



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, ANKARA EĞİTİM VE  
ARAŞTIRMA HASTANESİ**

**GHRELİN'İN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN RATLARDA  
İNCELENMESİ**

**Dr. Tamer ERENER**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA/2019**





**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, ANKARA EğTİM VE  
ARAşTIRMA HASTANESİ**

**GHRELİN'İN KIRIK İYİLEşMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN RATLARDA  
İNCELENMESİ**

**Dr. Tamer ERENER**

**Tez Danışmanı:  
Prof. Dr. Cem Nuri AKTEKİN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA/2019**

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR .....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Kemik.....	2
2.2. Kırık iyileşmesi (kaynaması) .....	13
2.3. Ghrelin hormonu .....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	38
3.1. Çalışma Planı .....	38
3.2. Cerrahi Teknik .....	40
3.3.Radyolojik İnceleme: .....	42
3.4. Femur kemiklerinin biyomekanik analizi .....	44
3.5. Kan parametrelerinin ölçümü.....	44
3.6. Histolojik inceleme .....	45
3.7. İstatistiksel Analiz .....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Radyolojik Bulgular.....	47
4.2. Biyomekanik Bulgular .....	58
4.3. Biyokimyasal bulgular .....	60
4.4. Histolojik Bulgular.....	62

5. TARTIŞMA .....	64
6. SONUÇLAR .....	71
KAYNAKLAR .....	72
ÖZGEÇMİŞ .....	82



## TEŞEKKÜR

İhtisas eğitimine başladığım günden bu güne yetişmemde büyük emeği bulunan, bizlerden esirgemediği bilgi ve tecrübelerini taşıyacağım, değerli Hocam Prof. Dr. Cem Nuri AKTEKİN'e, sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan Prof. Dr. Ertuğrul Akşahin, Doç. Dr. İsmail Murad Pepe, Op. Dr. Abdurrahman Sakaoğulları, Op. Dr. A. Onur Kocadal, Op. Dr. Abdullah İyigün, Op. Dr. Kubilay Uğurcan Ceritoğlu, Op. Dr. Yunus Demirtaş, Op. Dr. Toygun Kağan Eren, Op. Dr. Cihan Ergün, Op. Dr. Zafer Güneş ve kliniğimizde birlikte çalışma şansı bulduğum diğer uzmanlarımıza,

İhtisas süresince desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Kadir Bahadır Alemdaroğlu, Doç. Dr. Serkan İltar, Doç. Dr. Veysel Ercan Dinçel, Doç. Dr. Ahmet Özmeriç, Op. Dr. Özgür Şahin, Op. Dr. Gökhan Arıcan, Op. Dr. Niyazi Ercan'a,

Tez çalışmalarım süresince birlikte çalışmaktan gurur duyduğum Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Ferhat Geneci, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı Dr. Mert Ocak ve Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Bora Uzuner'e,

Tezimle ilgili yardımlarından ötürü hastanemiz Patoloji Anabilim Dalı Prof. Dr. Sema Hücümenoğlu, Dr. Muzaffer Çaydere ve Biyokimya Anabilim Dalı Doç. Dr. Mehmet Şenes ve Dr. Özge Sezgin ile beraber çalışmaktan zevk duyduğum hastanemiz klinikleri ve ameliyathanelerinde görevli doktor, hemşire, teknisyen ve diğer çalışanlarına,

Bu çalışmanın yapılmasında laboratuvar imkânlarını ve yardımlarını esirgemeyen Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı ile ODTÜ Biyomekanik Laboratuvarı Prof. Dr. Dilek Keskin ve Arş. Gör. Ali Deniz Dalgıç'a,

Ayrıca hayatım boyunca her zaman desteklerini arkamda hissettiğim aileme,  
Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tamer ERENER

ANKARA 2019

## KISALTMALAR

<b>7TM 7</b>	: Transmembran alanı
<b>ACP5</b>	: Asit fosfataz 5
<b>ACTH</b>	: Adrenokortikotropik hormon
<b>AG</b>	: Açıl ghrelin
<b>AGRP</b>	: Aguti ilişkili peptid
<b>ALP</b>	: Alkalen fosfataz
<b>ANG</b>	: Anjiyopietin
<b>ARC</b>	: Arküat nükleus
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BDGF</b>	: Kemikten derive büyüme faktörü
<b>BGLAP</b>	: Kemik gama karboksi glutamat proteini (Osteokalsin)
<b>BMD</b>	: Kemik mineral yoğunluğu
<b>BMG</b>	: Kemik matriks jelatin
<b>BMP</b>	: Kemik morfojenetik proteini
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin monofosfat
<b>COL1A1</b>	: Kollajen tip I, alfa 1
<b>CREB</b>	: cAMP bağlayıcı protein
<b>DKK-1</b>	: Dickkopf-ilişkili protein 1
<b>DMN</b>	: Dorsomediyal nükleus
<b>EC</b>	: Enterochromaffin
<b>ECDGF</b>	: Endotelial hücre kaynaklı büyüme faktörü
<b>ECGF</b>	: Epidermal hücre kaynaklı büyüme faktörü
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>GAG</b>	: Glikozaminoglikan

