



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**HYPERİCUM PERFORATUM'UN KIRIK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ:
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

Dr. Fevzi CİCİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğretim Üyesi Ferit Tufan ÖZGEZMEZ

AYDIN-2020

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**HYPERİCUM PERFORATUM'UN KIRIK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ:
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

Dr. Fevzi CİCİ
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğretim Üyesi Ferit Tufan ÖZGEZMEZ

Bu araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-20037 nolu proje olarak desteklenmiştir.

AYDIN-2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda yürütücü olan ve tez hazırlamamda büyük desteği olan hocam, Dr. Öğr. Üyesi. F. Tufan ÖZGEZMEZ'e,

Ortopedi ve Travmatoloji uzmanlık eğitimim süresince en iyi şekilde yetişebilmem için bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, her zaman ve her problemde yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Ş. Öner ŞAVK'a,

Eğitim sürem boyunca engin tecrübelerini ve bilgisini paylaştan değerli hocam Prof. Dr. Emre ÇULLU'ya,

Asistanlık süresince desteklerini esirgemeyen Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Mutlu ÇOBANOĞLU'na,

Mesleki ve kişisel gelişimime katkısı olan, hocam Dr. Öğr. Üyesi. Vahit YILDIZ'a,

Tez çalışmamdaki desteklerinden dolayı; başta Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Doç. Dr. Buket DEMİRCİ olmak üzere Patoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi

Prof. Dr. Canten TATAROĞLU'na,

Beş yıllık eğitim hayatım boyunca beraber çalışmış olduğum servis ve ameliyathane hemşireleri ve personellerine,

Laboratuvar imkânlarını ve yardımlarını esirgemeyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tüm asistanlığım boyunca manevi desteklerini esirgemeyen annem Asiye CİCİ, babam Hasan CİCİ ve kardeşlerime, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Fevzi CİCİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik Yapısı.....	3
2.1.1. Kortikal (Kompakt) Kemik	3
2.1.2. Spongioz (trabeküler) Kemik	4
2.1.3. Endosteum	4
2.1.4. Periosteum	4
2.2. Kemik Hücreleri	5
2.2.1. Osteoblastlar	5
2.2.2. Osteoklastlar	5
2.2.3. Osteositler.....	6
2.3. Osteoprogenitor Hücreler	6
2.4. Kemik Matriksi.....	6
2.5. Kemik Oluşum Tipleri.....	6
2.5.1. Enkondral Kemikleşme	6
2.5.2. İntramembranöz Kemikleşme.....	7
2.5.3. Apozisyonel Kemik Yapımı	7
2.5.4. Embriyonik Uzun Kemik Oluşumu	8
2.6. Kırık İyileşmesi	8

2.6.1. Enflamatuvar (Hematom, Yangı) Dönem (1–4 gün).....	9
2.6.2. Onarım (reperasyon) Dönemi (5- 21 gün).....	11
2.6.3. Yeniden şekillenme (remodeling) Dönemi (20–100 gün).....	13
2.7. Kırık İyileşmesinin Kontrolü.....	14
2.7.1. Prostaglandinler (PG).....	14
2.7.2. Kemik Uyarıcı Faktörler.....	15
2.7.2.1. Kemik Morfojenik Proteini (BMP)	15
2.7.2.2. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	15
2.7.2.3. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β)	15
2.7.2.4. Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü (FGF)	15
2.7.2.5. Makrofaj Kaynaklı Büyüme Faktörü (MDGF)	15
2.7.2.6. Somatomedin C	16
2.7.2.7. Plazma Fibronektini.....	16
2.7.2.8. İnterlökinler (IL).....	16
2.7.2.9. Kondroblast Kökenli Büyüme Faktörü (CDGF)	16
2.7.2.10. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	16
2.8. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler	16
2.8.1. Sistemik Faktörler	17
2.8.1.1. Yaş.....	17
2.8.1.2. Genel durum	17
2.8.1.3. Hormonlar.....	17
2.8.1.3.1. Paratiroit Hormon	17
2.8.1.3.2. Kalsitonin	17
2.8.1.3.3. İnsülin	18
2.8.1.3.4. Kortikosteroidler.....	18
2.8.1.3.5. Tiroid Hormonu.....	18

2.8.1.3.6. Büyüme Hormonu	18
2.8.1.3.7. Gonadal steroidler.....	18
2.8.1.3.8. Vitaminler.....	18
2.8.1.3.9. İlaçlar.....	19
2.8.1.3.10. Hiperbarik oksijen	19
2.8.1.3.11. Kırık bölgesi stresleri	20
2.8.1.3.12. Sigara.....	20
2.8.2. Lokal Faktörler	20
2.8.2.1. Travmaya Bağlı Nedenler.....	20
2.8.2.2. Enfeksiyon.....	21
2.8.2.3. Kırılan Kemik Türü	21
2.8.2.4. Travmanın Derecesi ve Etkisi.....	21
2.8.2.5. Kırığın Şekli	21
2.8.2.6. Tedaviye Bağlı Nedenler.....	21
2.9. Hypericum Perforatum	22
2.9.1. Hypericum perforatum ve Depresyon	24
2.9.2. Antibakteriyel ve Antiviral Özellik.....	25
2.9.3 Antikanser Özellik.....	25
2.9.4 Antioksidan ve Nöroprotektif Özellik	25
2.9.5 Anti-enflamatuar Etkinlik.....	26
3. MATERYAL VE METOD	27
3.1. Çalışma Planı ve Cerrahi Teknik.....	27
3.2. Çalışma Grupları	27
3.3. Kırık Modeli Oluşturulması	28
3.4. İlaç Uygulaması.....	32
3.5. Deneylerin Sonlandırılması	32

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi	32
3.6.1. Radyolojik İnceleme.....	32
3.6.2. Histopatolojik İnceleme.....	34
3.7. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Radyolojik Bulgular	39
4.2. Histopatolojik Bulgular	44
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ.....	49
ÖZET	50
ABSTRACT	52
KAYNAKLAR.....	54

TABLULAR DİZİNİ

Tablo I. Gruplar	28
Tablo II. Lane-Sandhu Skorlaması	33
Tablo III. Kırık iyileşmesinin histolojik değerlendirilmesinde skarlama sistemi	34
Tablo IV. Ortopedist AP Radyolojik değerlendirme.....	39
Tablo V. Ortopedist Lateral Radyolojik Değerlendirme	40
Tablo VI. 2.Ortopedist AP radyolojik değerlendirme	40
Tablo VII. Ortopedist Lateral Radyolojik Değerlendirme	41
Tablo VIII. Ortopedist AP+LATERAL değerlendirme	41
Tablo IX. 2.Ortopedist AP+LATERAL değerlendirme	42
Tablo X. 1.Ortopedist radyolojik skorları	42
Tablo XI. 2.Ortopedist radyolojik skorları	42
Tablo XII. 1.ve 2. Ortopedist AP Radyolojik değerlendirme.....	43
Tablo XIII. 1.ve2. Ortopedist Lateral Radyolojik Değerlendirme	43
Tablo XIV. 1.ve 2.ortopedist AP+LATERAL değerlendirme	44
Tablo XV. 1 ve2.ortopedist radyolojik skorlarının ortalaması	44
Tablo XVI. Histopatolojik değerlendirme	45
Tablo XVII. Tüm grupların histolojik skorları	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Uzun kemik (a) ve kortikal (b) kemiğin şematik hali. (Erişim 2019, http://faculty.seattlecentral.edu/jwhorley/Bones_241).....	4
Şekil 2. Kırık iyileşmesinin evreleri	9
Şekil 3. Enflamatuvar dönem (Jay R. Lieberman MD, Kemik onarım ve yeniden Şekillenmesi, 2007)	10
Şekil 4. Onarım dönemi (Kıkırdak kallus) (Jay R. Lieberman MD, Kemik onarım ve yeniden şekillenmesi, 2007)	11
Şekil 5. Onarım dönemi (Kemik Kallus) (Jay R. Lieberman MD, Kemik onarım ve yeniden şekillenmesi, 2007)	13
Şekil 6. Remodeling dönemi (Jay R. Lieberman MD, Kemik onarım ve yeniden Şekillenmesi, 2007)	13
Şekil 7. Hypericum perforatum, Chapter 11, Medical Attributes of St. John's Wort, (Hypericum perforatum) Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. (2011)	23
Şekil 8. Hypericin (a), hyperforin (b) kimyasal yapısı (Chapter 11, Medical Attributes of St. John's Wort (Hypericum perforatum) Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. 2011.....	24

KISALTMALAR DİZİNİ

HP	: Hypericum Perforatum
SOD	: Süperoksit Dismutaz
BMP	: Kemik Morfojenik Proteini
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
ALP	: Alkalen Fosfataz
PTH	: Paratiroit Hormon
GPX	: GlutasyonPeroksidaz
MAO-B	: Monoamin Oksidaz
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör
PRF	: Trombositten Zengin Fibrin
iNOS	: İndüklenebilirNitrik Oksit Sentaz
HE	: Hematoksilen Eozin

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Cerrahi saha temizliği.....	29
Resim 2. Cilt İnsizyonu	29
Resim 3. k teli gönderilmesi	30
Resim 4. Yaranın kapatılmış son hali.....	30
Resim 5. Fiksasyon doğrulanması 1	31
Resim 6. fiksasyon doğrulanması 2	31
Resim 7. Post operatif 28.gün örnekler	33
Resim 8. Post operatif 28.gün tüm gruplar.....	33
Resim 9. (x20, HE) Kontrol grubundan örnek, santralde nekrotik kemik doku, çevresinde yeni woven kemik ve artmış bağ doku.....	35
Resim 10. (x100, HE): Kontrol grubundan diğer bir örnek, sağda kırık doku ve yanında yeni olgunlaşmış woven kemik	35
Resim 11. (x100, HE) Düşük doz ilaç verilen gruptan örnek, ağırlıklı olarak olgunlaşmış kemik ve kırık doku.....	36
Resim 12. (x200, HE): Düşük doz ilaç verilen gruptan başka bir örnek. Sağ altta nekrotik kemik doku ve onun devamlılığında reaktif osteoblastlarla çevrili olgunlaşmamış kemik doku.....	36
Resim 13. (x100, HE): Yüksek doz ilaç verilen gruptan örnek. Santralde kırık doku ve devamlılığında endokondral ossifikasyon.	37
Resim 14. (x20, HE): Yüksek doz ilaç verilen gruptan örnek. Nekrotik kemik dokular. ...	37
Resim 15. (x100, HE): Yüksek doz ilaç verilen gruptan örnek. Yeni wovenkemik doku.	38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Amacımız; Hypericum perforatum'un, kırık iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmaktır. Bu nedenle, Hypericum perforatum'un etkisinin objektif olarak ortaya konmasında yardımcı olacağı ve kırık iyileşmesinin histolojik olarak değerlendirebilmesine olanak sağlayacağı için, çalışmamız, hayvanlar üzerinde standardize edilmiş kırık modeli üzerinde yapılmıştır.

Karmaşık biyolojik bir süreç olan kırık iyileşmesinde, kırık kemiğin onarımı kırık anında başlar. ABD'de bir yılda meydana gelen kırıkların %5-%10'unda çeşitli derecelerde iyileşme problemlerinin olduğu bildirilmiştir. Bu sorunlar konunun önemini artırmaktadır. Gecikmiş kaynama veya kaynamama; ek medikal tedavilere, ameliyatlara, iş gücü ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu sorunların nedeni genellikle bilinmemekle birlikte, beslenme, yaş, hormonal durum, yetersiz redüksiyon, eşlik eden hastalıklar, ilaçlar, enfeksiyonlar ve travmanın çeşidi, kırık iyileşmesini etkileyen faktörler olarak bildirilmiştir

Kırık iyileşmesi uygun zaman ve anatomik lokalizasyonunda kırık parçalarının dizilimini ve daha sonra uygun enzimlerin salınımını gerektiren karmaşık bir süreçtir. Kırık oluştuktan sonra enflamasyon, tamir ve remodelizasyondan oluşan bir grup olayları tetikler.

Kemiğin eski sağlam ve dayanıklı haline dönebilmesi için süreçlerin problemsiz ilerlemesi gerekmektedir. Kırık iyileşmesi süresince oluşabilecek komplikasyonların en sık görüldüğü zaman, ossifikasyonun olduğu ilk bir aydır. Bu süreçte uygulanacak olan tedavinin olumlu ya da olumsuz etkisi cerrahi işlemin başarısını büyük ölçüde etkiler.

2015 yılında Mı-kyoung You ve ark. Hypericum perforatum ile yapılan bir çalışmada Hypericum perforatumun MG-63 hücre proliferasyonunu ve ERa ve ERp ekspresyonunu arttırdığını ve ALP, OC ve OPG'nin gen ekspresyonları üzerinde pozitif etki gösterdiğini ve ayrıca trabeküler kemik kaybında yavaşlama ile ilişkili kemik üzerinde östrojen benzeri bir etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (2).

2017 yılında Damlar I. Ve ark. Tarafından kemik greft iyileşmesinde histomorfometrik bir çalışma yaparak hypericum perforatum'un pozitif yönde etkili olduğu gösterilmiştir (3).

Yara iyileşmesi açısından rat korneası üzerinde alkali yanıklarla ilgili yapılan bir çalışmada Hypericum perforatum anti-enflamatuar, anti-anjiyojenik ve anti-fibroblastik etkilere sahip olduğunu ileri sürülmüştür (4,5). Bu çalışmada; standardize edilmiş bir kemik kırık modeli oluşturarak, Hypericum perforatum'un kırık iyileşmesine etkisinin histolojik ve radyografik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



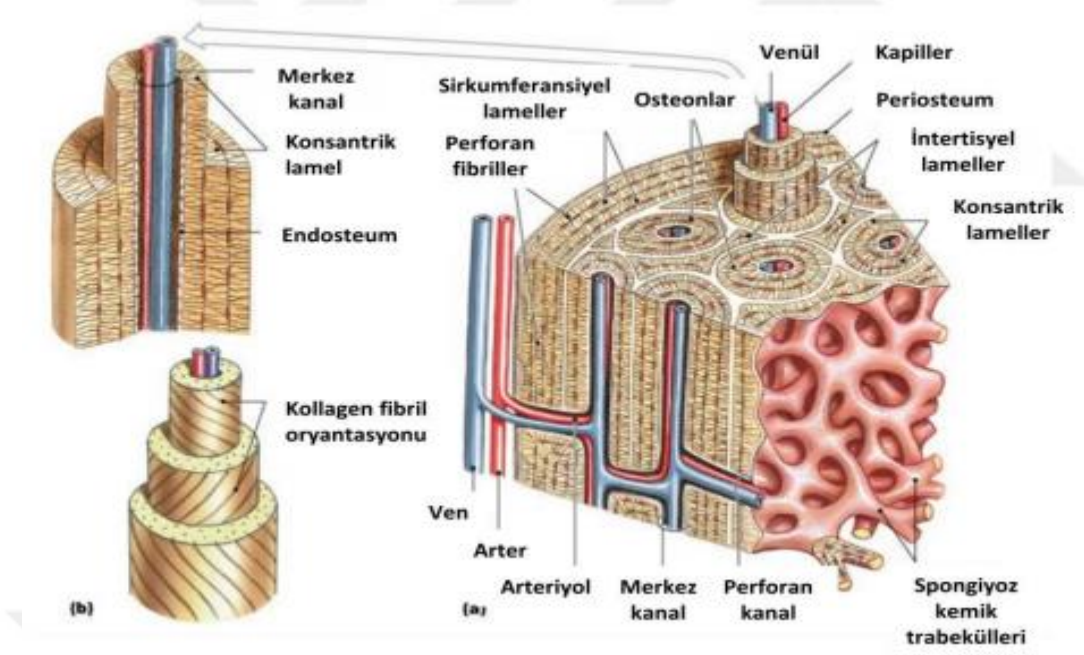
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Yapısı

Kemik doku lökomotor sistemin en sert dokularından biridir. Yumuşak dokulara olan mekanik desteğine ek olarak kan yapımı fosfat (PO₄) ve kalsiyum (Ca²⁺) metabolizmasındaki dengeyi sağlayan önemli bir depodur. Bazı hayati organları dışarıdan kuşatarak korumakta rol alır. Kemiklerin oluşturduğu kaldıraç sistemi sayesinde kas kasılması sonucu oluşan kuvvetler artarak vücutsal harekete dönüşür. Kemik kortikal ve spongioz olarak iki kısımdan oluşur.

2.1.1. Kortikal (Kompakt) Kemik

Kortikal kemik (Şekil 1), spongiyözden daha güçlü, kalın ve daha az boş alana sahiptir. Bu tip kemikte bulunan osteositler ve lameller, kemik içine nüfuz eden kan damarlarının etrafına yerleşmiştir. Kortikal kemikte, kan damarlarının nüfuz ettiği iki ana kanal vardır: kemik eksenine paralel olan Havers veya merkezi kanallar, diğeri ise kemik eksenine dik ve daha büyük olan Volkmann veya perfore kanallar olarak isimlendirilir. Ayrıca, kortikal kemikte, merkezi bir kanal ve içeriği (kan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu içeren) konsantrik lameller ve osteositlerden oluşan Havers sistemi veya osteon bulunabilir. Kortikal kemikte üç farklı lamel türü bulunur: bunlar ortak bir merkezi çevreleyen eşmerkezli dairesel kemik matrisi katmanları olan osteonun bir parçası olarak isimlendirilen konsantrik lameller; kortikal kemiğin dış yüzeyini yapan düz plakalar olarak bilinen sirkumferansiyal lameller ve osteonlar arasında bulunan ve eşmerkezli veya sirkumferansiyal lamellerin kalanından oluşmuş interstisyel lameller.



