan sıklıkta yapılmaktadır. Biz bu çalışmada, tam kat fokal osteokondral defektlerin onarımında TZP'nin kıkırdak onarımı sürecine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada 29 adet Yeni Zelanda tipi tavşan kullanıldı. Tavşanlar 4 gruba ayrılıp, her tavşanın sağ diz medial femoral kondillerinin yük taşıyan bölgesinde tam kat osteokondral defekt oluşturuldu ve defekt sahasına mikrokirik uygulandı. Defektlere Grup A'da (n=7) ek bir işlem yapılmadı, Grup B'de (n=7) eklem içi TZP, Grup C'de (n=8) otojen periost ile kapama, Grup D'de (n=7) otojen periost ile kapama ile birlikte defektin altına TZP uygulandı. Tüm gruplara ait hayvanlar 12. haftanın sonunda sakrifiye edildi. Dizlerindeki defekt bölgesi ise; önce makroskopik olarak değerlendirildi, daha sonra da ICRS Visuel Histolojik Değerlendirme Skalası kullanılarak mikroskopik olarak incelendi.

Bulgular: Makroskopik olarak değerlendirildiğinde onikinci haftada (D) ve (B) grubundaki defektlerde düzenli doku ile iyi bir devamlılık vardı ve hemen hemen tümüyle hyalen kıkırdak alanları ile doluydu. (A) ve (C) grubunda ise çoğu defektte yüzey düzensizliği devam ediyordu. Histolojik verilerin sonuçlarına göre, TZP uygulanan gruplarda (D ve B) kıkırdak iyileşmenin (A) ve (C) gruplarına göre daha üstün olduğu görüldü. TZP uygulanan grupların (D, B) arasında ise istatistiksel fark saptanmasa da, tüm gruplar içinde (D) grubunda en iyi iyileşme bulguları saptanırken, en yavaş iyileşme ise (A) grubunda izlendi.

Sonuç: Bu deneysel çalışmanın sonucunda TZP uygulamasının dizde oluşturulan fokal osteokondral hasarın tedavisi için olumlu sonuçları elde edilmiştir. TZP içindeki trombosit konsantrasyonu ve büyüme faktörleri ile TZP'yi daha uzun süre defektin içerisinde tutabilen periostun uygulanmasının iyileşmeyi arttıran önemli bir faktör olduğunu düşünmekteyiz. TZP lehine olan iyileşme ileri çalışmalarda TZP'deki trombosit konsantrasyonu artırılarak daha güçlü hale getirilebilir.

Anahtar kelimeler: Hyalen kıkırdak, Fibröz kıkırdak, TZP, Fokal osteokondral defekt

8. ABSTRACT

Purpose: Full-thickness injury of articular cartilage improves with fibrous cartilage instead of hyaline cartilage and this repair tissue is less resistant and very short-lived according to hyaline cartilage. Platelet-rich plasma (PRP) which is obtained from patient's autologous blood is a potent chemotactic and mitogenic factor for chondrocytes and has gradually increased applications. In this study, we aimed to investigate the effects of PRP in cartilage repair process in full-thickness osteochondral defects.

Materials and Methods: In this study, 29 New Zealand white rabbits were used. Rabbits were divided into 4 groups, full-thickness osteochondral defects were created in weight bearing area of medial femoral condyle at right knee of each rabbit's and microfractures were performed in defected site. In group A (n:7) no additional procedure was applied; in group B (n:7) intraarticular PRP was applied; in group C (n:8), closing with autogenous periosteum was applied, in group D (n:7), along with closing with autogenous periosteum, PRP was applied under defected site. All rabbits were sacrificed at the end of the 12 weeks. Defected site in the knee was evaluated first macroscopically and then examined microscopically using ICRS Visual Histological Assessment Scale.

Results: At twelve week, in macroscopic evaluation; in groups B and D, there was regular tissue with good continuousness and almost filled with hyaline cartilage areas. But in group A and C, surface irregularity at most of the defects was persisting. According to the histological data; recovery in cartilage was superior in groups treated with PRP (group B and D) with respect to group A and C. Although, there was no statistically difference between PRP applied groups (group B and D), best recovery signs were determined in group D, whereas slowest recovery was observed in group A.