<b>GH</b>	: Büyüme hormonu
<b>GHR</b>	: Büyüme hormonu reseptörü
<b>GHRH</b>	: Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
<b>GHRH-R</b>	: Büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörü
<b>GHRP-6</b>	: Büyüme hormon salgılatıcı peptid-6
<b>GHS</b>	: Büyüme hormonu salgılatıcı
<b>GHS-R</b>	: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör
<b>GHSR1a</b>	: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör 1a
<b>GOAT</b>	: Ghrelin O-açıltransferaz
<b>GPCR</b>	: G-protein-bağlı reseptör
<b>GPR39</b>	: G protein-bağımlı orphan reseptör 39
<b>GRLR</b>	: Ghrelin reseptörü-benzer reseptör
<b>HPLC</b>	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>IGF</b>	: İnsülin kaynaklı büyüme faktörü
<b>IL</b>	: Interlökin
<b>L-NAME</b>	: N-nitro-L-arginine methyl ester
<b>LIPUS</b>	: Düşük yoğunluklu pulse ultrason
<b>MBOAT</b>	: Membran-bağlı O-açıltransferaz
<b>M-CSF</b>	: Makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>MDGF</b>	: Makrofaj kaynaklı büyüme faktörü
<b>micro-CT</b>	: Mikro-bilgisayarlı tomografi
<b>mRNA</b>	: Haberci ribonükleik asit
<b>MSC</b>	: Mezankimel kök hücre
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>NPY</b>	: Nöropeptid Y
<b>OPG</b>	: Osteoprotegerin
<b>PDGF</b>	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>PG-E2</b>	: Prostaglandin-E2

<b>PO<sub>4</sub></b>	: Fosfat
<b>PPARG</b>	: Peroksizom proliferatör-aktive gama reseptörü
<b>PRP</b>	: Trombositten zengin plazma
<b>PTH</b>	: Paratiroid hormon
<b>PVN</b>	: Paraventriküler nükleus
<b>RANKL</b>	: Nükleer kappa ligand reseptör aktivator
<b>RIA</b>	: Radioimmunoassay
<b>RUNX2</b>	: Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2
<b>SOX-9</b>	: Cinsiyet tayin eden bölge Y-Kutu 9
<b>SP7</b>	: Osteriks
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekrozis faktör alfa
<b>VMN</b>	: Ventromediyal nükleus
<b>Wnt</b>	: Wingless-Related Integration Site

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo No.</b>		<b>Sayfa No.</b>
1.	Mikroskopik olarak kemik tipleri	4
2.	Kemik matriksin bileşenleri	7
3.	Kalsiyum ve fosfat regülasyonu	10
4.	Kırık iyileşmesinde biyokimyasal faktörler	23
5.	Ratların dağılımı	39
6.	Birinci grup (kontrol) total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçümü	47
7.	İkinci grup (ilaç) total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçümü	47
8.	Üçüncü grup (kontrol 2) total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçümü	48
9.	Dördüncü grup (ilaç) total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçümü	48
10.	Beşinci grup femur total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçümü	48
11.	İnce kesit tomografide 1. grubun; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümler	48
12.	İnce kesit tomografide 2. grubun; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümler	49
13.	İnce kesit tomografide 3. grubun; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümler	49
14.	İnce kesit tomografide 4. grubun; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümler	50
15.	İnce kesit tomografide sağlam grubun; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümler	50
16.	Üçüncü ve 4. grupların total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyoopak kemik ve düşük radyoopak kemik ölçümlerinin karşılaştırılması	51
17.	Birinci ve 2. grupların total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyoopak	51

	kemik ve düşük radyopak kemik ölçümlerinin karşılaştırılması	
18.	İkinci ve 4. grupların total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyopak kemik ve düşük radyopak kemik ölçümlerinin karşılaştırılması	52
19.	Üçüncü ve 4. grupların total kallus çapı/femur çapı ve yüksek radyopak kemik/düşük radyopak kemik oranı ölçümlerinin karşılaştırılması	52
20.	Birinci ve 2. grupların total kallus çapı/femur çapı ve yüksek radyopak kemik/düşük radyopak kemik oranı ölçümlerinin karşılaştırılması	52
21.	İkinci ve 4. grupların total kallus çapı/femur çapı ve yüksek radyopak kemik/düşük radyopak kemik oranı ölçümlerinin karşılaştırılması	53
22.	Birinci ve 2. grupların; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümlerin karşılaştırılması	53
23.	Üçüncü ve 4. grupların; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümlerin karşılaştırılması	54
24.	İkinci ve 4. grupların; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümlerin karşılaştırılması	55
25.	Grupların dansitometri ölçüm sonuçları	56
26.	Birinci ve 2. grupların dansitometri ölçümlerinin karşılaştırılması	56
27.	Birinci ve 3. grupların dansitometri ölçümlerinin karşılaştırılması	57
28.	İkinci ve 4. grupların dansitometri ölçümlerinin karşılaştırılması	57
29.	Üçüncü ve 4. grupların dansitometri ölçümlerinin karşılaştırılması	57
30.	Üç noktalı eğme testi ölçüm sonuçları	60
31.	Kontrol, ilaç ve sağlam gruplarının biyokimya ölçümleri	61
32.	Kontrol ve ilaç gruplarının ALP, Ca ve P ölçümlerinin karşılaştırılması	61
33.	İyileşmenin histolojik skalası	62
34.	Örneklerin iyileşmenin histolojik skalasına göre skorlanması	62
35.	Birinci ve ikinci grupların grade ölçümlerinin karşılaştırılması	63
36.	Birinci ve üçüncü grupların grade ölçümlerinin karşılaştırılması	63
37.	İkinci ve dördüncü grupların grade ölçümlerinin karşılaştırılması	63
38.	Üçüncü ve dördüncü grupların grade ölçümlerinin karşılaştırılması	63