Şekil 1. Uzun kemik (a) ve kortikal (b) kemiğin şematik hali. (Erişim 2019, http://faculty.seattlecentral.edu/jwhorley/Bones_241)

2.1.2. Spongiöz (trabeküler) Kemik

Kompakt dokunun içinde yer alan kemik trabeküllerinin birbirleriyle birleşmesi ile oluşan yapıdır. Basınçlara karşı kemik dayanıklılığını sağlar. Kemiğe gelen güçlerin değişimine göre trabeküllerin sayısı ve dizilimi değişir. Bundan dolayı kemik zorlayıcı etkilerin altında yeniden biçimlenme gösterir, bu Wolf'un transformasyon yasası olarak adlandırılır. Kemik iliği ise trabeküller arasındaki kalan boşlukları doldurur. Kemiğin dış yüzündeki zara periosteum, iç yüzündeki zara ise endosteum denir

2.1.3. Endosteum

Medüller kanal ve ilik boşluklarını örten bu tabaka ince hücresel bağ dokusu tabakasıdır. Osteojenik hücrelerle beraber hematopoetik hücrede içerir.

2.1.4. Periosteum

Eklem yüzeyi hariç kemiğin tüm yüzeyini örter. Çocuklarda kalındır ve kemiğe gevşek tutulum gösterir erişkindeyse periosteum daha incedir ve kemiğe daha sıkı yapışır. Ayrıca Kemiğin 1/3 dış bölümünün beslenmesinde de rol alır. Periostun iki tabakası vardır.

Dış tabaka fibroz bağ dokusundan, iç tabaka ise osteojenik hücreler içeren kambiyum tabakasından oluşmaktadır. Kambiyum tabakası pluripotent hücre özelliğindedir ve kemiklerin enine büyümesini sağlar.

2.2. Kemik Hücreleri

Bu hücreler kemiklerin canlı kalmasını ve sürekli değişimini sağlarlar. Bir kısmı organik yapıyı sentezlerken bir kısmı da yıkım olaylarında rol alır.

Üç tip hücre bulunur:

2.2.1. Osteoblastlar

Pluripotent mezenkimal hücrelerden kaynaklanır. Tip 1 kollojen, proteoglikan ve glikoprotein sentezi yapan osteoblastlar kemik matriksinin organik kısımlarının üretimini sağlarlar. İnorganik kısımların yapılabilmesinde katkıda bulunur. Kemik hücreleri içinde en fazla golgi organı, endoplazmik retikulum ve mitokondri içeren hücredir. Osteoblastlar kemik yüzeylerinde yan yana dizilirler. Matriks sentezlerken şekilleri kübik ve prizmatikolarak değişebilir. Artan Alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi ile sitoplazmaları bazofilik olur. Sentez işlemleri azaldıkça ALP aktivitesi düşer ve sitoplazmalarının bazofilik özelliği kaybolur. Dolayısıyla hücreler yassılaşırlar. Osteoblastlar yeni sentezi yapılmış matriks ile sarıldıkları zaman osteosit adını almaktadırlar. Matriks sentezi sırasında osteoblastlar yapısal olarak aktif protein sentezi yapan ve salgılayan hücreler gibidirler. Osteoblastlar kutuplaşmış hücrelerdir. Matriksin salgılanma işlemi, daha önce yapılmış kemik matriksi ile temas halinde olan osteoblast yüzeylerinden meydana gelir. Böylece yeni fakat henüz kalsifiye olmamış matriks dokusu, osteoblastlarla önceden meydana gelmiş kemik matriksi arasında yer alır, zamanla Ca²⁺ tuzlarının çökmesi ile kalsifikasyon tamamlanmaktadır. Kemiyi rezorpsiyona uğratan osteoklastların aktivasyon ve farklılaşması ve yanı sıra dolaylı olarak kalsiyum mekanizmasında da rolleri vardır.

2.2.2. Osteoklastlar

Osteoklastlar; kemik rezorpsiyonundan sorumludur, çok çekirdekli, dev hücrelerdir. Hematopoietik hücrelerden miyeloid hücreler oluşur ve mononükleer hücrelere dönüşürler; bu mononükleer hücreler de birleşerek osteoklastları oluştururlar.

Kemik çözümlenmesi Howship lakuna denilen kemik yüzeyindeki çukur alanlarda meydana gelir; çözümlenme kemik oluşumundan daha hızlı olur. Bu hücreler kalsitonine hassas reseptörlere sahiptir ve interlökin-1 osteoklastik aktiviteyi uyarır.

2.2.3. Osteositler

Osteositler, gelişmiş iskelet yapısında oran olarak en fazla bulunan hücrelerdir. Hücre dışındaki kalsiyum, fosfor yoğunluğunda önemli role sahip olan osteositler, kemiğin mekanosensör hücreleridir; bu hücreler kalsitonin tarafından uyarılır, paratiroid hormon tarafından da inhibe edilirler.

2.3. Osteoprogenitor Hücreler

Mezenkim kaynaklı olan ana hücrelerin alt grubudur. Mitoz yeteneği vardır, olgun kemik hücrelerine farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Kırık sonrası uyarılır ve belirgin nükleuslu füziform iri hücrelere dönüşürler. İki tipi tanımlanmıştır. Biricisi gelişmemiş endoplazmik retikulum ve az gelişmiş golgi cisimciği olan preosteoblastlardır. Osteoblastlara dönüşürler. İkinci gruptaki belirgin mitokondri ve serbest ribozomlarıyla bilinen osteoklastlara öncülük eden hücrelerdir.

2.4. Kemik Matriksi

Kemik, özel bir bağ dokudur. Kemik matriksi denilen hücreler arası madde kalsifiye olmuştur. Matriksi, kuru ağırlığının kabaca %40'ı oranında organik, %60 oranında da inorganik bileşenler oluşturur (6). Organik bileşenler arasında proteoglikanlar, kollajen, kollojen dışı matriks proteinleri, sitokinler ve büyüme faktörleri sayılabilir. Kollojen kısım primer olarak Tip 1 kollojenden oluşur ve bu molekülün sonlanma bölgelerinde bulunan boşluklara mineral birikimiyle kalsifikasyon sağlanmaktadır. Osteokalsin, matriks dışı organik proteinler arasındadır ve bunun düzeyi kemik yapım ve yıkımının bir göstergesidir. Osteokalsin, Paratiroid hormon (PTH) ile inhibe edilir ve 1-25 dihidroksivitamin D tarafından ise aktive edilir. Özellikle Ca²⁺ ve PO₄ başta olmak üzere bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum ise inorganik maddeler arasında bulunur (7).

2.5. Kemik Oluşum Tipleri

2.5.1. Enkondral Kemikleşme

Bu kemikleşme tipi kıkırdağın rol aldığı kemikleşme tipidir. Uzun kemiklerin şekillenmesi özellikle bu şekilde olur. Uzun kemiklerin diyafiz bölgesinde kıkırdak hücrelerindeki bazı değişimler sonucunda enkondral kemikleşme gerçekleşir. Diyafizdeki kemikleşmeye primer kemikleşme denir. Diyafizer bölge tamamen kemikleşinceye kadar sürmektedir. Primer kemikleşmeyi sekonder kemikleşme adı verilen, epifiz bölgesindeki sekonder kemikleşme merkezinden kaynaklanan kemik oluşumu takip eder. Epifiz bölgesindeki eklem kıkırdağı kemikleşmeye katılmaz. Temel olarak 'enkondral kemikleşme' iki bölümden oluşur. İlk bölüm kemik modelindeki kondrositlerin hipertrofisi ve harabiyetidir. Bunun dışındaki kalsifiye olmuş kıkırdak dokular arasındaki genişlemiş bölgelere lakuna denir. İkinci aşamada, osteoprogenitör hücreler ve kan kapillerlerinden oluşan osteojenik tomurcuk, bu lakunalara girer. Osteoprogenitör adı verilen hücreler, kemik matriks oluşturacak olan osteoblastlara dönüşürler. Böylece kalsifiye kıkırdak dokusu septumları, başlayan ossifikasyona destek dokusu olarak bulunmaktadır. Kemik bir yandan sürekli olarak yapılırken bir yandan da osteoklastlarca yıkıma uğratılmakta ve bu iki olayın uyumlu çalışmasıyla kemik normal formunu korumaktadır (8).

2.5.2. İntramembranöz Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme; kafatasının düz kemiklerinin, maksilla, mandibula ve klavikuların gelişimi esnasında oluşur. Periosteumda kemik ilavesiyle kemik büyümesinde ve kırıklarının iyileşmesinde kemiğin onarımı sürecinde önemli bir rol alır. Mezankimal kök hücrelerin osteoprogenitör hücrelere farklılaşmasından türetilen fibröz membranın gelişmesiyle başlar. Osteoprogenitör hücreler daha sonra osteoblastlara ayrışır ve bu olay yeni kemik dokusunun oluşumuna neden olur.

2.5.3. Apozisyonel Kemik Yapımı

Kemiğin enine genişlemesi ve remodelasyonu bu şekilde olur. Periost ile çevrili kemiklerde, periost içindeki osteoblastlarca sentezlenen osteoid ile tabakalar halinde yeni kemik oluşum gerçekleşir. Remodelasyonda da gerekli sahalarda osteoblastik aktivasyonla osteoid sentezi yapılır (9).

2.5.4. Embriyonik Uzun Kemik Oluşumu

İntrauterin 6. haftada mezenşimal taslaktan oluşur. Enkondral kemik oluşumu embriyonik uzun kemik oluşumunu sağlar. Ortalama 8. haftada mezenşimal modelde vasküler tomurcuklar belirir ve osteoblastlara dönüşen ve primer kemikleşme merkezlerini oluşturan osteoprogenitör hücreleri getirirler. Kıkırdak modeli büyümesi apozisyonel ve intersitisyel büyüme ile olur. Kıkırdak taslağının merkez kısmının kapiller tomurcuklarla gelen miyeloid öncü hücrelerce rezorbsiyonu sonucunda kemik iliği oluşur. Kemik uçlarında sekonder kemikleşme merkezleri oluşur ve bunlar immatür kemiklerin uzunlamasına büyümesinden sorumlu olan epifizyel büyüme merkezlerini meydana getirir. Bu büyüme süreci sırasında epifizyal arter, metafizyal arterler, besleyici arterler ve perikondral arterlerden oluşan zengin bir arteryel kaynak vardır (10).

2.6. Kırık İyileşmesi

Kırık içeriden ya da dışarıdan etki eden kuvvetlerce kemiğin anatomik yapısının bozulması olarak tariflenebilir. Kırık sonrası bütünlüğün yeniden sağlanması için fizyolojik reaksiyon zinciri başlar. Kırık iyileşmesi için biyolojik, mekanik ve moleküler faktörlerin uygun etkileşimi gerekmektedir (11). Kırık iyileşmesi karmaşık bir süreçtir ve doğal gidişatı bazı evrelerden oluşur (12):

1-Periosteal ve endosteal kallus oluşumu ve fragmanlar arası fibrokartilaj dönüşümü,

2-İntramembranöz ve enkondral kemikleşme ile kemik devamlılığının sağlanması,

3-Avasküler ve Nekrotik alanlarda yeni havers kanalları oluşumu,

4-Remodelling,

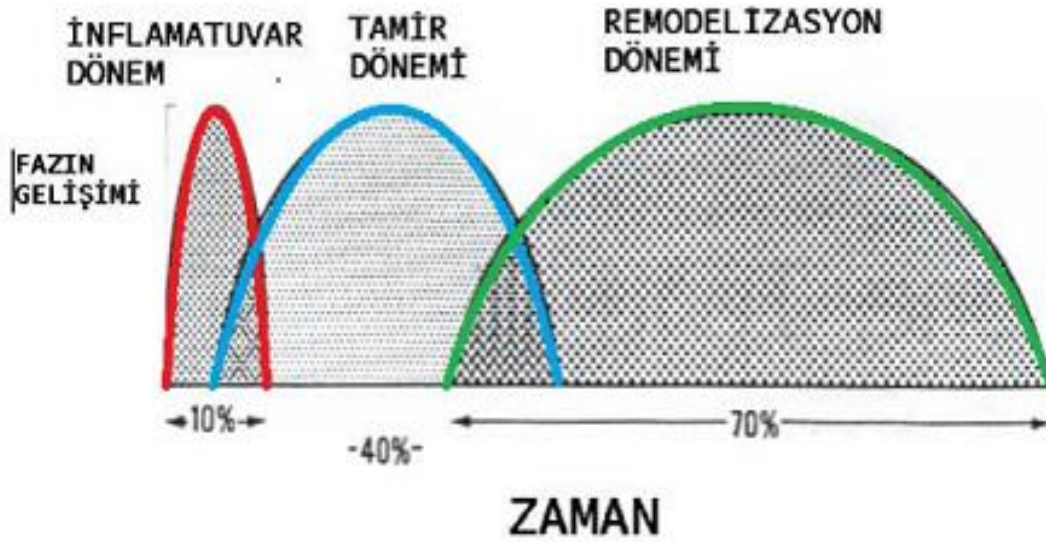
5-Fonksiyonel adaptasyon. Temel olarak iki çeşit kırık iyileşmesinden söz edilebilir; primer ve sekonder:

Primer kırık iyileşmesi; genelde dış kallus dokusu olmadan iç kallus oluşumuyla devam eden temas (kontakt) iyileşme şeklidir, bunun için kemik fragmanlarının herhangi bir aralık olmaksızın anatomik olarak redükte edilmesi ve sağlam tespiti sonrasında görülür. Burada kemik zamanla lamellar kemiğe dönüşür ve haversian kanalları ve yeni kan damarları oluşabilince direk iyileşmeden bahsedilir. Bu süreç aylar hatta yıllarca devam edebilir (8).

Sekonder kırık iyileşmesi; en sık görülen iyileşme çeşididir. Enkondral ve intramembranöz iyileşmeyle gerçekleşir. Bu iyileşmede mikro hareket ve yüklenme vardır. İntramedüller çivilemede, konservatif (alçı, traksiyon) tedavide, eksternal tespit ya da parçalı kırıkların minimal girişimsel internal (perkütan osteosentez) tespiti şeklinde tedavilerde sekonder iyileşme görülür (13).

Kemiğin iyileşme süreci histolojikolarak iç içe geçmiş üç aşamada gerçekleşir:

1-Yangı (inflamasyon), 2-Onarım (reperasyon) 3-Yeniden şekillenme (remodelling)

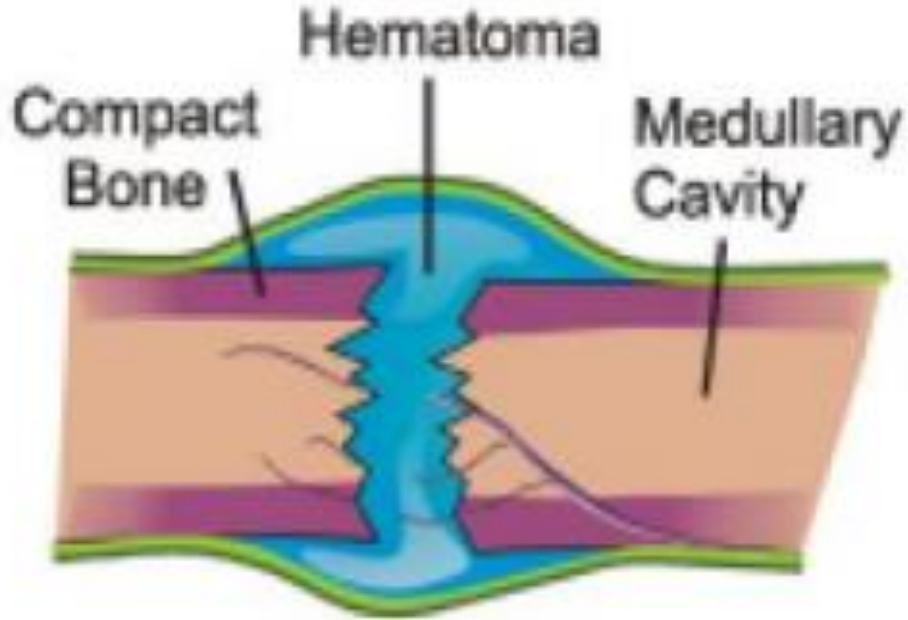


Şekil 2. Kırık iyileşmesinin evreleri

2.6.1. Enflamatuvar (Hematom, Yangı) Dönem (1–4 gün)

Tüm travmalarda olduğu gibi kırık sonrasında da verilen ilk cevap enflamasyon yani “yangı” cevabıdır. İlk iki gün içerisinde kırık uçlarından, yaralanmış olan periost ve çevre yumuşak dokulardan kanama ile kırık hematomu oluşur. Yırtılan lenfatik ve küçük damarlardan sızan kan ve lenf sıvıları aynı bölgede toplanır. Kanama olan bölgeye pıhtılaşmayı sağlamak için trombotik faktörler salınır. Hematom kırık uçlarını bir arada tutar ve sekonder iyileşmede önemli bir rol oynar. Açık kırıklarda ve cerrahi fiksasyon için açılan kırıklarda kırık hematomu dışarıya boşalıyor olduğundan iyileşme süreci biraz gecikir, hatta kaynamama bile olabilir. Kırık hematomu fibrin yapıda bir iskelet oluşturarak onarım

hücrelerine yardımcı olur. Salınan büyüme faktörü ve bazı proteinlerin aracılığı ile periosteal hücre artışına ve matriks sentezi artışına yardımcı olur. Kırık sonrasında önce geçici bir arterioller daralma olur, hemen sonrasında mast hücrelerinden histamin salınımıyla arterioller, venüller hem de kılcal damarlarda genişleme gözlenir. Kırık bölgesindeki kılcal damarların geçirgenliğinin artmasıyla da ödem oluşur. Monosit, Lökosit ve lenfositler ödemli bölgeye doğru yer değiştirir. Komşu havers sistemleri arasında çok yetersiz anastomozlar olması nedeniyle kırık hattının her iki tarafında bir miktar dolaşım bozukluğu oluşur ve nekroz gözlenir. Akut yangının başlamasında nekrotik dokular ve kırık bölgesinde açığa çıkan prostoglandinler rol oynar (7).