Conclusion: As a result of this experimental study; good results of PRP application for the treatment of focal osteochondral injury which is created on knee were obtained. We think; platelet concentration and growth factors in PRP and application of periosteum which can keep PRP for longer time in defected area are important factors in increasing recovery. In further studies, recovery in favor of PRP can be made more powerful by increasing platelet concentration in PRP.

Key words: Hyaline cartilage, Fibrous cartilage, PRP, Focal osteochondral defect

9. KAYNAKLAR

1. Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A. Articular cartilage structure, composition and function. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR (eds). Orthopaedic Basic Science. Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System 2nd Edition. American Academy of Orthopaedic Surgeons 2000; 443-470.
2. Mow VC, Proctor CS, Kelly MA: Biomechanics of articular cartilage, in Hordín M, Frankel VH eds.: Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System, ed 2
3. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. J Bone Joint Surg 1980; 62 A:79-89
4. Hunziker EB, Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. Clin Orthop 1999;367S:135-146
5. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage. A template for tissue repair. Clin Orthop 2001 ;391S:26-33
6. Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. Clin Orthop 1995; 317:3-6
7. Mainil-Varlet P. Transforming vision: What's new since 1743? J Bone Joint Surg 2003; 85A:I
8. Buckwalter JA. Integration of science into orthopaedic practice: Implications for solving the problem of articular cartilage repair. J Bone and Joint Surg 2003; 85A:1-7
9. Buckwalter JA, Mankin HJ, Articular cartilage repair and transplantation. Arthritis Rheum 1998; 41:1331-1342.
10. Buckwalter JA. Evaluating methods of restoring cartilaginous articular surfaces. Clin Orthop 1999; 367S:224-238
11. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Lotz MK. Impact of mechanical trauma on matrix and cells. Clin Orthop 2001; 391S:S90-S99
12. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. J Bone and Joint Surg 1982; 64A:460-466
13. Twyman RS, Desai K, Aichroth PM; Osteochondritis dissecans of the knee. A long term study. J Bone and Joint Surg 1991; 73B:461-464

14. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M: Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone J Surg* 1997; 79 A:1439-1451
15. Fujimoto E, Ochi M, Kato Y, Sumen Y: Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. *Arch Orthop Trauma Surg* 1999; 119:139-145
16. James E. Gilbert: Current Treatment Options for the Restoration of Articular Cartilage. *The American Journal of Knee Surgery* 1998; 11:42-46
17. Hui JHP, Chen F, Thambyah A, Lee EH. Treatment of chondral lesions in advanced osteochondritis dissecans: a comparative study of chondrocytes, mesenchymal stem cells, periosteal graft, and mosaicplasty (osteochondral autograft) in animal models. *J Pediatr Orthop* 2004; 24:427-33.
18. Mobasher A, Csaki C, Clutterbuck AL, Rahmanzadeh M, Shakibaei M. Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy. *Histol Histopathol* 2009; 24:347-66
19. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA: Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Bone Joint Surg* 2000; 82 A:151-60
20. Tuncel M, Halici M, Canoz O, Yildirim Turk C, Oner M, Ozturk F, Kabak S: Role of insulin like growth factor-I in repair response in immature cartilage. *Knee* 2005; 12:113119
21. Buckwalter JA, Lane NE: Aging, sports and osteoarthritis. *Sports Med Arthros* 1996; 4:276-287
22. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular Cartilage Part I: Tissue Design and Chondrocyte-matrix Interactions. *J Bone Joint Surg* 1997; 79-A: 600-608
23. Buckwalter JA, Mankin HJ, Articular Cartilage Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation *J Bone Joint Surg* 1997; 79 A:612- 627
24. Weiss C: Normal and osteoarthritic articular cartilage. *Orthop Clin North Am* 1979; 10:175-189