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No.		Sayfa No.
1.	Uzun ve kortikal kemiğin şematik görünüşü	2
2.	Spongiyöz kemiğin yapısı	3
3.	Kemiğin hücreleri	4
4.	Periosteum ve endosteum	6
5.	Kemiğin kan ve sinir sistemi şeması	8
6.	Endokondral kemikleşme	12
7.	Primer kemik iyileşmesinin tipleri	13
8.	Sekonder kemik iyileşmesinin aşamaları	14
9.	Kırık iyileşme evrelerinin şeması, çeşitli kaynamama faktörleri ile klinik tedavilere genel bakış	15
10.	İnflamasyon aşaması	17
11.	Sekonder iyileşme	18
12.	Yeniden şekillenme aşaması	20
13.	Ghrelinin fizyolojik etkilerini gösteren şema	24
14.	İnsan ve rat ghrelinlerinin yapısı	25
15.	İnsan ghrelinin yapısı ve oktanoik asitin GOAT ile modifikasyon işlemi	26
16.	Ghrelinin reseptör ailesi	27
17.	Çeviri sonrası işlem ve ghrelinin açılması üzerine şematik görünüm	28
18.	Midede ghrelinin hücreleri	29
19.	Hipofizden büyüme hormonu salınımının düzenlenmesi	32
20.	Kemik büyümesine, yeniden şekillenmesine ve kemik absorpsiyonuna katkıda bulunan faktörler	33
21.	Ratların kafeslere dağılımı	38
22.	Ratlara intraperitoneal yöntem ile ghrelinin verilmesi	39
23.	Ratın sol diz bölgesinin ameliyata hazırlanması	40
24.	Femur kondillerin ortaya çıkarılması	40
25.	Kirschner telinin yerleştirilmesi	41
26.	Künt giyotin sisteminde kapalı kırık oluşturulması	41
27.	Kırığın direkt radyografilerle radyolojik olarak doğrulanması	42
28.	Sol femurların gruplar halinde röntgen ile değerlendirilmesi	42
29.	Sol femurların mikro tomografi ile incelenmesi	42
30.	CTan ve CTvox isimli programlar ile yapılan üç boyutlu modellemeler	43

31.	Transvers kesitlerde, 2 ve 3 boyutlu modellemelerde NRecon, CTan ve CTvox isimli programların kullanılması	43
32.	Univert biyomalzeme mekanik test cihazı, 3 noktalı eğme testi sistemi ve femur kemiklerine uygulanan 3 noktalı eğme testi	44
33.	İlaç 1 (Grade 2) İlaç 3 (Grade 3) örnekleri	45
34.	İlaç 23 (Grade 7) İlaç 20 (Grade 10) örnekleri	45
35.	Kontrol 1 (Grade 1) Kontrol 5 (Grade 2) örnekleri	46
36.	Kontrol 14 (Grade 3) Kontrol 15 (Grade 4) örnekleri	46
37.	Grupların kemik yüzey/hacimsel ölçüm skorları	55
38.	Grupların trabeküler kalınlık ölçüm skorları	56
39.	Grupların dansitometri ölçüm skorları	57
40.	Sağlıklı femurlar ile yapılan 3 noktalı eğme testi yük/deformasyon grafiği	58
41.	Ghrelin tedavisi uygulanan ratların 28 günlük iyileşme süresi sonrası femur kemiğine uygulanan 3 noktalı eğme testi yük/deformasyon grafiği	59
42.	Kontrol ve ilaç gruplarının ALP (U/L) ölçüm skorları	61
43.	Grupların grade ölçüm skorları	62

## ÖZET

**Amaç:** Literatürde, Ghrelin'in, osteoblastların proliferasyon ve farklılaşmalarında etkileri olduğu, ayrıca ratlarda kemik mineral yoğunluğunu artırdığına yönelik çalışmalar yer almış, ancak kırık iyileşmesine etkilerine ilişkin deneysel bir araştırma bulunamamıştır. Bu kapsamda, Ghrelinin kırık iyileşmesine doğrudan katkı sağlayacağı değerlendirilerek, ghrelinin femur cisim kırıklarının kaynamasındaki etkisi; radyolojik, biyomekanik, histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmiştir.

**Gereç ve yöntem:** Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deney Laboratuvarı ve Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğinde 40 adet Wistar-Albino tipi erkek rat Kontrol ve Deney (Ghrelin) grubu olarak dört gruba ayrılmıştır. Genel anestezi altında tüm ratların sol femurlarında standart kapalı cisim kırıkları oluşturulmuştur. Kırık sonrası aynı günden başlamak üzere hayvanlar sakrifiye edilene kadar deney gruplarına günlük ghrelin enjeksiyonları uygulanmıştır. Eşit sayıda rat, kırık oluşturulmasından 14 ve 28 gün sonra sakrifiye edilerek, kaynama dokuları radyolojik, biyomekanik, biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiştir.