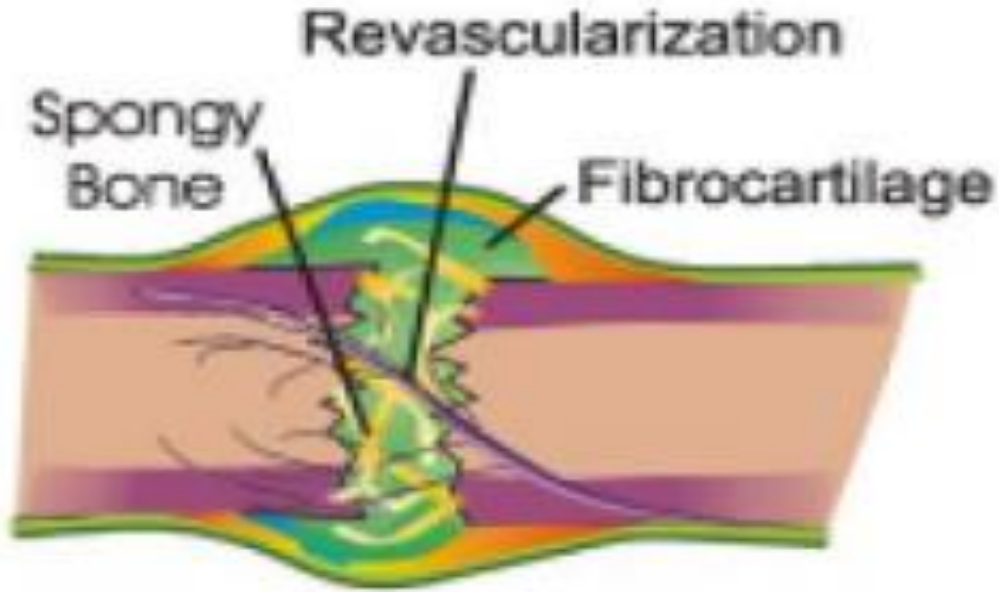


Şekil 3. Enflamatuvar dönem (Jay R. Lieberman MD, Kemik onarım ve yeniden Gekillenmesi, 2007)

Kırık bölgesinde bulunan hematoma 48 saat içinde organize olarak fibrin bakımından zengin bir şekil alır. Lökosit ve makrofaj diapedezi ile fibrin matriks oluşur. Büyük kemik kırıklarında makrofaj ve monositler interlökin-1 salgırlar. İnterlökin-1 lenfosit göçünde, ateş oluşumunda rol alır. Bu süreç yaklaşık olarak 5. güne kadar devam eder (7).

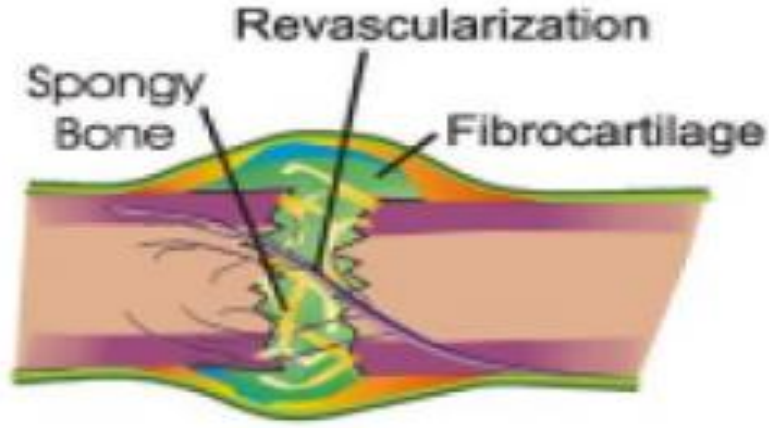
2.6.2. Onarım (reperasyon) Dönemi (5- 21 gün)

Onarım evresinin ilk aşaması hematoma organize hale gelmesidir, iyileşme evrelerindeki en önemli kısımdır. Bazı mekanizmalarla hassaslaşan öncü hücreler farklılaşarak yeni damar, fibroblast, destek hücreler ve hücreler arası madde oluşturur. Onarım evresi ise kırık oluştuktan birkaç saat sonra başlar, 7–12 gün içinde belirgin hale gelir. Bu devrede osteojenik öncü hücrelerden ostoblastlar farklılaşırlar. Onarım mekanizmasında görev alan hücreler çok yönlü gelişim gücüne sahip hücrelerdir. Bu hücreler, periosteumun osteojenik tabakasından, kırık bölgesindeki granülasyon dokusundan ve nadiren de endosteumdan köken alır. Bu hücreler farklılaşmaya başlayınca öncelikle kılcal damarlarla hematoma içine giren fibroblastlar değişikliğe uğrarlar.3.gün sonunda kırık uçlarında yoğun mezenşimal hücre vardır. Bu hücreler kırık uçları arasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluşturur. Bu granülasyon dokusu endosteal osteojenik hücrelerle, periosteal ve fibrin matriksteki fibroblastların çoğalıp farklılaşmasıyla oluşur(6).



Şekil 4. Onarım dönemi (Kırıkta kallus) (Jay R. Lieberman MD, Kemik onarım ve yeniden şekillenmesi, 2007)

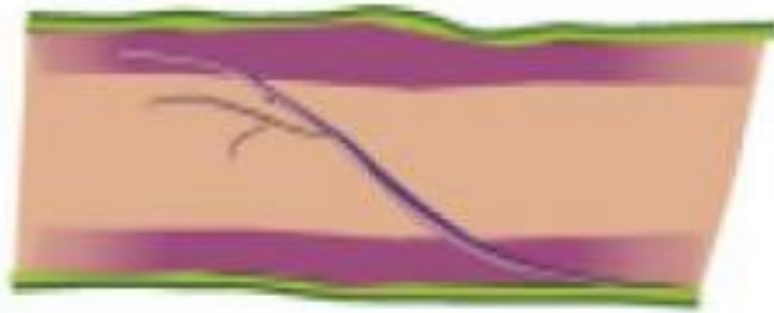
Fibroblastlar kollajen sentezlerken kondroblastlar ise kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoid salgırlar. İyileşme dönemindeki kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı içindeki kollajenle orantılıdır. Kallus boyutu kırığın hareket derecesiyle doğru orantılıdır. Oluşan ilk kallus cevabının yeni kapiller ile tamamlanması 4–12. günler arasında meydana gelmektedir. Bu bölgede kırıkta hücreleri, trabeküler kemik ve fibroblastların bir araya gelmesi ile kırık bölgesinde mezenşimal hücrelerin çoğalması ilk 16 saatte saptanmıştır. Bu çoğalma, kırık sonrası 32 saatte en üst düzeye çıkar. Kırık iyileşmesinin ilk dönemlerinde periosta ait damarlar, geç dönemde ise besleyici damarlar kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Kanla beslenmenin daha iyi olduğu kemiğe yakın bölgedeki hücreler osteoblastlara dönüşür, yakın olmayan kısımda kılcal damarların gelişim hızı hücre çoğalmasının hızına uyum gösteremediğinden, hücreler kondrosit ve kondroblasta farklılaşarak kırıkta dokuyu oluşturur, 7–40. günler arası kallus oluşur. Onarımın ilk zamanlarında kırıkta oluşumu (kırıkta kallus) görülür. Kırıkta kallusun damarlanmasından sonra kemik gelişimi başlar. Kan dolaşımı yeterli düzeyde olursa osteoblastlar kallus içinde normal kemik gelişimine elverişli matriksi sağlamış olur. Periostun iç (kambiyum) tabakasında Pluripotent Mezenşimal Hücreler- (PPMH) kırık bölgesindeki erken dönem kemik yapımında rol alırlar. Bu hücreler doğrudan osteoblastlara farklılaşarak periostal intramembranöz kemikleşmeyi başlatırlar. Oluşan intramembranöz yapı kemik kırık hattının her iki kenarına bitişik olarak görülmeye başlar ve kallus merkezine doğru ilerler. İnamembranöz kemikleşme sonucu meydana gelen bu kallusa kemik kallus (sert kallus) denir. İnamembranöz kemikleşme kırık sonrasında 8-16 günde periost altında belirgindir (13). Kırık iyileşmesinin 2. haftasının ortalarında kırık bölgesini yaygın olarak kırıkta doku kaplar ve kalsifikasyon için biyokimyasal hazırlığa başlarlar. Bu aşamadaki kallus kırıkta kallus (yumuşak kallus) olarak bilinir. Kırık kemik uçları iç ve dış kallus gelişimiyle çok sağlam bir yapı oluşturur. Kallus gelişimi çocukta daha hızlı olur. Ayrıca trabeküler kemikte kompakt kemiğe göre daha hızlı olur. Kırık sonrası kallus oluşumu ve mineralizasyonu 4-16 haftayı gerektirir. Onarım evresinin ortalarında gereksiz ve etkisiz kallus dokusunun geri emildiği remodeling başlar (14).



Şekil 5. Onarım dönemi (Kemik Kallus) (Jay R. Lieberman MD, Kemik onarım ve yeniden şekillenmesi, 2007)

2.6.3. Yeniden şekillenme (remodeling) Dönemi (20–100 gün)

Bu süreç tamir dönemi ortalarında başlar ve kırık klinik olarak iyileştikten sonra yıllarca sürebilir. Bu dönem kırık iyileşmesinde en son ve en uzun dönemdir. Aynı anda osteoblastik ve osteoklastik aktivite ile hem yeni kemik oluşumu gözlenir hem de oluşan yeni kemiğin kendine özel trabeküler yapısı oluşur. Bu dönemde güçlü ve düzensiz kallusun normale yakın güçteki düzenli lameller kemiğe dönüşümü gözlenir (14).



Şekil 6. Remodeling dönemi (Jay R. Lieberman MD, Kemik onarım ve yeniden şekillenmesi, 2007)

Yeniden şekillenme döneminde başlıca 4 olay gözlenir:

a- Kalsifiye kırıkta, osteoid dokularla değişerek birincil trabeküler dokulara dönüşür.

b- Lameller kemik oluşmuş olan dokunun yerini alır.

c- Kompakt kemik uçlarında olan kallus lameller kemikten yapılan ikincil osteonlara dönüşmektedir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlar ile oluşmaktadır.

d- İlık kanalı dereceli olarak yeniden şekillenir, kanal içinde kallus rezorbe olarak boşluklar yeniden düzenlenirler. Genel olarak iyi remodele olan bölgeler fizise yakın bölgedeki ve metafizer bölgedeki açılanmalar, eklem hareket düzlemindeki açılanmalar; femur distali, humerus proksimali ve radius distalindeki açılanmalardır. Remodalizasyon kapasitesi (kusurlu kaynamanın zamanla düzelme miktarı), yaş ile ters orantılıdır. Ekleme yakın olan kırıklarda, eklem yaptığı major hareketlerin istikametine aykırı kırıklarda düzelme daha zor olmaktadır (15).

2.7. Kırık İyileşmesinin Kontrolü

Kırık oluştuktan sonra, iyileşmenin yeterli olması için ortamda öncü ve destek hücrelerinin, sinir sisteminin ve kılcal damarlarının yeterli olması gereklidir. Bölgede yerel olarak üretilen ya da dolaşım yoluyla gelen, lokal olarak kemik dengesini koruyabilen faktörler de bulunmaktadır (21, 22, 24, 25).

2.7.1. Prostaglandinler (PG)

Araşidonik asitten oluşan PG'ler hücre duvarının ve kollajenin yaralanmalarında sentezlenir. Güçlü vazodilatatör etkileri vardır. İltihap hücrelerine kemotaktik etkiye sahiptir ve akut iltihabi reaksiyonda etkindirler. Mitojenik aktiviteyi desteklerler. İmmün düzenleyici olarak lenfosit antikor yapımını düzenlerler. PGE-2 ve PGI-2 kemik geri emilim gücüne sahiptir. PGE-1 ve PGE-2 yeni kemik yapımını artırır. PGF₂-α kondrolizis ve kondrogenizde etkilidir.

2.7.2. Kemik Uyarıcı Faktörler

Osteoprogenitör hücrelerin mitozunu artırır ve yeni kemik hücrelerinin oluşumuna yol açar.

2.7.2.1. Kemik Morfojenik Proteini (BMP)

Mitojenik ve dönüştürücü bir faktördür. Osteoprogenitör hücrelerin kemik ve kırıkta hücrelerine farklılaşmasına neden olduğu bildirilmiştir. BMP 'nin 1-10 arası alt grupları mevcuttur. BMP-7 osteojenik protein 1, BMP-8 ise osteojenik protein 2 olarak adlandırılmıştır (21).

2.7.2.2. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

Kemik ve fibroblast hücreleri için mitojeniktir. Kan dolaşımında ve kırık sahasında bulunabilir. Bağ dokusunda kollajen sentezini artırır. Monosit ve makrofajların kırık bölgesine göçünü artırır. PDGF uygulamasıyla kallus yoğunluğu ve hacmi artmıştır (21).

2.7.2.3. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β)

İltihap ve doku tamirinden sorumludur. Oluşan tüm hücreler ara formlarının birinde TGF- β oluştururlar ve oluşan tüm hücreler TGF- β reseptörüne sahiptir. Ekstraselüler matriks ve trombositler en önemli kaynaktır. Kondrosit ile osteoblastlarda sentezlenir ve ekstraselüler matrikste birikir. Trombositlerden salınarak onarımda rol oynarlar. Makrofajlardan salınan en güçlü kemotaktik ajandır. Hücre dışı matriks bileşenlerinden fibronektinin proteoglikan ve kollajen oluşumunu artırır. Hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılar. Bu da sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna etki eder (21).

2.7.2.4. Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü (FGF)

Kırıkta oluşumu aşamasında kallusu genişletir. Kırıkta ve fibroblastlar için mitojeniktir (21).

2.7.2.5. Makrofaj Kaynaklı Büyüme Faktörü (MDGF)

Kondrositler ve osteoblast benzeri hücreler için mitojeniktir (21).

2.7.2.6. Somatomedin C

Kondroblastların bölünme ve farklılaşması ile kemik matriksi oluşumunu hızlandırır (21).

2.7.2.7. Plazma Fibronektini

Anjiogenezi aktive eder.

2.7.2.8. İnterlökinler (IL)

Monosit ve makrofaj kaynaklıdır. IL-1; kollajenaz, PGE-2 ve fibroblast çoğalması ile ilgilidir. Osteoklastlara etki ederek kemik geri emilimini etkilerler (21).

2.7.2.9. Kondroblast Kökenli Büyüme Faktörü (CDGF)

İki tipi mevcut olup Tip 2 kollajen ve hiyaluronik asit için düzenleyicidir (21).

2.7.2.10. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Kemik geri emilimini hızlandırır.

2.8. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

İyileşme süreci organize olmuş birçok hücre şeklinin katkılarıyla oluşan, birçok faktörün etkili olduğu karmaşık ve uzun fizyolojik bir süreçtir. Kırığın kanlanma özellikleri, lokalizasyonu, kırığın açık ve kapalı oluşu, hastanın kullandığı ilaçlar gibi değişken faktörler kırık iyileşmesini etkiler. İyileşme dönemi üzerine yapılan araştırmaların temeli kan dolaşım durumu ve stabilite üzerine kuruludur. Kırık uçları birbirine yakın ise ve fragman uçları arasında tespit uygulanmışsa, kırık bölgesinin kanlanması yeterli ise, bölgede enfeksiyon yoksa ve kırık bölgesi yumuşak doku örtüsünün iyi olması iyileşmeyi arttıran faktörlerdir. Klinik olarak kırık iyileşmesini etkileyen faktörlere bakarsak tüm sistemik ve çevresel faktörlerin olumlu veya olumsuz bir etkisinin olabileceğini düşünebiliriz.

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler sistemik ve lokal olarak başlıca iki ana grupta incelenebilir (20,26).

2.8.1. Sistemik Faktörler

2.8.1.1. Yaş

Çocukluk çağında yüksek mitoz hızı ve öncül hücrelerin daha hızlı farklılaşabilmesi nedeniyle kırık iyileşmesi daha hızlıdır. İnfantların kemik kaynama hızı adölesanlara, adölesanların kaynama hızı ise erişkinlere göre fazladır. Çocukluk çağında revaskülarizasyon ve mezenşimal hücre farklılaşması oldukça hızlı seyrederek. Bu nedenle çocuklarda kırık iyileşmesi erişkinlerden daha hızlıdır. Ayrıca periosteumun kalınlığı ve kanlanması da yaşla azaldığı bilinmektedir (16, 27).