25. Buckwalter JA: Current understanding of osteoarthritis. in symposia handouts 1999, AAOS 66th Annual Meeting Proceedings 1999; 417-421
26. Mollenhauer J, Kuettner KE: Articular Cartilage. In: Dee R. ed. Principles of Orthopaedic Practice. 2nd edition. McGraw-Hill, 1997; 85-98
27. Cheung HS, Lynch KL, Johnson RP, Brewer BJ: Invitro synthesis of tissue spesific type I collagen by healing cartilage. Arthritis and rheumatism 1980; 23:211-219
28. Johansson AG.: Clinical studies on the role of GH and IGF-1 in bone metabolism. Uppsala Universty Press: Uppsala Sweden, 1995; 7-13
29. Khan SN, Bostrom MPG, Lane JM: Bone growth factors. Orthopedic Clinics of North America 2000; 31:375-387
30. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewics MJ et al. Stim-ulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. Plast Reconst Surg 1991; 88:189-196
31. Buckwalter JA. Mow VC: Cartilage Repair in Osteoarthritis. in: Moskowitz RW,Howe U DS, Goldbert VM, Mankin HJ, eds. Osreoarthritis: Diagnosis and Medical/ Surgical Management. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 1992; 71-107
32. Mankin MJ, Mow VC, Buckwalter JA: Form and Function Articular Cartilage. In:Simon SR ed. Orthopaedic Basic Science Rosemont III: American Academy of Orthopaedic Surgeons 1994; 1-44
33. Jingushi S, Izumi T, Kinoshita T, Tamura M, Iwaki A, Shida J.: A combination treatment with basic fibroblast growth factor and perichondrium autograft for a fullthickness articular cartilage defect. Orthop Res Soc 1994; 40:327-336
34. Widenfalk B, Engkvist O, Ohlsen L, Segeström K: Perichondrial arthroplasty using fibrin glue and early mobilization. Scand J Plast Reconstr Surg 1986; 20:251-258
35. Eppley, B.L., J.E. Woodell, and J. Higgins, Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. Plast Reconstr Surg 2004; 114(6): 1502-8.
36. Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH, 3rd. Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. Ann Surg 1982; 196(4): 379-88.

37. Ksander GA, Sawamura SJ, Ogawa Y, Sundsmo J, McPherson JM. The effect of platelet releasate on wound healing in animal models. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22(5 Pt 1): 781-91.
38. Laato M, Heino J, Kahari VM: Epidermal growth factor prevents methylprednisolone induced inhibition of wound healing. *J Surg Res* 1989; 17:354-359
39. Lawrence WT, Diegelmann RF: Growth factors in wound healing. *Clinics in Dermatology*, 12:157-169, 1994
40. Mooney DP, O'Reilly, Gamelli RL: Tumor necrosis factor and wound healing. *Ann Surg* 1990; 211:124-129
41. McGee GS, Davidson JM, Buckley A: Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res* 1988; 45:145-153
42. Robson MC, Phillips LG, Lawrence WT: The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores *Ann Surg* 1992; 216:401-406
43. Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW: Effects of growth factors in vivo. *Am J Pathol* 1987; 129:601-613
44. Daughaday WH, Salmon WD Jr, Hail K, Raben M: Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 1972; 235:107-108
45. Salmon WD Jr, Daughaday WH: A hormonally controlled serum factor which stimulates sulphate incorporation by cartilage. *J Lab Clin Med* 1957; 49:825-836
46. Trippel BS, Coutts DR, Einhorn AT, Mundy RG, Rosenfeld GR: Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg* 1996; 78 A:1272-1286
47. Poehlman ET, Copeland KC: Influence of physical activity on IGF-1 in healthy younger and older man. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:1468-1473
48. Garg, A.K., The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implantol Update* 2000; 11(3): 17-21.
49. Ferreira C.F., Carriel Gomes M.C., Filho J.S., Granjeiro J.M., Oliveira Simoes C.M., Magini R.S.: Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth: *Clin. Oral Impl. Res* 2005; 16: 456-460.