**Bulgular:** Yapılan ölçümlerde radyolojik olarak deney grubunda kontrol grubuna göre kemik yüzey/hacimsel ve trabeküler kalınlık ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Histolojik incelemede ise, 2. ve 4. haftanın sonunda ghrelin grubunda anlamlı ölçüde kaynamanın fazla olduğu izlenmiştir ( $p<0,05$ ). Biyomekanik incelemede 14 ve 28 günlük iyileşme süresi sonunda ghrelin uygulanan grupların, kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek yük dayanımına sahip olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Biokimyasal olarak, deney grubunda, kontrol grubuna göre 28 günlük iyileşme süresi sonunda ALP seviyelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

**Sonuç:** Bu bulgular, Ghrelin'in kırık iyileşmesine doğrudan katkı sağladığını göstermektedir. Gelecek çalışmalarda, Ghrelin'in insanlarda kırık iyileşmesine etkisinin araştırılarak, farmakolojik uygulamalarda dikkate alınmasının uygun olacağı değerlendirilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kırık İyileşmesi, Kırık Onarımı, Ghrelin, Kemiğin Yeniden Şekillenmesi.

## ABSTRACT

**Aim:** There are studies in the literature that Ghrelin has effects on proliferation and differentiation of osteoblasts and also increases bone mineral density in rats, however, no experimental research on its effects to the fracture healing has been found. In this context, by evaluating that ghrelin will directly contribute to fracture healing; the effect of ghrelin on the union of femoral shaft fractures was examined radiological, biomechanical, histological and biochemical.

**Materials and Methods:** Forty male Wistar-Albino rats were divided into four groups as Control and Experimental (Ghrelin) groups in Ankara Training and Research Hospital Animal Testing Laboratory and Orthopedics and Traumatology Clinic. Standard closed shaft fractures were created in the left femurs of all rats under general anesthesia. Daily ghrelin injections were applied to the experimental groups until the animals were sacrificed starting from the same day after fracture. An equal number of rats were sacrificed 14 and 28 days after fracture formation, and tissue samples were examined radiologically, biomechanically, biochemical and histologically.

**Results:** A statistically significant difference was found between the bone surface/volumetric and trabecular thickness measurements in the experimental group compared to the control group ( $p < 0,05$ ). On histological examination, at the end of the 2nd and 4th weeks, significant union was observed in the ghrelin group ( $p < 0,05$ ). In biomechanical examination, it was observed that the groups treated with ghrelin had a statistically significant higher load resistance than the control groups at the end of the 14 and 28 days recovery period ( $p < 0,05$ ). Biochemically, ALP levels were found to be higher in the experimental group at the end of the 28-day recovery period compared to the control group ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** These findings indicate that Ghrelin directly contributes to fracture healing. In future studies, it is considered that it is appropriate to consider the effect of Ghrelin on fracture healing in humans and to consider it in pharmacological applications.

**Key Words:** Fracture Healing, Fracture Repair, Ghrelin, Bone Remodelling

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

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 (1). 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, yaş, beslenme ve hormonal durum, yetersiz redüksiyon, eşlik eden hastalıklar, enfeksiyonlar, ilaçlar ve travmanın özelliği, kırık iyileşmesini etkileyen faktörler olarak bildirilmiştir (2).

Ghrelin, mide fundusundan salınan 28 amino asitlik (aa) lipopeptid yapıda bir hormondur (3). Ghrelin, etkisini büyüme hormonu salgılatıcı reseptör (GHS-R) tip 1a'ya bağlanarak gösterir. Ghrelinin kemik üzerindeki etkisi birçok hayvan modelinde incelenmiştir. Ghrelin infüzyonu ratlarda BMD'yi artırmış ve benzer bir etki büyüme hormonu (GH)-eksikliği olan ratlarda da gözlenmiş, bu da kemikte ghrelinin GH-bağımsız etkisinin varlığını ortaya koymuştur (3).

Ghrelin bir dizi ek biyolojik işlem gerçekleştirir: iştahı uyarır, adipogenezi teşvik eder, enerji metabolizmasını azaltır, kardiyovasküler fonksiyonu geliştirir ve prolaktin ve kortizol salgılamalarını uyarır (4). Bu bulgular, GH'ın iyi bilinen kemik oluşumuna katkıda bulunduğu (5) kanıtıyla birlikte, ghrelinin kemik metabolizmasında rol oynadığını düşündürmektedir.

Literatürde ghrelinin kırık iyileşmesi üzerine etkisine ilişkin deneysel bir çalışma olmadığı görülmektedir. Rat osteoblastlarında GHS-R1a'nın ekspresyonu ve Ghrelin'in hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını uarması ve normal ve GH-yetersiz ratlarda BMD'yi artırması bulgularından yola çıkılarak, Ghrelin'in kırık iyileşmesini hızlandırabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada, ghrelinin kapalı femur kırıkları üzerine olan etkisi; klinik, radyolojik, biyomekanik ve histolojik olarak incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