2.8.1.2. Genel durum

Anemi, raşitizm, tüberküloz, diyabetes mellitus ve beslenme bozukluklarının kırık iyileşmesini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Kronik hastalıklar, tüberküloz, gibi iltihabi olaylar, hiperemi nedeniyle kalsiyum tuzlarının çözünmesini etkiler. Artan lökositlerin proteolitik enzimleri, matriksin bozulmasına neden olur ve osteoid oluşumunu engeller. Alkol kullanım fazlalığı da kırık iyileşmesi yavaşlatır (20).

2.8.1.3. Hormonlar

2.8.1.3.1. Paratiroit Hormon

Vücuttaki kalsiyum dengesini sağlayan başlıca hormondur. Kemik rezorpsiyonunu, böbrekten kalsiyum geri emilimini ve böbrekte kalsitriol yapımını artırarak serum kalsiyum düzeyini korur. PTH' nun osteoklast sayısını artırıcı, osteositleri uyararak osteolizi hızlandırıcı, kemiğin yeniden şekillenmesini uyarıcı gibi etkileri vardır. Net etkisi kemik kaybı ve kırık iyileşmesinin yavaşlamasıdır (16, 23, 24).

2.8.1.3.2. Kalsitonin

Tiroidin parafoliküler-C hücrelerinde sentez edilir. PTH' nun antagonistidir. Ekstrasellüler Ca⁺ düzeylerindeki artış kalsitonin sekresyonunu uyarır. Kalsitoninin en önemli etkisi plazma Ca⁺ konsantrasyonunu düşürmektir. Bu da osteoklastik aktiviteyi ve kalsiyumun kemikten mobilizasyonunu inhibe eder. Hem tarbeküler hem de kompakt kemik yapımını artırır (28).

2.8.1.3.3. İnsülin

Anabolizan bir hormondur. Somatomedin reseptörleri üzerinden indirekt yol ile kemik formasyonuna katkı yapar. Kırık iyileşmesini hızlandırır. Kollajen yapımını artırır (20).

2.8.1.3.4. Kortikosteroidler

Kırık iyileşmesini negatif yönde etki ederek yavaşlatır. Kallusun oluşumunu yavaşlatıp, somatomedin sentezini inhibe ederler. Bunun sonucunda osteoblast gelişiminin yavaşlamasına ve matriks protein sentezinin azalmasına neden olur. EGF, FGF ve PDGF üzerine antagonist etki yaparak kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler (20).

2.8.1.3.5. Tiroid Hormonu

Hem kemik yapımını hem de yıkımını uyarır. Hipertiroidide kemik döngüsü artar ve kemik kaybı gelişir. Kemiğin yeniden şekillenmesinde de etkilidir. Paratiroid hormonu gibi kemiğin yeniden şekillenmesine katkıda bulunur (20, 23).

2.8.1.3.6. Büyüme Hormonu

Protein sentezi ve büyüme hızını artırarak büyüme ve gelişmeyi uyarır. Kemik formasyonuna katkı sağlar. Kallusun hacminin artmasını sağlar (28).

2.8.1.3.7. Gonadal steroidler

Kemiklerin bütünlüğünün sağlanmasında ve gelişiminde etkilidir. Androjenler kas gücünü arttırarak veya dolaylı yoldan kemik yapımını uyararak etkili olurlar. Menopoz sürecinde azalan östrojen seviyesi nedeniyle kemikte rezorpsiyon artışı olur.

2.8.1.3.8. Vitaminler

D vitamini normal dozda mezenşimal hücre farklılaşmasını uyararak kırık iyileşmesine yardım eder. Eksikliğinde osteoblast düzenlenmesinde ve osteoklast aktivitesinde bozulma olmaktadır ve bu şekilde kemik oluşumu engellenmiş olur (23).

A vitamini fazlalığında hücre çoğalmasının olmaması ile birlikte kırıkta kolonlarında erozyon meydana gelir. Osteoklastlara farklılaşma uyarılır ve kırık iyileşmesine negatif yönde etki ederek kırık iyileşmesini geciktirir (20).

C vitamini, kollajen sentezine katkısından dolayı kemik iyileşmesini olumlu etkiler (25).

D vitamini normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırır. Böbreklerden kalsiyum ve fosfat geri emilimini sağlar. Dolaylı yönden bağırsaklardan fosfat emilimini artırır, matriks mineralizasyonunu kolaylaştırır. Kalsiyumun kemikten kana geçişini artırır bu etkisi PTH varlığında belirgindir.

D vitamini eksikliğinde Ca^{+2} düzeyinin düşmesi ve kemik kalsifikasyonunda zayıflama meydana gelir. Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme evresinde rol oynar. Sonuç olarak; D vitamini normal dozda kırık iyileşmesini hızlandırırken, toksik dozda olumsuz etki etmektedir (20).

B5 vitamini eksikliği ve K vitamini antagonistleri ise kırık iyileşmesine olumsuz etkide bulunur (29).

2.8.1.3.9. İlaçlar

Nonsteroid anti-inflamatuarlar yeni kemik yapımını prostoglandin inhibisyonu sonucunda lokal kan akımını azaltarak veya prostoglandin inhibisyonu sonucunda primitif osteoblastların fonksiyonunu engelleyerek geciktirirler. Yapılan çalışmalarda NSAİİ' lar osteogenezisin erken dönemindeki kan akım artışını engelleyerek ya da mezenkimal hücre proliferasyonunu azaltmak suretiyle etkili olabileceği gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda da etki etmediği belirtilmiştir. Toksik dozda indometazinin kırık iyileşmesini durdurduğu da bilinmektedir.

Antikoagülanlar osteogenezisi, mekanik olarak da pıhtı oluşmasını engelleyerek ya da bölgedeki hücre sayısını değiştirerek ve aktivitelerini etkileyerek geciktirirler. Dikumoral, kondroidin sülfat ve hyolüronidaz kırık iyileşmesine yardım eder. L-Dopa'nın kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (28, 30-31).

2.8.1.3.10. Hiperbarik oksijen

Basınç altında oksijen solunması 2-3 atmosfer/günlük 2 saat kırık iyileşmesini hızlandırdığı fakat daha uzun süre 6 saat/gün doz uygulamaların ise kırık iyileşmesini geciktirdiği izlenmiştir (20, 32).

2.8.1.3.11. Kırık bölgesi stresleri

İyi redükte ve tespit edilmiş olan kırık kemiklere erkenden fonksiyon ve kontrollü yük verilebilmesi kırık iyileşmesini uyarıcı yönde etki gösterir. Bunun nedeni PGE-2 miktarının artması ve bu bölge dolaşımına olumlu bir katkısı olmasıdır (16, 17, 20, 21, 23).

2.8.1.3.12. Sigara

Sigara içiminin kırık iyileşmesindeki inhibe edici etkisi deneysel modellerde gösterilmiştir. Tütün kullanan bireylerde kaynamama oranı yaklaşık 2-4 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Kaynamama riskini arttırmakta özellikle de tibia kırığında, kırığın kallus direncini düşürmektedir ve lomber füzyon sonrası psödoartroz riski %500'e kadar artmaktadır (19). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, nikotinin otojen kansellöz kemik greftlerinin damarlanmasını engellediği gösterilmiştir (33).Yine başka bir tavşan çalışmasında tibia ostetomisi iyileşmesinde, nikotin kullanımının kırık iyileşmesini geciktirdiği ve daha yüksek kaynamama oranına sahip olduğu gösterilmiştir (34).

2.8.2. Lokal Faktörler

2.8.2.1. Travmaya Bağlı Nedenler

Travma şiddetine bağlı olarak kemik ve yumuşak doku hasarları meydana gelir. Şiddetli travmanın sonucunda kırığın deplase olması sonucu kan dolaşımı bozularak kırık iyileşmesini olumsuz olarak etkilemektedir. Şiddetli travma ile oluşan deplase alana kas, fasya, tendon ve nadiren de damar ve sinirin girmesi kırık iyileşmesini geciktirir. Çok parçalı, açık ve kirli yaralanmalarda kırık iyileşmesi gecikir. Açık kırıklarda kırık hematomunun dışarı boşalması ve enfeksiyon riskinden dolayı kaynama olumsuz etkilenir. Eğer kırık sahasının kanlanması iyi değilse ve kırık fragmanları canlı değilse kallus oluşumunda problemler meydana gelecektir. Femur başı, talus ve skafoid gibi bazı kemiklerde kan dolaşımının yetersiz olması kırık iyileşmesini geciktirir. Eklem içine uzanan kırıklarda;

eklemin sinovial sıvısında bulunan kollajenazlar, başlangıç matriksini bozar ve iyileşmenin ilk evresini yavaşlatırlar (18, 24,35).

2.8.2.2. Enfeksiyon

Mevcut enfeksiyonun kırık iyileşmesindeki negatif etkileri ile kaynamamaya neden olduğu bilinmektedir. Enfeksiyonun varlığı fibröz kallus oluşumunu engeller. Enfeksiyon durumunda birçok hücre enfeksiyonu yenmeye veya çevrelemeye çalışır. Bunun yanında enfeksiyon normal dokuların nekrozuna ve damarların trombozuna sebep olur. Açık olan yaralarda eksojen olarak, sistemik enfeksiyonun yayılımı ile ya da ameliyat sırasında iatrojenik olarak bulunur. Enfeksiyon kırık bölgesindeki granülasyon ve kemikleşme evrelerindeki dokuları olumsuz etkileyerek ve enfeksiyöz nedbe dokusu geliştirerek kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir (23, 35).

2.8.2.3. Kırılan Kemiğin Türü

Kırılan kemiğin kortikal ya da spongioz olması kaynamayı etkiler. Spongioz kemik yüzey alanı fazla, hücresel bakımdan zengin ve kanlanması iyi olduğundan daha kolay iyileşmektedir (20).

2.8.2.4. Travmanın Derecesi ve Etkisi

Travmanın şiddetine bağlı olarak kemik ve yumuşak doku hasarı oluşur. Hasarın büyüklüğüne bağlı olarak oluşan nekrotik doku miktarı iyileşme için gerekli mezenkimal hücre göçü ve vasküler invazyon için bir engel oluşturur. Açık kırıklarda hematoma dışarı boşalması ve enfeksiyon riskinden dolayı kaynama olumsuz etkilenir (23, 24, 36).

2.8.2.5. Kırığın Şekli

Segmenter kırıklarda intramedüller kanlanma da etkilendiği için kaynama daha geç olmaktadır. Eklem içi kırıklarda genellikle açık redüksiyon gerektiği için lokal kanlanma bozulmaktadır (17, 20, 23).

2.8.2.6. Tedaviye Bağlı Nedenler

Yeterli sürede ve şekilde tespit kırık kaynamasının temel prensibidir. Stabil bir fiksasyon kırık iyileşmesini artırırken erken yük verilmesine imkân sağlayan yöntemler

mikro hareketlerle kırık iyileşmesini iyi yönde etkiler. Stabilizasyon yapılırken kanlanmayı olumsuz yönde bozan yumuşak doku ve kemikteki hasarlanma kaynamayı kötü yönde etkiler. Ultrasonun da kırık iyileşmesinde etkilerini ortaya koymak için çalışmalar yapılmıştır. Klinik çalışmalarda ekstrakorporeal şok dalgalarının uzun kemiklerde kırık iyileşmesinde etkili olduğu ve gecikmiş kaynama ya da kaynamama durumlarında faydalı olabileceği bildirilmiştir. Deneysel hayvan modellerinde aralıklı hiperbarik oksijen uygulamasının kırık iyileşmesini olumlu etkilediği bildirilmiştir (19, 32, 35, 37).

2.9. Hypericum Perforatum

Hypericum perforatum olarak bilinen St. John's Wort, ılıman bölgelerde yetişen geniş yapraklara sahip olan bir bitkidir. Bu bitkinin hastalıkların tedavilerinde ilaç olarak kullanılması çok eski dönemlerden Antik Yunan dönemine dayanmaktadır (38). Hypericum perforatum; yanıklar, şişlik, yara iyileşmesi, anksiyete ve hafif-orta derecelerde depresyon gibi hastalıklara olan terapötik etkilerinden dolayı araştırmacılar açısından da büyük ilgi görmektedir (39). Hypericum perforatumda biyolojik açıdan aktif olan birçok madde olmasına rağmen, en büyük aktiviteye hipericin (bir naftodiantron) ve hiperforin (bir lipofilik floroglucinol) sahiptir.

H. perforatum, Clusiaceae'ye (Mangostan ailesi; alternatif olarak Hypericaceae ve Guttiferae) ait çok yıllık çiçekli bir bitkidir. Kalmat otu, keçiotu, tiptonotu ve enola otu gibi değişik adlarla da adlandırılabilir (40). Tipik olarak 40-80 cm yüksekliği olan, 4-5 yapraklı, sarı ve bakır rengi çiçekleri olan çalılık türünden oluşur. Gövde ve dallar 1-3 cm uzunluğunda düzgün kenarlı yapraklar tarafından kaplanmıştır. Çiçekler ezilerek kan kırmızı bir pigment üretirler (41).

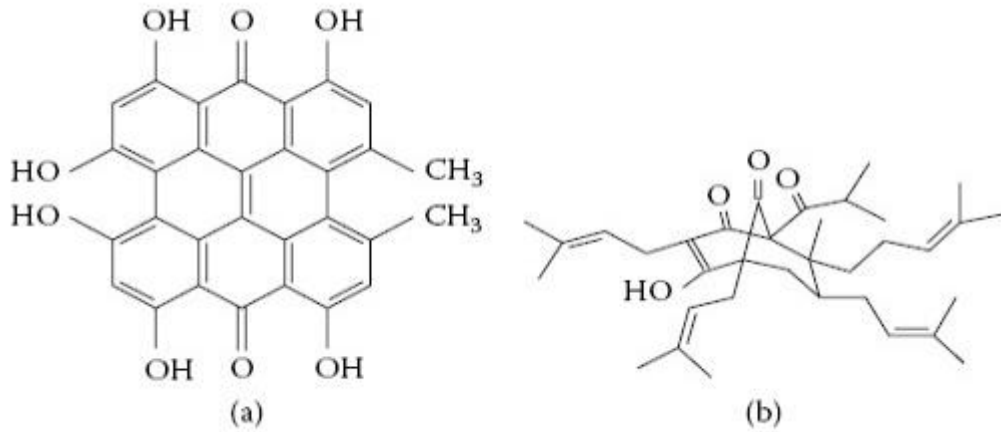


Şekil 7. *Hypericum perforatum*, Chapter 11, Medical Attributes of St. John's Wort, (*Hypericum perforatum*) Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. (2011)

H. perforatum, 2000 yılı aşkın bir süredir tıbbi yönden önemli bir bitki olarak görülmektedir. Birinci yüzyılda Yunan doktorlar Galen, Pliny, Dioscorides ve Hipokrat, *H. perforatum*u diüretik etkisi, yara iyileşmesi, adet düzensizliklerinde ve yılan ısırıklarında tedavi için önerdiler (42, 43). Eski yıllarda bitkilerin bazı mistik özelliklere sahip olduğuna inanılıyordu ve kötü ruhları uzaklaştırmak için toplanıyordu.

Hypericum ismi Yunanca kökenlidir. Kelime kökeni "hyper" (anlamı üzerinde) ve "eikon" (görüntü anlamında) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuş ve kötü ruhları engellediği şeklinde inanışlar yayılmış. Başka bir efsanede, en büyük etkisi, bitkinin en yoğun çiçek zamanı olan Saint John Günü (24 Haziran) toplandığı zaman elde edilmiş (42). Ayrı bir efsanede, St. John'un öldürüldüğü gün olan 29 Ağustos'ta bitki kan kırmızı yağını vermiştir.

Bu bitki Ortaçağ'da da ilaç olarak denenmiştir. Paracelsus 1525'te depresyon ve melankoli tedavisi için önermiştir (44). 18. ve 19. Yüzyılda *H. perforatum*'un şifalı bitki olarak kullanılması Avrupa dışında başka kıtalara yayılmıştır. *H. perforatum* sık bir şekilde; depresyon, anksiyöz durumlar, uykusuzluk sorunu, diüretik olarak ve gastrit tedavilerinde çay ve tentür şeklinde kullanılmış. Bitkisel yağ formlarında ise hemoroit ve enflamatuvar hastalıklar için de kullanılmıştır. Bunlardan farklı sinir hasarı da olan yaralar, kesik, yanık, sıyrık gibi problemlerin tedavisi için de kullanılmış (45). Yapılan kimyasal araştırmalarda, *H. Perforatum*'un içeriğinin tıbbi olarak aktif yedi grup bileşenden oluştuğu gösterilmiştir (46). Bileşenler içerisinde; floroglusinoller, naftodiantronlar ve flavonoidler (fenilpropanlar, flavonol glikozitler ve biflavonlar) ve ayrıca uçucu yağlar yer almaktadır (47, 48). İki temel aktif bileşeni vardır. Bu bileşenler; hypericin (naftodiantron) ve hyperforindir (floroglusinol). Ayrıca ekstrakte edilebilen bileşiklerin yaklaşık %20'lik grubu biyolojik açıdan aktif olarak kabul edilmektedir (46, 49,50).