50. Sammartino, G., et al., Platelet-rich plasma and resorbable membrane for prevention of periodontal defects after deeply impacted lower third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67(11): 2369-73.
51. Cervelli, V., et al., Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery. *Aesthetic Plast Surg* 2009; 33(5): 716-21.
52. Yol, S., et al., Effects of platelet rich plasma on colonic anastomosis. *J Surg Res*, 2008; 146(2): 190-4.
53. Kajikawa, Y., et al., Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol* 2008; 215(3): 837-45.
54. Pietramaggiori, G., et al., Healing modulation induced by freeze-dried platelet-rich plasma and micronized allogenic dermis in a diabetic wound model. *Wound Repair Regen* 2008; 16(2): 218-25.
55. Messori, M.R., et al., Bone healing in critical-size defects treated with platelet rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res* 2008; 43(2): 217-23.
56. Kitoh, H., et al., Distraction osteogenesis of the lower extremity in patients with achondroplasia/hypochondroplasia treated with transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet-rich plasma. *J Pediatr Orthop* 2007; 27(6): 629-34.
57. Pietrzak WS, Eppley BL,. Platelet rich plasma: Biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005; 16(6): 1043-54.
58. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14(4): 529–35.
59. Whitman, D.H. et al. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg* 1997; 55: 1294–1299.
60. Yavuzer R, Sari A, Kelly CP, Tuncer S, Latifoglu O, Celebi MC, Jackson IT: Management of frontal sinus fractures. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115:79-93
61. Borzini P, Mazzucco L. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion* 2005; 45(11):1759-67

62. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002; 30(2): 97-102
63. Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, et al. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88 Suppl 1 Pt 2:294-304.
64. Varlet PM, Aigner T, Brittberg M, Ballough P, Hollander A: Histological assesment of cartilage repair. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A,supp 2 : 43-57
65. Scott A. Hacker, Healey RM, Yoshika M, Coutts RD: A methodology for the quantitative assesment of articular cartilage histomorphometry. *Osteoarthritis and Cartilage* 1997; 5: 343-355
66. Mankin HJ: Localization of triated thymidine in articular cartilage of rabbits. *J Bone Joint Surg*, 45-A:529-540,1963 Mankin HJ: Localization of triated thymidine in articular cartilage of rabbits. *J Bone Joint Surg* 1963; 45-A:529-540
67. Brainan HA, Hsu HP, Spector M: Chondral defects in animals models. Effects of selected repair procedures in canines. *Clin Ortop* 2001; 391: 219-230
68. Reinholz GG, Lu L, Saris DBF, Yaszemski MJ, O'Driscoll SW. Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 2004; 25:1511-1521.
69. Rudert M. Histological Evaluation of Osteochondral Defects: Consideration of Animal Models with Emphasis on the Rabbit, Experimental Setup, Follow-up and Applied Methods. *Cells Tissues Organs* 2002; 171:229-240
70. Altmeppen J, Hansen E, Bonnländer GL, Horch RE, Jeschke MG: Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *J Surg Res* 2004; 117: 202-207
71. Babbush CA, Kevy SV, Jacobson MS: An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent* 2003; 12: 24-34
72. Castro FP: Role of activated growth factors in lumbar spinal fusions. *J Spinal Disord Tech* 2004; 17: 380-384

73. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-646
74. Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G: The Harvest Smart PReP™ system versus the Friadent-Schütze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14:233-239
75. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T: Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 362-369
76. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol* 2003; 74(6): 858-864
77. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003; 74(6): 849-857
78. Huang LH, Neiva EF, Soehren SE, Giannobile WV, Wang HL: The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: a pilot human trial. *J Periodontol* 2005; 76: 1768-1777
79. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT: Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15
80. Kuo A.C, Rodrigo J.J, Reddi A.H, Curtiss S, Grotkopp E. and Chiu M: Microfracture and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair *OsteoArthritis and Cartilage* 2006; 14: 1126-1135
81. Aspenberg P, Virchenko O: Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 2004; 75(1): 93-99
82. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I: Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35:1648-1652
83. Matras H: Fibrin seal: the state of the art. *J Oral Maxillofac Surg* 1985; 43:605-611

84. Brissett AE, Hom DB: The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 11: 245-250
85. Siebrecht MA, De Rooij PP, Arm DM, Olsson ML, Aspenberg P: Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxy apatite. *Orthopedics* 2002; 25(2): 169-172
86. Yazawa M, Ogata H, Kimura A, Nakajima T, Mori T, Watanabe N: Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. *J Craniofac Surg* 2004; 15(3): 439-446