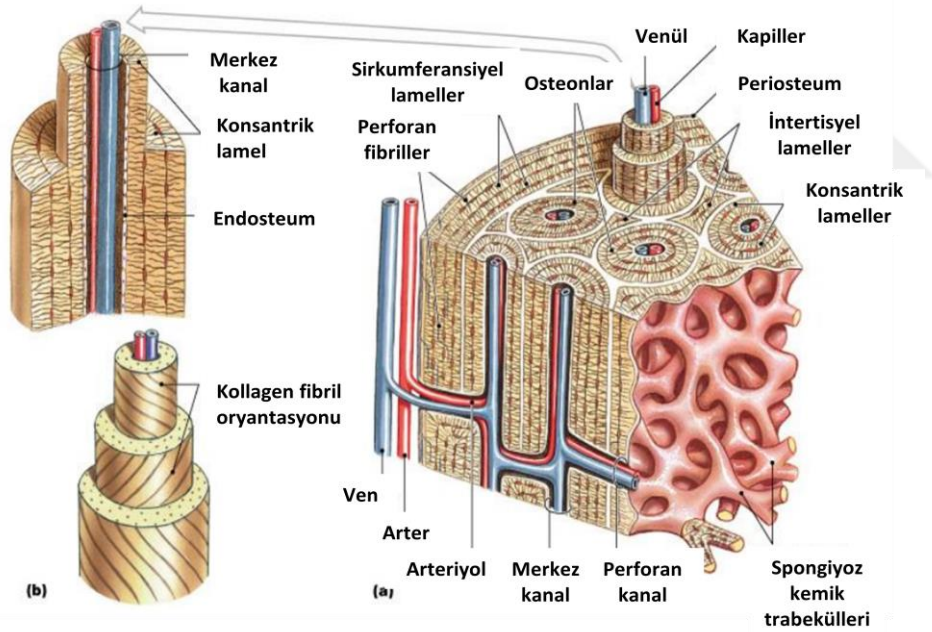
### 2.1. KEMİK

Kemik, fonksiyonel ihtiyaçlara uyum sağlama ve kendini onarma becerisine sahip, karmaşık ve dinamik bir dokudur (6). Bu doku, mekanik (tüm vücudu destekler ve hareket kabiliyeti sağlar), koruyucu (hayati organları ve kemik iliğini korur) ve metabolik (kalsiyum ve fosfat regülasyonunun düzenlenmesinde etkilidir) fonksiyonlarda önemli bir role sahiptir (7). Ayrıca kemik, minerallerin depolanmasından ve kan hücrelerinin üretilmesinden sorumludur.

#### 2.1.1. Kemik Yapısı ve Histolojisi

##### 2.1.1.1. Kemik tipleri:

*Yapısal olarak, iki tip kemik tanımlanabilir: spongiyöz veya trabeküler ve kortikal veya kompakt kemik (Şekil 1-a) (8).*

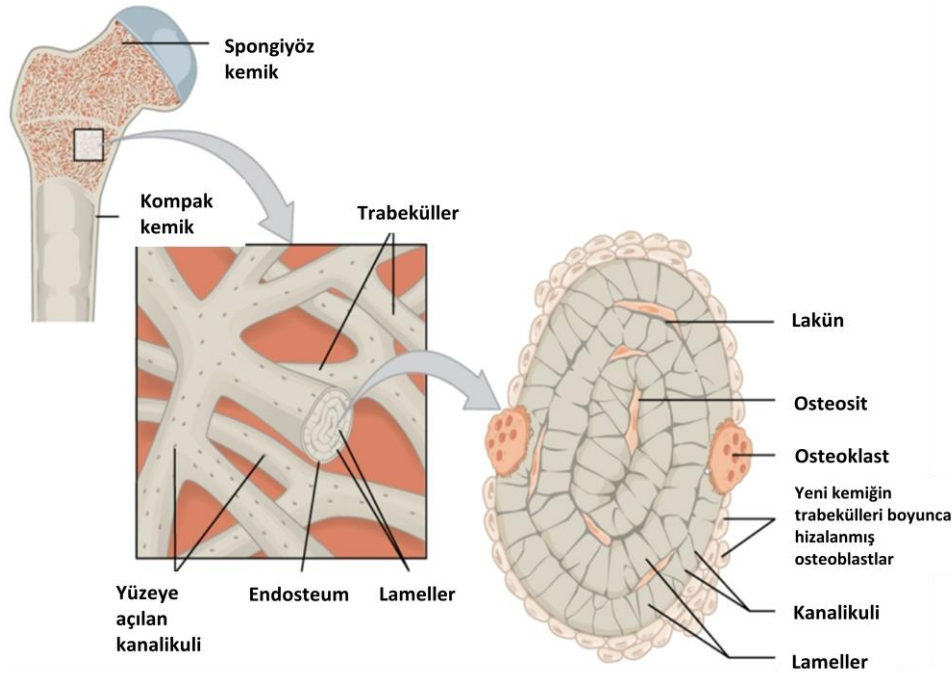


**Şekil 1.** Uzun (a) ve kortikal (b) kemiğin şematik görünüşü. (Erişim 18.06.2019, [http://faculty.seattlecentral.edu/jwhorley/Bones\\_241.pdf](http://faculty.seattlecentral.edu/jwhorley/Bones_241.pdf)' den uyarlanmıştır.) (8)

Kortikal kemik (Şekil 1-b), spongiyözden daha güçlü, statik, kalın ve daha az boş alana sahiptir. Bu tip kemikte bulunan osteositler ve lameller, kemik kütesine nüfuz eden kan damarlarının etrafına yerleşmiştir. Kortikal kemikte, kan damarlarının nüfuz ettiği iki ana kanal vardır: kemik eksenine paralel Havers veya merkezi kanallar

ile kemik eksenine dik ve daha büyük olan Volkmann veya perfore kanallar. 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: ortak bir merkezi (merkez kanalı) çevreleyen eşmerkezli dairesel kemik matrisi katmanları olan osteonun bir parçası olarak adlandırılan konsantrik lameller; kortikal kemiğin dış yüzeyini oluşturan düz plakalar olarak kabul edilen sirkumferansiyal lameller ve osteonlar arasında bulunan ve eşmerkezli veya sirkumferansiyal lamellerin kalanından oluşan interstisyel lameller (9).