Şekil 8. Hypericin (a), hyperforin (b) kimyasal yapısı (Chapter 11, Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. 2011

2.9.1. *Hypericum perforatum* ve Depresyon

Dünyada nüfusun %3-5'inin depresyon tedavisi alması gerektiği bildirilmiştir. Depresyonun patofizyolojisinde normal beyin biyokimyasında bozulma olması gözlenir. Asetilkolin, norepinefrin, dopamin ve serotonin gibi amin nörotransmitter eksikliğinin neden olduğu göze çarpmaktadır. Antidepresanlar sinapslardaki yukarıda bahsedilen nörotransmitterlerin seviyelerini arttırmaları (51). *Hypericum perforatum* da bazı

mekanizmalarla bu nörotransmitterlerin seviyelerini yükseltir. Monoaminoksidaz enziminde inhibisyon yaparak amin nörotransmitterlerinin yıkımlarını engeller (79, 52). Farklı bir şekilde nörotransmitterlerin sinaptik aralıklardan geri alımını önleyerek sinaptik aralıktaki düzeylerini artırır (53, 54, 55).

2.9.2. Antibakteriyel ve Antiviral Özellik

H. perforatum içeriğinde bulunan hyperforinin antibakteriyel olduğu belirlenmiştir. Gram pozitif bakterilerin büyümesini inhibe ederken, gram negatiflerin böyle bir etkilenmesi gözlenmemiştir. Penisiline dirençli ve metisiline dirençli Staphylococcus aureus bakterisinin (MRSA) hyperforine duyarlı olması gözlenmiştir (56). H. perforatum içerisindeki hypericin, zarflı olan virüslere karşı virüsidal ama zarfsız olan virüslere üzerinde etkisiz olduğu gözlenmiştir (57). Hypericin, zarflı virüslere yaşam döngülerindeki değişik dönemlere etkisi olduğu görülmüştür (58).

2.9.3 Antikanser Özellik

Hyperforin, in vitro ortamda tümöral hücre gelişmesini inhibe etmektedir. Hücreler içinde sistein proteazları olan kaspaz aktivasyonunu sağlayarak proteolitik bölünme olayını tetikleyerek apoptoza neden olmaktadır. Bunlardan başka mitokondriyal sitokrom c salınmasını sağlayarak, mitokondriyal aktivasyon yoluyla da apoptoza neden olmaktadır ve tümör gelişmesini inhibe etmektedir (59). Hypericin; nöroblastom, glioma, adenom, mezotelioma, karsinom, melanom, sarkom ve lösemi şeklinde neoplastik olan dokulardan üretilen dokularda hücre gelişmesini durdurduğu gözlenmiştir (60).

2.9.4 Antioksidan ve Nöroprotektif Özellik

Yapılmış olan bazı çalışmalarda, H. perforatum ekstraktlarının oksidatif stresi azaltma yoluyla nörotoksisite, enflamasyon ve gastrointestinal sorunları önlediği gözlenmiştir. Hücrelerin hidrojen peroksit etkisiyle olan DNA fragmentasyonunu ve apoptozunu inhibe edebilmektedir (61). Bundan dolayı H. perforatum, parkinson ve Alzheimer gibi oksidatif stresten oluşan nörodejeneratif hastalıkların tedavilerinde de rol oynayabilir (62). Yapılmış olan bir çalışmaya göre, monoaminoksidaz-B (MAO-B) aktivasyonunu engelleyerek farelerde Parkinson hastalığına karşı nöroprotektif bir rol oynadığı görülmüştür (63). Ayrıca merkezi sinir sisteminde makrofaj rolü olan mikrogliya hücrelerinin yaşam ömrünü artırır (64).

Kronik kısıtlama stresine maruz bırakılmış olan sıçanlarda, *H. perforatum* verilen sıçanların pasif kaçınma davranışlarının hatırlanması kontrol grubuna göre daha yüksek olarak değerlendirilmiştir (65, 66, 67).

2.9.5 Anti-enflamatuar Etkinlik

Yapılmış olan çalışmalarda *H. perforatum* anti enflamatuar etki gösterdiği belirlenmiştir. *H. perforatum*la beslenmiş olan sıçanlarda kolonik inflamasyonla ilgili olan kan ve intestinal enzim seviyelerinde azalma saptanmıştır (68). Bir başka çalışmada *H. perforatum*'un ratlarda gastrik ülser insidansında azalma sağladığı görülmüştür (69). *H. perforatum* içerisindeki iki ana yağ özütü olan biapigenin ve quercetin yüksek düzeyde antiinflamatuar ve gastroprotektif etki oluşturmuştur (70). *H. perforatum* ekstraktlarında siklooksijenaz-2, interlökin 6 ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) şeklindeki proinflamatuar genlerin sayılarının artmasını engellediği görülmüştür (71). Başka çalışmada *H. perforatum* içeriğindeki hyperforinin inflamatuvar bir ajan olan prostaglandin E₂'nin (PGE₂) üretimini engellediği gözlenmiştir (72). Bunlar dışında başka bir çalışmada *H. perforatum*, farelerde asetik aside bağlı abdominal kasılma deneyine karşı opioide benzer şekilde antinosiseptif olarak etki ettiği gösterilmiştir. Bu durum, *H. perforatum*'un yoksunluk sendromuna neden olmadan opioid reseptörleri aktive edebilme rolünün olduğu göstermiştir (73). Yapılan diğer bir çalışmada, *H. perforatum*'un ratlarda opioid çekilme semptomlarında azalma sağladığı görülmüştür. Böylelikle *H. perforatum*'un insanlarda opioid bağımlılığının tedavisinde kullanma fikri gündeme gelmiştir (74).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışma Planı ve Cerrahi Teknik

Çalışmamız Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (ADÜ-HADYEK) 2020 Yılı II. Oturum 64583101.2020.024 sayılı onayı alındıktan sonra, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesinden temin edilen deneklerle Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları laboratuvarında gerçekleştirildi.

Denek olarak 16-20 haftalık, 500±100 gram arasında değişen 27 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ortam sıcaklığı 23-24 °C ve ortam nemi %60-65 arasında olması sağlandı. Çalışma boyunca ratlara limitsiz olacak şekilde musluk suyu (ad libitum) ve standart kemirgen yemi verildi. Hayvanlar 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta kalacak şekilde takip edildiler. Hayvanlar rastgele olarak deney ve kontrol gurubu olarak önce ikiye ayrıldı, daha sonra deney grubu düşük doz tedavi ve yüksek doz tedavi grubu olarak ikiye ayrıldı. Toplamda 3 gruba ayrılarak her bir kafeste 2 hayvan olacak şekilde laboratuvar ortamında preoperatif 1 hafta izlendiler. Her 3 grupta olan ratlara sağ femur açık kırık modeli oluşturuldu. İki adet rat anestezi komplikasyonu nedeni ile ex oldu çalışmadan çıkarıldı. Rastgele seçilmiş olan ratlarla kontrol grubunda 7 rat, düşük doz tedavi grubunda 8 rat ve yüksek doz tedavi grubunda 8 rat olmak üzere çalışma yapıldı. *Hypericum perforatum* ekstraktı kapsüller açılıp iyice dövüldükten sonra günlük içme suyuna karıştırılarak düşük doz tedavi grubuna 50mg/kg- 28 gün boyunca verildi. Yüksek doz tedavi grubuna ise 200mg/kg *Hypericum perforatum* ekstraktı verildi. Ratların, ekstraktın karıştırılmış olduğu içme suyunu tamamen bitirdiklerinden emin olundu. Çalışma öncesi ve sakrifikasyondan önce ratlar tartıldı ve ağırlık değişimleri kaydedildi.

3.2. Çalışma Grupları

GRUP 1: Osteotomi grubu (n=7): Sadece osteotomi+fiksasyon

GRUP 2: Düşük doz tedavi grubu (n=8): Osteotomi+fiksasyon + *Hypericum perforatum* (50mg/kg) Oral (içme suyuna karıştırılarak)

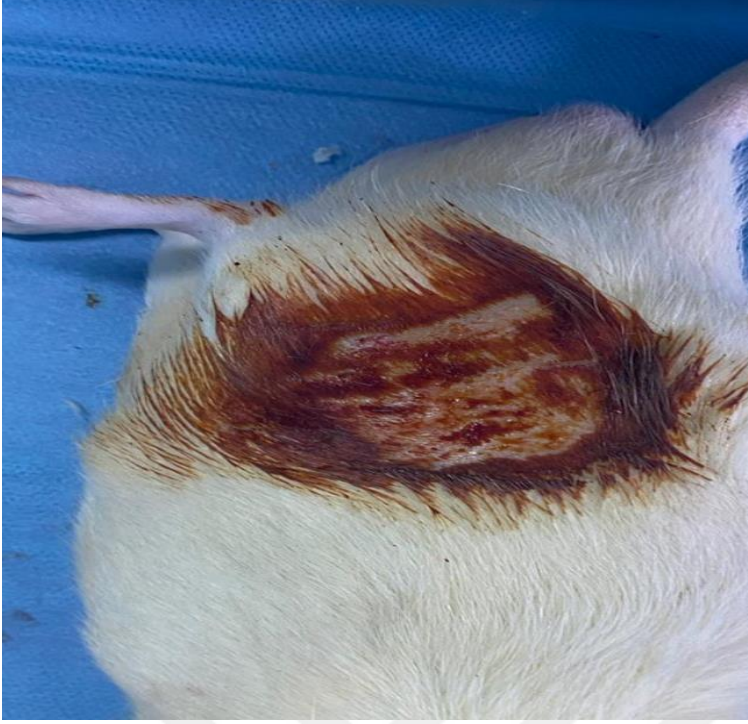
GRUP 3: Yüksek doz tedavi grubu (n=8): osteotomi+fiksasyon + *Hypericum perforatum* (200mg/kg) oral (içme suyuna karıştırılarak)

Tablo I. Gruplar

	Grup ADI	İşlem	Sonlandırma
Kontrol	GRUP 1	<i>Sadece osteotomi+fiksasyon</i>	28.gün
Düşük doz tedavi grubu	GRUP 2	<i>osteotomi+fiksasyon+düşük doz tedavi</i>	28.gün
Yüksek doz tedavi grubu	GRUP 3	<i>osteotomi+fiksasyon+yüksek doz tedavi</i>	28.gün

3.3. Kırık Modeli Oluşturulması

Cerrahi yöntem olarak ratlar yan pozisyonunda pozisyon verildikten sonra cerrahi saha tıraş edilip Betadine scrub (10% povidoneiodine, Merkez-Türkiye) solüsyonu ile lokal alan temizliği yapılarak ratlarda steril alan oluşturuldu, uygun saha temizliğinden ve sonra sağ uyluk cildi lateralden longitudinal insizyon ile yaklaşık olarak 2 cm açıldı. Fasya geçilip ve kas yapılarına ulaşılarak femur diyafizinin ortasına gelecek şekilde yumuşak dokular kemikten sıyrıldı ardından femurun orta 1/3'lük diyafiz kısmı motor (Maxstar dremel kesme seti -0.8mm kesme ucu), yardımıyla osteotomize edildi. Osteotomi hattından distale doğru antegrad olarak 1 mm'lik Kirschner teli diz hiperfleksiyondayken ilerletilerek, patellar ligamentin medialinden çıkması sağlandı. Ardından Kirschner teli distale doğru çekilip ve kırık hattı redükte edildikten sonra retrograd olarak proksimale doğru ilerletildi. Sonrasında sertleştiği yerde yaklaşık 2-3 mm ilerletilip geri çekilerek tel makasıyla diz bölgesinden kesildi ve sonra tamamının gömülmesi için başka bir telin ucuyla tekrar ilerletilerek fiksasyon tamamlandı. (Resim 1-2-3-4) Cilt 3/0 prolen ile kapatıldı. Sonrasında yara yeri batikon ile temizlenerek işlem sonlandırıldı. Ağrı kesici olarak işlem sonrası tüm ratlara 10 mg/kg tramadol intraperitoneal verildi. Anestezinin etkisi geçtikten sonra, ratların kırık ekstremitesine yük vermesinde herhangi bir kısıtlama olmadı.



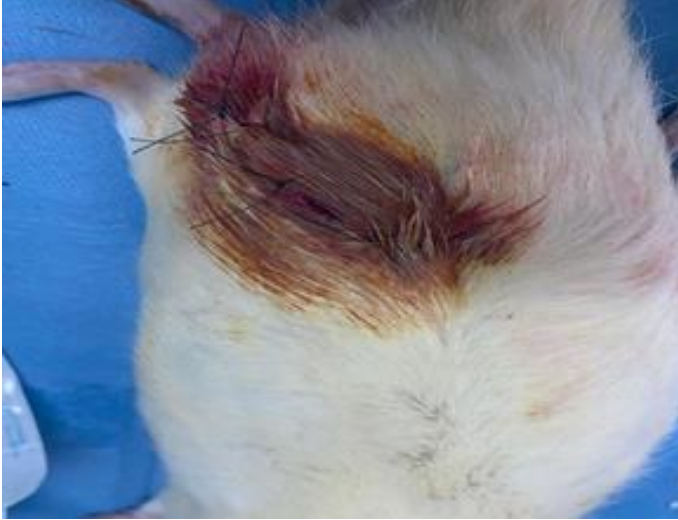
Resim 1. Cerrahi saha temizliği



Resim 2. Cilt İnsizyonu



Resim 3. k teli gönderilmesi



Resim 4. Yaranın kapatılmış son hali

Operasyon sonrası direk radyografler çekildi. Radyolojik olarak, kırık ve intramedüller k teli doğrulandı. (Şekil 5, şekil 6)



Resim 5. Fiksasyon doğrulanması 1



Resim 6. fiksasyon doğrulanması 2

3.4. İlaç Uygulaması

St. John's Wort Herb Extract kapsül (BALEN İstanbul, Turkey) hayvanlara operasyonu izleyen günün sabahı başlanarak 28 gün boyunca düşük doz tedavi (50mg/kg) ve yüksek doz tedavi (200 mg/kg) olmak üzere kapsüller açılarak içerikleri iyice dövüldükten sonra içme suyuna tortu kalmayacak şekilde karıştırılarak hazırlandı. İçme suyu tamamının bitirildiğinden ve içinde artık kalmadığından emin olunarak verildi. (1). Bunun için, Her hafta pazartesi sabah sıçanlar tartıldı, haftalık kilo değişimine göre kafes suyu ve HP dozu ayarlandı, her gün sabah hayvanların tüm suyu içtiklerinden emin olundu. 28 günlük bir uygulama olmasından dolayı da, ösefagus zedelenmesi ve aspirasyon endişesi nedeniyle oral gavaj tercih edilmemiştir.

3.5. Deneilerin Sonlandırılması

Deney gruplarındaki ratlar ve kontrol grubundaki ratlar sırayla 28 gün sonunda anestezi verildikten sonra servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edilmesiyle deneyler sonlandırıldı. Bacaklar ratlardan diz seviyesinde ampute edilip kas ve yumuşak dokularından sıyrıldıktan sonra %5 lik formol içinde saklandı. Ardından gruplar halinde radyolojik görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonrası femur içindeki teller çıkarıldıktan sonra yine gruplar halinde patolojiye verildi.

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Rat bacaklarında inceleme sırası bu şekilde yapıldı:

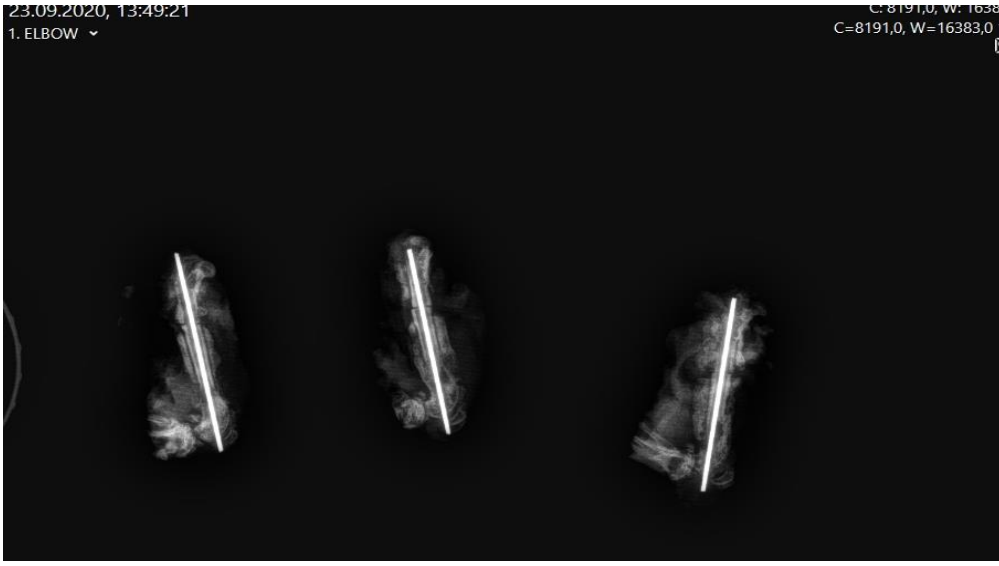
1. Radyolojik inceleme
2. Histopatolojik inceleme

3.6.1. Radyolojik İnceleme

Radyolojik değerlendirme için 4.hafta sonunda direkt grafi çekimleri yapıldı. Kalça ve diz eklemlerinden dezartiküle edilen sağ femurlar yumuşak dokularından kabaca sıyrıldıktan sonra röntgen kasetlerine yerleştirilerek ön-arka ve yan planda direkt radyografileri çekildi. Grafilerin hangi gruba ait oldukları belirtilmeden iki ayrı ortopedi ve travmatoloji uzmanı tarafından değerlendirildi. Sonuçlar Lane-Sandhu'ya göre değerlendirildi (75).