Spongiyöz kemik, büyüme, kalsiyum homeostazı ve hematopoez açısından en aktif kemik parçasıdır. Aralarında kemik iliği ve damarlarla dolu boş alan bulunan trabekül denilen birbirine bağlı plakalardan oluşur. Trabeküller, aralarına osteoitler yerleşmiş birkaç lamelden oluşur. Genellikle kan damarları trabekülleri geçemediğinden, osteositler, kemiklerdeki osteositleri birleştiren kanallar olan kanaliküllerden besin maddelerine ulaşabilir. Trabekül yüzeyi, esas olarak osteoblastlar ve az sayıda osteoklasttan oluşan bir hücre tabakasından oluşur. Destekleyici işlevleri, esas olarak, kompresyon yükleme tipinin baskın olduğu yerlerde oluşur (örneğin, vertebra gövdelerinde) (Şekil 2) (9).



**Şekil 2.** Spongiyöz kemiğin yapısı (Erişim 18.06.2019, <https://boneandspine.com/cortical-bone-and-cancellous-bone/> den uyarlanmıştır.) (10)

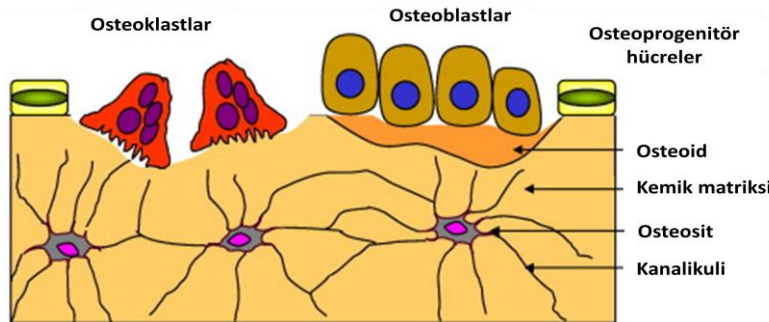
*Mikroskopik olarak*, kollajen liflerinin düzenlenmesine göre; primer, olgunlaşmamış veya kaba lifli örgü ve sekonder, olgun veya lamel kemiği olarak iki tip kemik vardır (Tablo 1). Primer kemikte kollajen lifleri rastgele, farklı yönlerde düzenlenir. Yenidoğanlarda ve hızlı kemik oluşumunun olduğu yerlerde bulunur. Primer kemik geçicidir ve yetişkinlerde yerini sekonder kemiğe bırakır. Lameller, kendini ince lamel tabakalarında organize eden olgun kemiktir. Bu durumda, her bir lamelin kollajen lifleri birbirine paralel düzenlenir ve bitişik lamellerde bulunan kollajen liflerine açıktır. Osteositler, lakunalarda, lakunalar ise lamel tabakaları arasındaki boşlukların içinde bulunur. Örgü kemiğin oluşumundan sonra, genellikle yeniden şekillenme işleminde lamel kemik olarak düzenlenir (9).

**Tablo 1.** Mikroskopik olarak kemik tipleri (11)

Mikroskopik Görünüm	Alt Tipler	Özellikleri	Örnekler
Lamellar	Kortikal	Yapı en yüksek stres çizgileri boyunca yönlendirilmiştir. Güçlüdür.	Femur cismi
	Kansellöz	Yapı olarak kortikal kemikten daha uyumlu. Stres yönelimlidir.	Femur başı metafizleri, epifizleri
Örgülü (Woven)	İmmatür	Daha uyumlu. Stres yönelimli değildir.	Embriyonik iskelet Kırık kallusu
	Patolojik	Rasgele yönelim. Hızlı döngü. Zayıf. Esnek	Osteojenik sarkom Fibröz displazi

### 2.1.1.2. Kemik hücreleri:

Kemikte işlev gören ve yıkımdan sorumlu hücreler osteoklast olarak adlandırılır. Yapımdan osteoblastlar, iletişimden de osteositler sorumludur (Şekil 3) (12). Kemik iliği; progenitör hücrelerin kaynağı olan ve kemiğin iç çapından sorumlu olan kırmızı kemik iliği ve sarı kemik iliğinden oluşur (13).



**Şekil 3.** Kemiğin hücreleri (Jang JH, Castano O, Kim HW, Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering, Adv. Drug Deliv. Rev., 2009'dan uyarlanmıştır.) (14).

### **Osteoblastlar:**

Farklılaşmamış mezankimel kök hücrelerden oluşan osteoblastlar, kemik yapısındaki matriks yapımından ve salınımından sorumludur. Kemik yüzeyindeki osteoblastlar, diğer bölgelerdekilere göre metabolik olarak daha aktiftir. Osteoblastların farklılaşmasında interlökinler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin kaynaklı büyüme faktörü (IGF) etkilidir. Osteoblastlar paratiroid hormon (PTH) etkisinde iken, alkalen fosfataz aktivitesinde artış ve Tip 1 kollajen üretimi görülür; D vitaminin etkisinde iken osteokalsin yapımı artar. Osteoblastlarda, PTH ve D vitamininin yanı sıra glukokortikoid, prostoglandin ve östrojen reseptörleri de mevcuttur (15).

### **Osteositler:**

Osteositler, gelişmiş iskelet yapısında en fazla oranda bulunan hücrelerdir. Hücre dışındaki kalsiyum fosfor yoğunluğunda önemli role sahip olan osteositler, kemiğin mekanosensör hücreleridir; kalsitonin tarafından uyarılırken, paratiroid hormon tarafından inhibe edilir (13).

### **Osteoklastlar:**

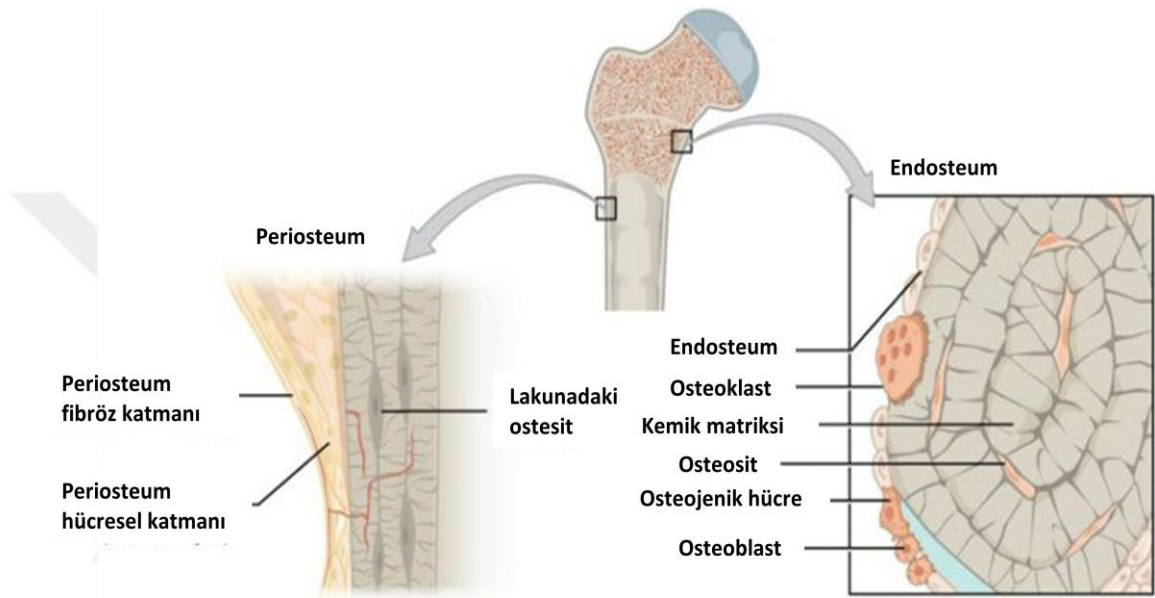
Osteoklastlar; kemik rezorpsiyonundan sorumlu olan çok çekirdekli, dev hücrelerdir. Hematopoietik hücrelerden miyeloid hücreler oluşur ve mononükleer hücrelere dönüşür; mononükleer hücreler de birleşerek osteoklastları oluşturur. Kemik çözünmesi Howship lakuna denilen kemik yüzeyindeki çukur alanlarda olur; çözünme kemik oluşumundan daha hızlı gerçekleşir. Bu hücreler kalsitonine hassas reseptörlere sahiptir ve interlökin 1 osteoklastik aktiviteyi uyarır (13).

### **Osteoprogenitör:**

Osteoblast öncülü hücrelere osteoprogenitör adı verilir. Bu hücreler çoğunlukla kemik iliğinde, endosteumda, periosteumda ve kemiğin kılcak damar yatağında yassı hücreler şeklinde yer alır. Kemik morfojenik proteinlerin varlığında bu hücreler osteoblastlara dönüşür. Kemik örtü hücresi yeniden şekillenmeyen kemik yüzeylerinde yerleşik, osteoblast kökenli, yassı, organelden fakir, birbirine ve osteositlere oluklu bağlantılarla bağlı, kalsiyum ve fosfatın kemiğin içine ve dışına pompalanmasından sorumlu hücrelerdir (12). Haversian kanallarda, endosteum ve periosteumda bulunan osteoblastlara dönüşebilen mezankimel hücrelerdir (13).

### 2.1.1.3. Periosteum ve endosteum:

Kemiğin dıştaki zarına periosteum, içteğine ise endosteum adı verilir. Bu zarlar osteojenik hücreler içermektedir. Periosteum ve endosteumun temel işlevleri, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli yeni osteoblastları sağlamaktır. Bu nedenlerle kemik cerrahisinde periosteum ve endosteumun korunmasına çok dikkat edilir (Şekil 4).



**Şekil 4. Periosteum ve endosteum:** Periosteum kemiğin dış yüzeyini oluşturur ve endosteum medüller boşluğu kaplar (Erişim 20.06.2019, <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/6-3-bone-structure/> den uyarlanmıştır.) (16).

Periosteumun dış tabakası kollajen liflerden ve fibroblastlardan oluşur. Sharpey lifleri, matrikse girerek periostu kemiğe bağlar. Periosteumun iç tabakası yassı hücrelerden zengindir. Kemiğin büyümesi ve onarımında başlıca rol oynayan bu hücreler bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturur. Periosteum; iç kısmında osteoblastlara dönüşme potansiyeli yüksek mezankimel hücreleri, dış kısmında daha çok fibröz dokunun hakim olduğu az sayıda hücreyi barındırır (13).