Tablo II. Lane-Sandhu Skorlaması

Skor	Radyolojik bulgular
0	İyileşme yok
1	Kallus formasyonu
2	Kaynama başlangıcı
3	Kırık hattının kaybolmaya başlaması
4	Tam kaynama



Resim 7. Post operatif 28.gün örnekler



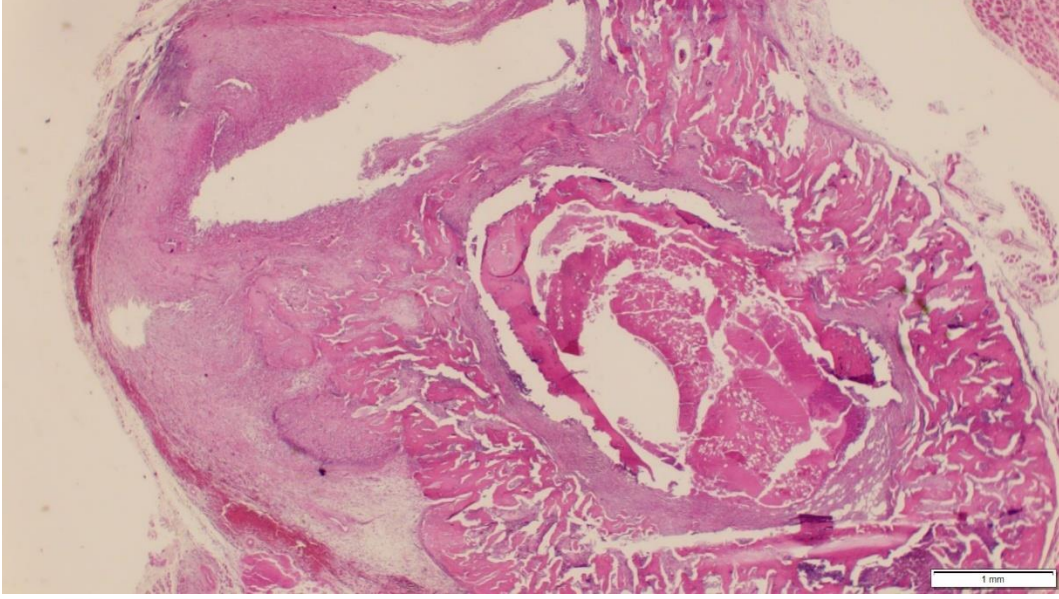
Resim 8. Post operatif 28.gün tüm gruplar

3.6.2. Histopatolojik İnceleme

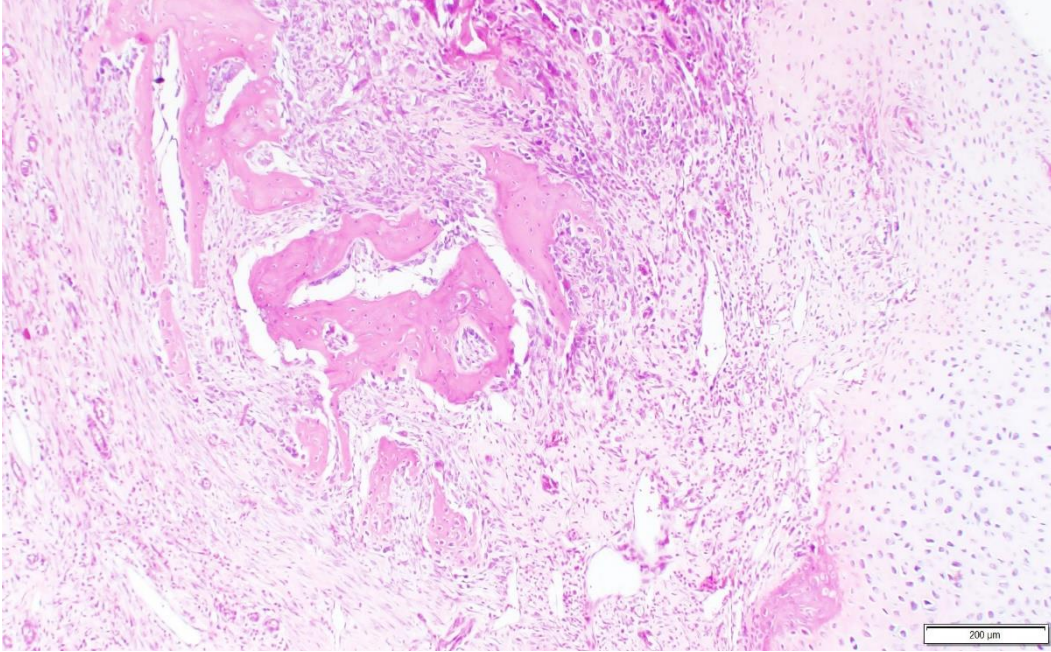
Histopatolojik inceleme için kontrol grubu, düşük doz ilaç grubu ve yüksek doz ilaç verilen grupların kırık bölgesini içeren bölümler %10'luk formaldehit solüsyonuna saklandı. Takiben %10'luk formik asit solüsyonu içinde dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler dehidrasyonu takiben parafin bloklara gömüldü. Rutin takip işlemleri sonrası 4 µm lik kesitler alınarak Hemotoksilen-Eozin (HE) ve Masson's Trikrom histokimyasal boyaması uygulandı ve ışık mikroskopunda incelendi. İyileşmenin histolojik olarak sınıflaması Huo ve arkadaşlarının yayınladığı kırık iyileşmesinin histolojik skalasına göre yapıldı (76). (Tablo III)

Tablo III. Kırık iyileşmesinin histolojik değerlendirilmesinde skorlama sistemi

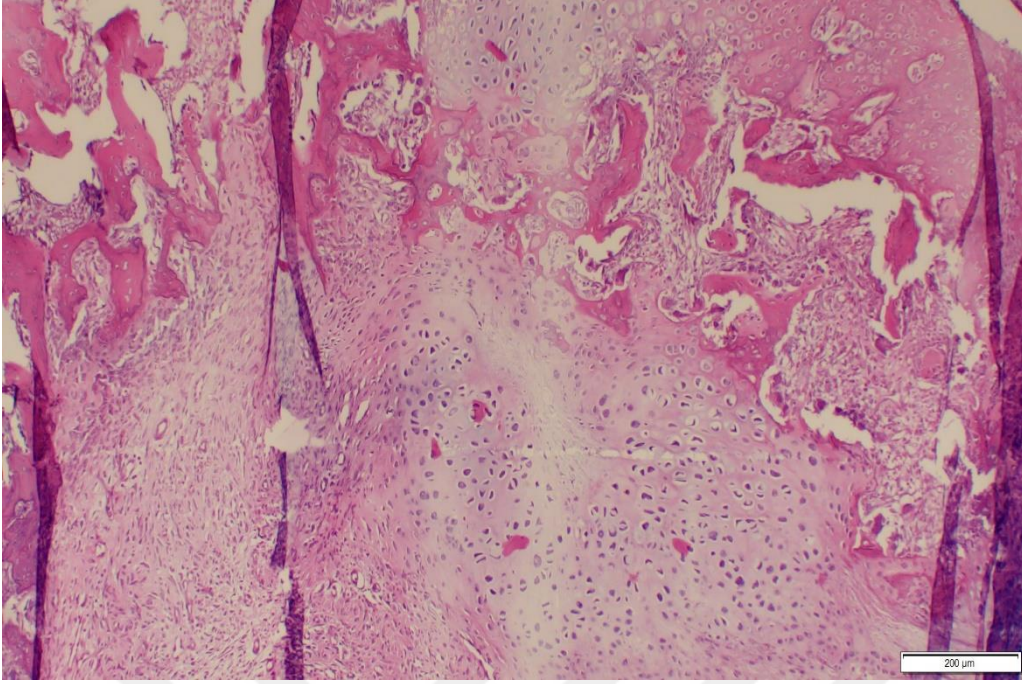
Skor	Kırık bölgesi histolojik bulguları
1	Fibröz doku
2	Ağırlıklı fibröz doku ve az oranda kıkırdak doku
3	Eşit miktarda fibröz doku ve kıkırdak doku
4	Kıkırdak doku
5	Ağırlıklı olarak kıkırdak ve az miktarda immatür (woven) kemik
6	Eşit oranda kıkırdak ve immatür kemik
7	Ağırlıklı olarak immatür kemik ve az oranda kıkırdak
8	Tamamen İmmatür (woven) kemik
9	İmmatür kemik ve az miktarda matür kemik
10	Matür (lamellar) kemik



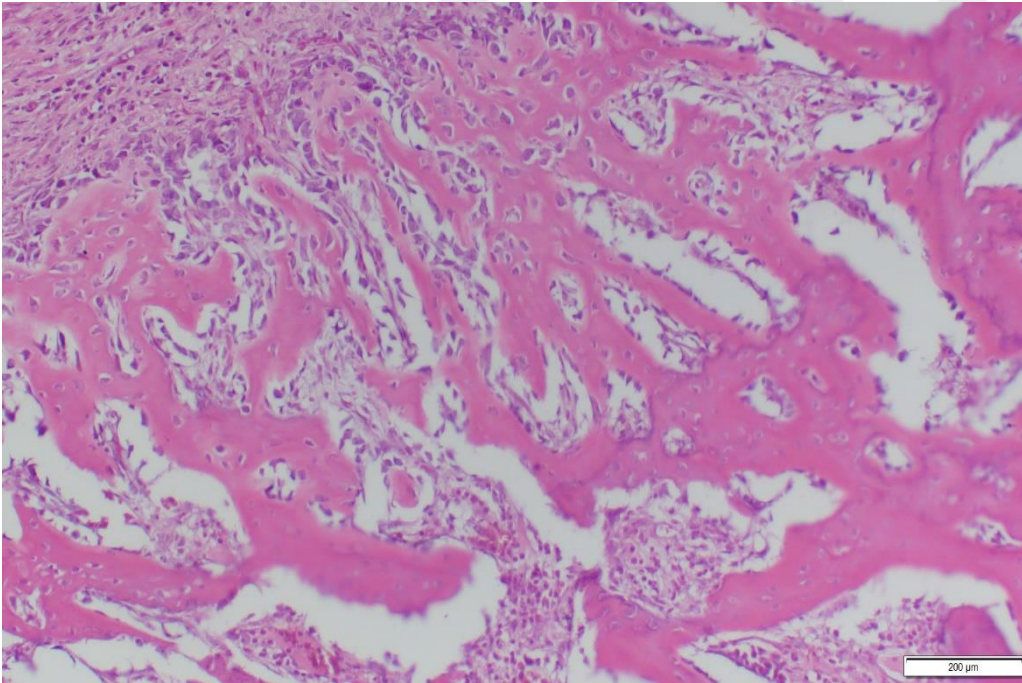
Resim 9. (x20, HE) Kontrol grubundan örnek, santralde nekrotik kemik doku, çevresinde yeni woven kemik ve artmış bağ doku



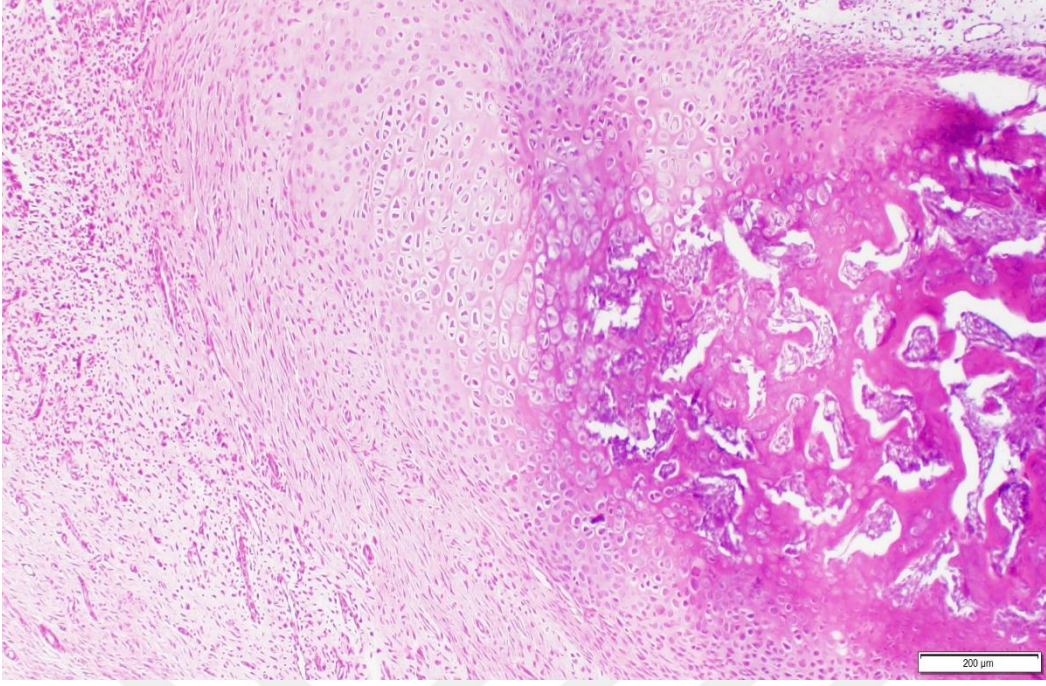
Resim 10. (x100, HE): Kontrol grubundan diğer bir örnek, sağda kıkırdak doku ve yanında yeni olgunlaşmış woven kemik



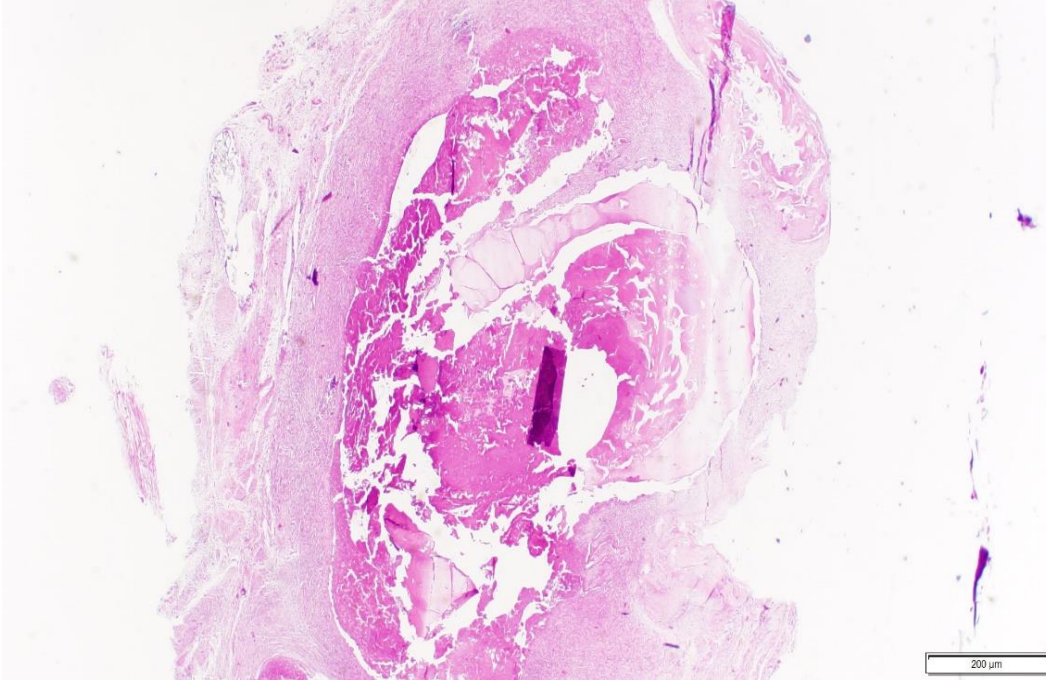
Resim 11. (x100, HE) Düşük doz ilaç verilen gruptan örnek, ağırlıklı olarak olgunlaşmış kemik ve kıkırdak doku.



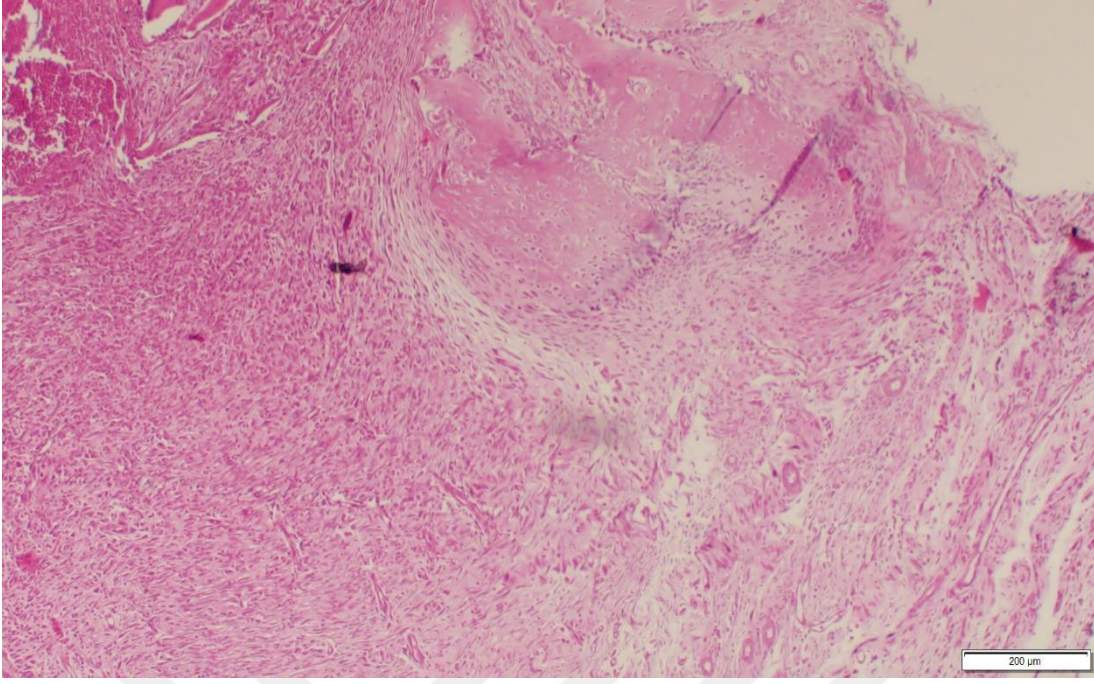
Resim 12. (x200, HE): Düşük doz ilaç verilen gruptan başka bir örnek. Sağ altta nekrotik kemik doku ve onun devamlılığında reaktif osteoblastlarla çevrili olgunlaşmamış kemik doku.



Resim 13. (x100, HE): Yüksek doz ilaç verilen gruptan örnek. Santralde kıkırdak doku ve devamlılığında encondral ossifikasyon.



Resim 14. (x20, HE): Yüksek doz ilaç verilen gruptan örnek. Nekrotik kemik dokular.



Resim 15: (x100, HE): Yüksek doz ilaç verilen gruptan örnek. Yeni wovenkemik doku.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS statistics 22 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Betimleyici istatistiklerden ortalama ve standart sapma kullanılmıştır. Her bir veri grubunun normal dağılıma uygunluk gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen gruplarda Kruskal Wallis testi, normal dağılıma uygunluk gösteren grupların karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulanmış ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Radyolojik Bulgular

Düşük ve yüksek doz olmak üzere Hypericum Perforatum uygulanan ilaç grubu ve uygulanmayan kontrol grubundaki ratlar 28. günde anestezi uygulanması sonrası servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edildiler. Kalça ve diz eklemlerinden dezartiküle edilen sağ femurlar yumuşak dokularından kabaca sıyrıldıktan sonra röntgen kasetlerine yerleştirilerek ön-arka ve yan planda direkt radyografileri çekildi. Tüm grafipler Lane ve Sandhu sınıflamasına göre deneyden bağımsız iki ayrı ortopedist tarafından skorlandı (75,94). Öncelikle 1.ortopedist tarafından puanlandırma yapılan AP, lateral ve AP+lateral grafipler değerlendirildi. AP ve lateral grafi ortalama skorları ayrı hesaplandı. Ardından AP+lateral grafi toplam skoru hesaplandı.

1.ortopedist tarafından yapılan tüm istatistik sonuçlarında düşük doz ilaç grubu, yüksek doz ilaç grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı($p>0,05$).

Ardından 2.ortopedist tarafından değerlendirilmiş olan AP, lateral ve AP+lateral grafipler skorlarının istatistik verileri hesaplandı. 2.ortopedist değerlendirmesinin sonuçlarında da düşük doz ilaç grubu, yüksek doz ilaç grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo IV. 1. Ortopedist AP Radyolojik değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	1	1	1
2	1	2	3
3	0	3	1
4	2	2	3
5	3	2	2
6	2	1	1
7	3	1	1
8		3	3
Ortalama	1,714	1,875	1,875

Tablo V. 1. Ortopedist Lateral Radyolojik Değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	2	2	1
2	2	1	1
3	0	1	1
4	1	1	2
5	3	1	3
6	2	2	1
7	2	1	1
8		2	2
Ortalama	1,714	1,375	1,5

Tablo VI. 2. Ortopedist AP radyolojik değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	2	1	1
2	1	1	3
3	0	3	1
4	2	2	4
5	3	3	2
6	1	2	1
7	3	1	1
8		3	3
Ortalama	1,714	2	2

Tablo VII. 2. Ortopedist Lateral Radyolojik Değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	1	1	1
2	2	2	1
3	0	1	1
4	1	1	2
5	2	1	2
6	2	1	2
7	2	1	1
8		2	3
Ortalama	1,428	1,25	1,625

Tablo VIII. 1. Ortopedist AP+LATERAL değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	3	3	2
2	3	3	4
3	0	4	2
4	3	3	5
5	6	3	5
6	4	3	2
7	5	2	2
8		5	5
Ortalama	3,428	3,25	3,375

Tablo IX. 2.Ortopedist AP+LATERAL değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	3	2	2
2	3	3	4
3	0	4	2
4	3	3	6
5	5	4	4
6	3	3	3
7	5	2	2
8		5	6
Ortalama	3,142	3,25	3,625

Tablo X. 1.Ortopedist radyolojik skorları

Gruplar	AP	P*	LATERAL-P*	AP+LATERAL SKOR
Kontrol grubu	1,714±1,029		1,714±0,879	3,429±1,76
Düşük doz ilaç grubu	1,875±0,097		1,375±0,433	3,25±0,741
Yüksek doz ilaç grubu	1,875±0,828		1,5±0,632	3,375±1,258
P*	0,960		0,555	0,874

* Kruskal-Wallis varyans analizi

Tablo XI. 2.Ortopedist radyolojik skorları

Gruplar	AP	P*	LATERAL-P*	AP+LATERAL SKOR
Kontrol grubu	1,714±1,029		1,429±0,729	3,142±1,55
Düşük doz ilaç grubu	2±0,774		1,25±0,387	3,25±0,865
Yüksek doz ilaç grubu	2±0,999		1,625±0,622	3,625±1,409
P*	0,880		0,538	0,953

* Kruskal-Wallis varyans analizi

Tablo XII. 1.ve 2. Ortopedist AP Radyolojik değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	1.5	1	1
2	1	1.5	3
3	0	3	1
4	2	2	3.5
5	3	2.5	2
6	1.5	1.5	1
7	3	1	1
8		3	3
Ortalama	1,714	1,937	1,937

Tablo XIII. 1.ve 2. Ortopedist Lateral Radyolojik Değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	1.5	1.5	1
2	2	1.5	1
3	0	1	1
4	1	1	2
5	2.5	1	2.5
6	2	1.5	1.5
7	2	1	1
8		2	2.5
Ortalama	1.571	1.313	1.563

Tablo XIV. 1.ve 2.ortopedist AP+LATERAL değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	3	2.5	2
2	3	3	4
3	0	4	2
4	3	3	5.5
5	5.5	3.5	4.5
6	3.5	3	2.5
7	5	2	2
8		5	5.5
Ortalama	3,285	3,25	3,5

Tablo XV. 1 ve 2.ortopedist radyolojik skorlarının ortalaması

Gruplar	AP SKOR	LATERAL SKOR	AP+LATERAL SKOR
Kontrol grubu	1,714±0,994	1,571±0,775	3,286±1,643
Düşük doz ilaç grubu	1,938±0,687	1,313±0,311	3,25±0,774
Yüksek doz ilaç grubu	1,938±0,907	1,563±0,567	3,5±1,303
	P*0,952	P*0,878	P^ 0,934
	* Kruskal-Wallis varyans analizi	* Kruskal-Wallis varyans analizi	^Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)

4.2. Histopatolojik Bulgular

Radyolojik incelemenin ardından hazırlanan preparatlar Huo ark.'nın tarif ettikleri kriterlere göre histopatolojik olarak değerlendirildi (76). Kontrol grubu, düşük doz ilaç grubu ve yüksek doz ilaç grubunun skorları hesaplanarak istatistiksel analiz yapıldı. Gruplar arasında kemik iyileşmesinde histolojik olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

Tablo XVI. Histopatolojik değerlendirme

HAYVAN	KONTROL GRUBU	DÜŞÜK DOZ İLAÇ GRUBU	YÜKSEK DOZ İLAÇ GRUBU
1	9	8	8
2	9	9	9
3	8	9	8
4	10	9	9
5	9	9	9
6	9	9	8
7	10	8	8
8		9	9
Ortalama	9,142	8,75	8,5

Tablo XVII. Tüm grupların histolojik skorları

Gruplar	Histolojik skorlar	P*
Kontrol grubu	9,1429±0,638	0,138
Düşük doz ilaç grubu	8,75±0,387	0,138
Yüksek doz ilaç grubu	8,5±0,447	0,138

* Kruskal-Wallis varyans analizi

5. TARTIŞMA

2015 yılında Mı-kyoung You ve ark.Hypericum perforatum ile yaptıkları bir çalışmada MG-63 hücre proliferasyonunu ve ERA ve ER β ekspresyonunu arttırdığını ve ALP, OC ve OPG'nin gen ekspresyonları üzerinde pozitif etki gösterdiğini ve ayrıca trabeküler kemik kaybında yavaşlama ile ilişkili kemik üzerinde östrojen benzeri bir etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır(2). Başka bir çalışmada 2017 yılında Damlar I ve ark.Kemik greft iyileşmesinde histomorfometrik bir çalışma yaparak pozitif yönde etkili olduğunu göstermişlerdir(3).

Literatürdeki başka bir çalışmada Uğur Y. ve ark. 2019 yılında yara iyileşmesi açısından rat korneası üzerinde alkali yanıklarla ilgili yapılan çalışmada Hypericum perforatum anti-enflamatuar, anti-anjiyojenik ve anti-fibroblastik etkilere sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir (4).2017 yılında gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, Uslusoy ve arkadaşları rat sinir hasarı modeli üzerinde bir çalışma yaparak, Hypericum perforatum'un; sinir hasarına bağlı oluşan inflamatuvar, apoptotik, oksidatif hasara karşı nöroprotektif etki sağladığını ortaya koymuşlardır (5).

Literatüre bakıldığında Hypericum perforatum'un kırık iyileşmesine doğrudan etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Biz de bu çalışmalar ışığında standardize edilmiş bir kemik kırık modeli oluşturarak, Hypericum perforatum'un kırık iyileşmesine etkisini histolojik ve radyografik olarak değerlendirerek etkisi olup olmadığını araştırmak için bu çalışmayı yapmaya karar verdik.

Çalışmamız 3 grup olup, kontrol grubu ve 2 farklı dozda ilaç grubu olarak ayrıldı. Bu çalışmamızda açık kırık modeli yapıldıktan sonra intramedüller k teli yerleştirilmesi şeklinde model kullanılmıştır. Kırık oluşturma yöntemlerine bakıldığında literatürde farklı metotlar uygulandığı görüldü. Kapalı basit kırık, açık osteotomi şeklinde kırık, segmental kırık modelleri ve kaynamama modeli kullanılabilir. Literatürdeki birçok çalışmada kapalı kırık modeli kullanılmasına karşın, kaynamamaya yatkınlık oluşturması ve geç kaynamaya sebep olması nedeniyle açık osteotomi, araştırılan yöntemin etkinliğini göstermede daha başarılı bulunmuştur (77, 78).

Kırık iyileşmesi ile ilgili yapılmış çalışmalarda fare, rat, tavşan, köpek gibi çeşitli hayvanlar kullanılmıştır (79, 80). Çalışmamızda denek sayısının fazla olması, kolay temin edilebilirliği, şartlara hızlı uyum sağlaması ve enfeksiyona dirençli olmaları, izogenetik

olmaları temin edilebilme kolaylığı, ucuz olmaları, büyük hayvanlara göre daha kolay manipüle edilmeleri, daha fazla örnek alınabilmesi, fizyolojileri hakkında yeterli kaynak bulunabilmesi gibi avantajları nedeniyle rat kullandık. Literatürde de benzer çalışmaların çoğunlukla ratlar üzerinde yapılmış olduğu görülmektedir (79).

Radyolojik değerlendirme için literatürde çok farklı yöntemlerin kullanıldığını gördük. Bu çalışmalarda direkt grafilerle kırık uçları arasındaki köprüleşme durumu değerlendirilmişti. Çeşitli ölçüm teknikleri ile kallus boyutları ölçülmüş ve puanlama sistemleri kullanılmıştı. Biz çalışmamızda Lane ve Sandhu" nun radyolojik skorlamasını uyguladık (75, 81) Ancak değerlendirmelerin kırık iyileşmesini değerlendirmede yeterince objektif olmadığı ve kişiden kişiye farklılık gösterdiği yönünde bilgiler vardır. Bu nedenle radyolojik değerlendirme sırasında birbirinden habersiz iki farklı ortopedistin kendilerine verilen skorlamaya göre yaptıkları değerlendirmelerin ortalamalarını aldık. Sonuçların histolojik değerlendirmemize bir destek olabileceği düşündük.

Kırık iyileşmesinin histopatolojik değerlendirilmesinde literatürde çeşitli sınıflamalar kullanılmıştır. Allen ve ark. histopatolojik olarak 5 evre bildirmişlerdir(82, 83). Bu konuda daha ayrıntılı bir yöntem olan Huo ve ark. Tarafından tanımlanan evreleme sistemi histopatolojik olarak kırık iyileşmesini 10 evreye ayırmıştır(76). Biz çalışmamızda Huo ve ark. Tarafından tanımlanan evreleme sistemini kullanarak bu sistemin daha ayrıntılı ve daha kesin sonuç vereceği kanısındayız.

Çalışmamızda yapılan istatistiklerde 1.ortopedist ve 2.ortopedist tarafından yapılan AP, lateral, AP+lateral grafi skorlamasında değerlendirme sonuçları ayrı ayrı skorlanmıştır. 1. ortopedist tarafından yapılmış olan skorlamalar hesaplandığında düşük doz ilaç grubu ve yüksek doz ilaç grubu ortalamaları kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır fakat istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır. Bunun yanında yüksek doz ilaç grubu skorlamasının ortalaması düşük doz ilaç grubu skorlamasının ortalamasından daha yüksek olduğu saptanmıştır fakat istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Buna paralel olarak 2.ortopedist tarafından değerlendirme sonuçları da benzer sonuçlanmıştır.2. ortopedist tarafından yapılmış olan skorlamalar hesaplandığında düşük doz ilaç grubu ve yüksek doz ilaç grubu ortalamaları kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır fakat istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır. Bunun yanında yüksek doz ilaç grubu skorlamasının ortalaması düşük doz ilaç grubu skorlamasının ortalamasından daha yüksek olduğu saptanmıştır fakat istatistiksel

açıdan anlamlı değildir. Ayrıca her iki ortopedistin ortalama radyolojik skorlamasından elde edilen istatistiksel sonuçlar 1. ve 2. Ortopedist skorlamaları ile uyumlu ve paralel olarak sonuçlanmıştır.

Histolojik olarak yapılan değerlendirme sonrasında ortalama skor kontrol grubunda daha yüksek olarak çıkmıştır. İstatistiksel açıdan histopatolojik inceleme sonucunda anlamlı fark saptanmamıştır. Radyografi skorlama sisteminin histolojik sınıflama sistemiyle uyumsuzluk göstermesi Lane ve Sandhu'nun skorlama sisteminin yetersizliğinden veya sübjektifliğinden kaynaklanıyor olabilir.



6. SONUÇ

Çalışmamızın sonucunda radyolojik ve histopatolojik testlerden elde edilen verilere göre Hypericum perforatum'un kırık iyileşmesi üzerinde istatistiksel olarak olumlu ya da olumsuz bir etkisi gösterilemedi.

Bu çalışmada Lane ve Sandhu kırık kaynaması radyolojik skora sisteminin histolojik verilerle paralellik göstermeyebileceği görülmüştür.



ÖZET

HYPERİCUM PERFORATUM'UN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ: (DENEYSEL ÇALIŞMA)

Amaç: Günümüzde, kırık iyileşmesinin incelenmesinde ve farklı cerrahi yöntemler ve medikal tedavilerin etkinliğinin araştırılmasında rat standart kırık modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde, standart kırık modeli oluşturulup iyileşmesi incelenen çok sayıda çalışma mevcut olmasına karşın, *Hypericum perforatum*'un (HP) kırık iyileşmesi üzerine olan etkilerini araştıran deneysel çalışma sayısı oldukça yetersiz olup, bu konu henüz tüm yönleriyle değerlendirilebilmiş değildir. Bu nedenle, bu deneysel çalışmada, *Hypericum perforatum*'un kırık iyileşmesine etkisinin radyolojik ve histopatolojik olarak araştırılması hedeflenmektedir.

Gereç ve yöntem: Aydın Adnan Menderes Üniversite ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deney Laboratuvarı ve Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğinde 25 adet Sprague Dowley 500-600 gr. Ağırlığında erkek rat Kontrol ve Deney (*Hypericum perforatum* düşük ve yüksek doz) grubu olarak üç gruba ayrılmıştır. Genel anestezi altında tüm ratların sağ femurlarında standart açık cisim kırıkları oluşturulmuştur. Kırık sonrası aynı günden başlamak üzere hayvanlar sakrifiye edilene kadar deney gruplarına düşük doz grubuna 50mg/kg/gün ve yüksek doz grubuna 200mg/kg/gün oral *Hypericum perforatum* içeren Sarı Kantaron Ekstraktı-St. John's Wort Kapsül (Balen, Türkiye) uygulanmıştır (1). Kırık oluşturulmasından 28 gün sonra sakrifiye edilerek, kaynama dokuları radyolojik, histopatolojik olarak incelenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda 1.ortopedist ve 2.ortopedist tarafından değerlendirilmiş olan AP, lateral, AP+lateral grafilerin skorlamalarının istatistiksel çalışması yapıldı. Düşük ve yüksek doz ilaç grubu skorlamasının ortalaması kontrol grubu skorlamasının ortalamasından daha yüksek olduğu saptanmıştır fakat istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0,05$).

Histolojik olarak yapılan değerlendirme sonrasında ortalama skor kontrol grubunda daha yüksek olarak çıkmıştır. İstatistiksel açıdan histopatolojik inceleme sonucunda anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç: Çalışmamızın sonucunda radyolojik ve histopatolojik testlerden elde edilen verilere

göre *Hypericum perforatum*'un kırık iyileşmesi üzerinde istatistiksel olarak olumlu ya da olumsuz bir etkisi gösterilemedi.

Bu çalışmada Lane ve Sandhu kırık kaynaması radyolojik skora sisteminin histolojik verilerle paralellik göstermeyebileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum perforatum*, Kırık, Kırık iyileşmesi



ABSTRACT

THE EFFECTS OF HYPERICUM PERFORATUM ON FRACTURED BONE HEALING IN RATS (AN EXPERIMENTAL STUDY)

Aim: Nowadays, rat standard fracture models are widely used in the investigation of fracture healing and the effectiveness of different surgical methods and medical treatments. In the literature, although there are many studies in which a standard fracture model was created and healing was examined, the number of experimental studies investigating the effects of Hypericum perforatum (HP) on fracture healing is quite insufficient, and this issue has not yet been evaluated in all aspects. Therefore, in this experimental study, it is aimed to investigate the effect of Hypericum perforatum on fracture healing radiologically and histopathologically.

Materials and methods: In Aydın Adnan Menderes University and Research Hospital Animal Experiment Laboratory and Orthopedics and Traumatology Clinic, 25 Sprague Dowley male rats weighing 500-600 g were divided into three groups as Control and Experiment (Hypericum perforatum low and high dose). Standard open fractures were created in the right femurs of all rats under general anesthesia. Starting from the same day after the fracture, until the animals were sacrificed, St. John's Wort Extract-St. St. John's Wort Capsules (Balen, Turkey) was applied (1). They were sacrificed 28 days after fracture formation, and the union tissues were examined radiologically and histopathologically.

In the statistics performed in our study, the evaluation results here were scored in the AP, lateral AP + lateral graph scoring by the 1st orthopedist and the 2nd orthopedist. The average of low and high dose drug group scoring was found to be higher than the average of the control group, but it was not statistically significant ($p > 0.05$).

After the histological evaluation, the mean score was higher in the control group. But statistically, no significant difference was found as a result of histopathological examination ($p > 0.05$).

Findings: In our study, a statistical study of the scoring of AP, lateral, AP + lateral radiographs evaluated by the 1st orthopedist and the 2nd orthopedist was performed. The average of low and high dose drug group scoring was found to be higher than the mean of the

control group, but it was not statistically significant ($p > 0.05$).

After the histological evaluation, the mean score was higher in the control group. Statistically, no significant difference was found as a result of histopathological examination ($p > 0.05$).

Conclusion: As a result of our study, according to the data obtained from radiological and histopathological tests, a statistically positive or negative effect of *Hypericum perforatum* on fracture healing could not be demonstrated.

In this study, it was observed that Lane and Sandhu fracture union radiological scoring system may not be in parallel with histological data.

Key Words: *Hypericum perforatum*, Fracture, Fracture healing

KAYNAKLAR

- 1- Demirci B, Kahyaoğlu F, Atakul T, Yılmaz M, Özoran Y. Detrimental effect of *Hypericum perforatum* on ovarian functions Epub 2018 May 14. J Turk Ger Gynecol Assoc
- 2- You MK, Kim DW, Jeong KS, Bang MA, Kim HS, Rhuy J, Kim HA. Nutr Res Pract. 2015 Oct;9(5):459-65. doi: 10.4162/nrp.2015.9.5.459. Epub 2015 Jul 2.
- 3- Damlar I, Arpağ OF, Tatlı U, Altan A. Effects of *Hypericum perforatum* on the healing of xenografts: a histomorphometric study in rabbits. Br J Oral Maxillofac Surg. 2017 May;55(4):383-387. doi: 10.1016
- 4- Uğur Yılmaz, Hüseyin Kaya, Murat Turan, Ferda Bir, Barbaros Şahin Investigation the effect of *Hypericum perforatum* on corneal alkali burns Epub 2019 Jun 19.
- 5- Fuat Uslusoy, Mustafa Nazıroğlu, İshak Suat Oveyand Tolga Taha Sonmez. *Hypericum Perforatum* L. Supplementation Protects Sciatic Nerve Injury-Induced Apoptotic, Inflammatory and Oxidative Damage To Muscle, Blood and Brain In Rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology, (2017) May 16.
- 6- Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi: 1-4, 2006
- 7- Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi: 5-11, 2006
- 8- Aydın B K. Pentoksifilin kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Baltalimanı Metin Sabancı Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 1.Ortopedi ve Travmatoloji 2007
- 9- Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi: 16, 2006
- 10- Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'ın Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi: 12, 2006

- 11- Serinoglu S. Mikroskopik düzeyde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2002; 55(2): 143-150.
- 12- Browner BD, J.M., Levine AM, Trafton MD., Skeletal Trauma. 1997. p. s51.
- 13- Ege R. Travmatoloji-Kırıklar, eklem ve diğer yaralanmalar. Cilt 1, 5. baskı. Ankara (35-55); 2001
- 14-Lieberman Jay R. MD, Bone Regeneration and Repair Rewiew of Orthopaedics: 254-263, 2007
- 15- Canale TS. Campbell's Operative Orthopaedics 11. Basım Türkçe Basım,2688, 2010
- 16- Junqueira, L.C. J. Carneiro, and R.O. Kelley, Basic Histology (8.th edition). 1995. p. 132-151.
- 17-Schenk, R. Biology of fracture repair. Skeletal trauma, 1992. 1: p. 31-75.
- 18- Ortega, N. D.J. Behonick, and Z. Werb, Matrix remodeling during endochondral ossification. Trends in cell biology, 2004. 14(2): p. 86-93.
- 19- Mark, D.M. and R.T. Stephen, Miller's Review of Orthopaedics. 2016. p. 1-20.
- 20- KILIÇOĞLU, S.S. Mikroskobi düzeyinde kırık iyileşmesi. n kara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2002. 55 02.
- 21- Lieberman, J.R. and G.E. Friedlaender, Bone regeneration and repair. New Jersey: Humana Press Inc51 PRADEL, W. ECKELT, U. LAUER, G.(2006). Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics, 2005. 101: p. 285-290.
- 22-Ozaki, A. et al. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. Journal of orthopaedic science, 2000. 5(1): p. 64-70.
- 23- Brinker, M.R. and D.P. O'Connor, Bone. In review of orthopaedics 4rd Ed. Ed. Miller MD). 2004. p. 1-19.

- 24- Gartner, L.P. and J.L. Hiatt, Color Textbook of Histology. (3.nd edition) 2007. p. 150-155.
- 25- Scanlon, V.C. and T. Sanders, Essentials of Anatomy and Physiology 5th ed. 2007. p. 107.
- 26- Cook, S.D. J. D, and R.L. Barrack, Basic science in orthopedic surgery, Current Diagnosis&Treatment in Orthopedics; 1 st ed.by Skinner H; Appleton&Lange. 1995. p. 1-44
27. Morgan, E.F. G.L. Barnes, and T.A. Einhorn, Osteoporosis 3.rd Volume 1 The Bone Organ System: Form and Function. p. 3-28.
28. EGE, R.p.-. Travmatoloji, kırıklar, eklem ve diğer yaralanmalar. 2003. p. 55-94.
- 29- Cook, S.D. J. D, and R.L. Barrack, Basic science in orthopedic surgery, Current Diagnosis&Treatment in Orthopedics; 1 st ed. 1995, by Skinner H; Appleton&Lange. p. 1-44.
- 30-Rash, D. and L. Gang, The biology of fracture healing: Optimising outcome; Oxford Journals 1999. p. 11.
- 31- SEVİMLİ, R. and M.Ü, Deksketoprofen Trometamol Kullanımının Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisinin Ratlarda İncelenmesi, in Ortopedi ve Travmatoloji BD. 2011, KSÜ Tıp Fakültesi.
32. TUNCEL, Ş. et al. Denerve sıçan femurunda hiperbarik oksijen tedavisinin kırık iyileşmesi üzerine etkisi. Ege Tıp Dergisi, 2013. 52 1.
- 33- Riebel, G.D. et al. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. Spine, 1995. 20(20): p. 2198-2202.
- 34- Raikin, S.M. et al. Effect of nicotine on the rate and strength of long bone fracture healing. Clinical orthopaedics and related research, 1998. 353: p. 231- 237.
- 35- Bucholz, R.W. Rockwood and Green's Fractures in Adults: Two Volumes Plus Integrated Content Website (Rockwood, Green, and Wilkins' Fractures). 2012: Wolters Kluwer Health.

- 36- KABAK, Ş. F. Balkar, and F. Duygulu, Kırık iyileşmesinde kırık hematomunun önemi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2001; 35: 252, 2001. 259.
- 37- Nagasaki, R. et al. A combination of low-intensity pulsed ultrasound and nanohydroxyapatite concordantly enhances osteogenesis of adipose-derived stem cells from Buccal fat pad. *Cell medicine*, 2015. 7(3): p. 123-131.
- 38- Istikoglou CI, Mavreas V, Geroulanos G. History and therapeutic properties of *Hypericum perforatum* from antiquity until today. *Psychiatriki*. 2010;21(4): 332–8.
- 39- Hunt EJ, Lester CE, Lester EA, Tackett RL. Effect of St. John's wort on free radical production. *Life Sci*. 2001 Jun 1;69(2):181-90.
- 40- Nicolai M. N, Sara L. C. Morphological and Phytochemical Diversity among *Hypericum* Species of the Mediterranean Basin. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*. 2011 Jan; 5(Special Issue 1): 14–28.
- 41-Zobayed S. M. A, Afreen F, Goto E, Kozai T. Plant–Environment Interactions: Accumulation of Hypericin in Dark Glands of *Hypericum perforatum*. *Ann Bot*. 2006 Oct; 98(4): 793–804.
- 42- Kenneth M. Klemow, Andrew Bartlow, Justin Crawford, Neil Kocher, Jay Shah, and Michael Ritsick. *Medical Attributes of St. John's Wort (Hypericum perforatum)*. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition.
- 43- Francesca B, Angelo A. I. Herb–Drug Interactions with St John's Wort (*Hypericum perforatum*): an Update on Clinical Observations. *AAPS J*. 2009 Dec; 11(4): 710.
- 44- Clement K, Covertson C, Johnson M. J, Dearing K. St. John's wort and the treatment of mild to moderate depression: A systematic review. *Holist Nurs Pract*. 2006 JulAug;20(4):197-203.
- 45- Kenneth M. Klemow, Andrew Bartlow, Justin Crawford, Neil Kocher, Jay Shah, and Michael Ritsick. *Medical Attributes of St. John's Wort (Hypericum perforatum)*. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition
- 46- Nahrstedt A, Butterwick V. Biologically active and other chemical constituents of the

- herb *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 1997 Sep;30 Suppl 2:129-34.
- 47- Hippus H. St John's Wort (*Hypericum perforatum*) --a herbal antidepressant. *Curr Med Res Opin*. 1998;14(3):171-84.
- 48- Barnes J, Anderson L. A, Phillipson J. D. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology, and clinical properties. 2001 May;53(5):583- 600.
- 49- Staffeldt B, Kerb R, Brockmoller J, Ploch M, Roots I. Pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin after oral intake of *Hypericum* extract LI 160 in healthy volunteers. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1994 Oct;7 Suppl 1:S47-53.
- 50-Erdelmeier CA. Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 1998 Jun;31 Suppl 1,2-6.
- 51- Remick RA. Diagnosis and management of depression in primary care: A clinical update and review. *CMAJ*. 2002 Nov 26;167(11):1253-60.
- 52- Tomás H, Hugo G. Monoamine Oxidase-A Inhibition and Associated Antioxidant Activity in Plant Extracts with Potential Antidepressant Actions. *Biomed Res Int*. 2018; 2018: 4810394.
- 53- Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F. et al. Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline, and dopamine in the cortex, diencephalon, and brain stem of the rat. *J Pharm Pharmacol*. 1999 Jun;51(6):723-8.
- 54- Müller WE, Singer A, Wonnemann M. Hyperforin-antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry*. 2001 Jul;34 Suppl 1:S98-102.
- 55- Zanolini P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Rev*. 2004 Fall;10(3):203-18
- 56-Reichling JI, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 2001 Jul;34 Suppl 1:S116-8.
- 57-Diwu Z. Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochem Photobiol*. 1995 Jun;61(6):529-39.

- 58- Lenard J, Rabson A, Vanderoef R. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other envelope viruses using hypericin and rose bengal: Inhibition of fusion and syncytia formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jan 1;90(1):158-62.
- 59- Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B. et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*. 2002 Feb 14;21(8):1242-50.
- 60-Fox FE, Niu Z, Tobia A, Rook AH. Photoactivated hypericin is an anti-proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T-lymphocytes: Implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. *J Invest Dermatol*. 1998 Aug;111(2):327-32. 80
- 61- Lu YH, Du CB, Liu JW, Hong W, Wei DZ. Neuroprotective effects of *Hypericum perforatum* on trauma induced by hydrogen peroxide in PC12 cells. *Am J Chin Med*. 2004;32(3):397-405
- 62- Zou YP, Lu YH, Wei DZ. Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytother Res*. 2010 Jan;24 Suppl 1: S6-S10.
- 63- Mohanasundari M, Sabesan M. Modulating effect of *Hypericum perforatum* extract on astrocytes in MPTP induced Parkinson's disease in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2007 Jan-Feb;11(1):17-20.
- 64-Kraus B, Wolff H, Heilmann J, Elstner EF. Influence of *Hypericum perforatum* extract and its single compounds on amyloid-beta mediated toxicity in microglial cells. *Life Sci*. 2007 Aug 23;81(11):884-94.
- 65-Trofimiuk E, Walesiuk A, Braszko JJ. St John's wort (*Hypericum perforatum*) diminishes cognitive impairment caused by the chronic restraint stress in rats. *Pharmacol Res*. 2005 Mar;51(3):239-46.
- 66- Trofimiuk E, Walesiuk A, Braszko JJ. St John's wort (*Hypericum perforatum*) counteracts deleterious effects of the chronic restraint stress on recall in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*.

2006;66(2):129–38.

67-Trofimiuk E, Braszko JJ. Alleviation by *Hypericum perforatum* of the stress-induced impairment of spatial working memory in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2008 Feb;376(6):463-71.

68-Dost T, Ozkayran H, Gokalp F, Yenisey C, Birincioglu M. The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. *Dig Dis Sci*. 2009 Jun;54(6):1214-21.

69- Cayci M. K, Dayioglu H. *Hypericum perforatum* extracts healed gastric lesions induced by hypothermic restraint stress in Wistar rats. *Saudi Med J*. 2009 Jun;30(6):750-4.

70- Mozaffari S, Esmaily H, Rahimi R, Baeeri M, Sanei Y. Et al. Effects of *Hypericum perforatum* extract on rat irritable bowel syndrome *Pharmacogn Mag*. 2011 Jul-Sep; 7(27): 213–223. 81

71-Tedeschi E, Menegazzi M, Margotto D, Suzuki H, Förstermann U, Kleinert H. Antiinflammatory actions of St. John's wort: Inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by downregulating signal transducer and activator of transcription 1alpha (STAT-1alpha) activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Oct;307(1):254-61.

72-Hammer KD, Hillwig ML, Solco AK. Et al. Inhibition of prostaglandin E(2) production by antiinflammatory *hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. *J Agric Food Chem*. 2007 Sep 5;55(18):7323- 31.

73- Subhan F, Khan M, Ibrar M. et al. Antagonism of antinociceptive effect of hydroethanolic extract of *Hypericum perforatum* Linn. by a non selective opioid receptor antagonist, naloxone. *Pak J Biol Sci*. 2007 Mar 1;10(5):792-6.

74- Feily A, Abbasi N. The inhibitory effect of *Hypericum perforatum* extract on morphine withdrawal syndrome in rat and comparison with clonidine. *Phytother Res*. 2009 Nov;23(11):1549-52.

75-Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*. 1987; 18: 213-25.

- 76-Huo MH, Troiano NW The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res.* 9:3,383–390, 1991.
- 77- Amanat, N. et al. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2007. 22(6): p. 867-876.
- 78-Bonnarens, F. and T.A. Einhorn, Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *Journal of Orthopaedic Research*, 1984. 2(1): p. 97-101
- 79-Hausman, M. M. Schaffler, and R. Majeska, Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone*, 2001. 29(6): p. 560-564.
- 80- Urrutia, J. R. Mardones, and F. Quezada, The effect of ketoprophen on lumbar spinal fusion healing in a rabbit model. 2007.
- 81-Bauss, F. and R.G.G. Russell, Ibandronate in osteoporosis: preclinical data and rationale for intermittent dosing. *Osteoporosis international*, 2004. 15(6): p. 423- 433.
- 82-Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, Günal Ğ. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1995;
- 83-Durak K, Sonmez G, Sarisozen B ve ark. Histological assessment of the effect of alpha-tocopherol on fracture healing in rabbits. *J Int Med Res.* 2003; 31: 26-30.