Endosteum, kemiğin içindeki bütün boşlukları örter ve tek katlı yassı osteoprogenitör hücreler ile çok az miktarda bağ dokusundan oluşur. Endosteum periosteumdan oldukça incedir.

#### 2.1.1.4. Kemik matriksi:

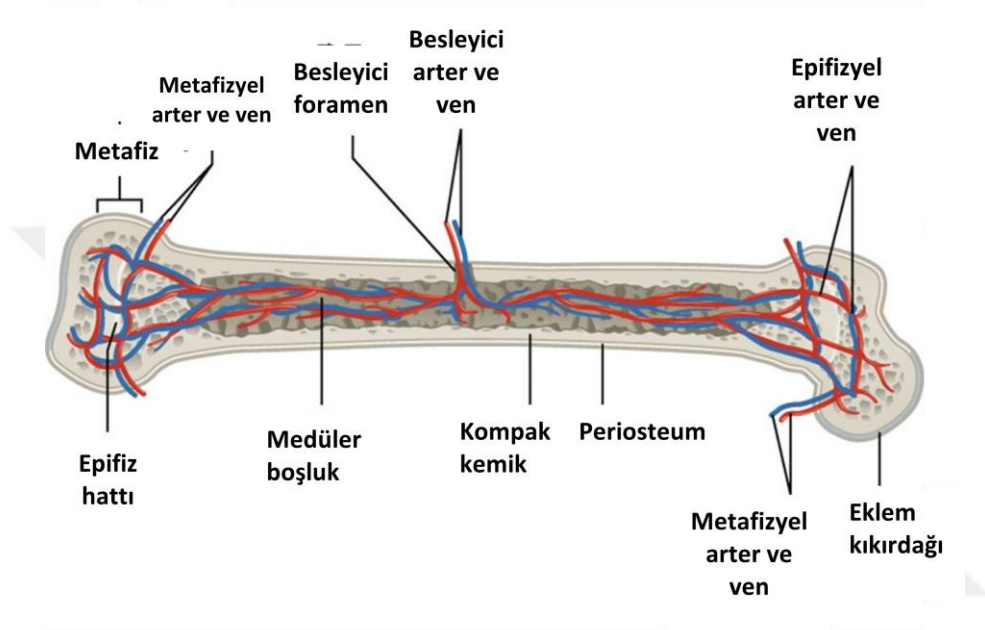
Matriks; organik ve inorganik komponentlerden oluşur. Organik komponenti; kollajen, kollajen olmayan proteinler, proteoglikanlar, sitokinler ve büyüme hormonları oluşturur. İnorganik komponentleri; kemiğin kompresif gücünden sorumlu kalsiyum hidroksiapatit ve kalsiyum fosfattan oluşur. İnorganik maddeler, kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %50-60'ını oluşturur. Özellikle  $Ca^{+2}$  ve  $PO_4$  başta olmak üzere bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum inorganik maddeler arasında bulunur (13). Kemik matriksin bileşenleri Tablo 2'de gösterilmiştir (17).

**Tablo 2.** Kemik matriksin bileşenleri

Bileşen	Fonksiyon	Tipler	Özellikler
<b>Organik Matriks</b>			
<b>Kollajen</b>	Gerilim gücü sağlama	Primer olarak tip 1 kollajen. Kemikte en fazla tip 1 kollajen bulunur.	Organik matriksin %90'ı Yapı: iki $\alpha 1$ ve bir $\alpha 2$ zincirinin çeyrek atlamalı, bir fibril üretimi için düzenlenmiş.
<b>Proteoglikanlar</b>	Kompresif gücün kısmi sorumludurlar	Glikozaminoglikan (GAG)-protein kompleksleri	Mineralizasyon inhibisyonu
<b>Matriks Proteinleri (kollajen olmayanlar)</b>	Mineralizasyon ve kemik oluşumunu artırmak	Osteokalsin (kemik $\gamma$ -karboksiglumatik asid içeren protein [kemik Gla proteini]).	Osteoklastları etkiler; doğrudan kemik yoğunluğu regülasyonu; en çok kollajen olmayan matriks protein (%10-20'si).
		Osteonektin (SPARC).	Trombositler ve osteoblastlarca salgılanır; $Ca^{++}$ regülasyonu veya matriks mineral organizasyonunda rolü olduğu düşünülür.
		Osteopontin.	İntegrin'e benzer, hücre bağlayıcı protein.
<b>Büyüme Faktörleri ve Sitokinler</b>	Kemik hücresi farklılaşması, aktivasyonu, büyümesi ve turnover'ına yardım eder.	Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ), İnsülin-benzeri büyüme faktörü (IGF). İnterlökinler (IL-1, IL-6). Kemik morfojenetik proteinleri (BMP1-6).	Küçük miktarlarda kemik matriks içinde mevcut.
<b>İnorganik Matriks</b>			
<b>Kalsiyum Hidroksiapatit</b> [ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ]	Kompresif gücü sağlama		İnorganik matriksin büyük kısmını oluşturur, kollajen boşluklar arası primer mineralizasyon (delikler ve gözenekler), periferde sekonder mineralizasyon.
<b>Osteokalsiyum Fosfat</b>			Geriye kalan inorganik matriksi oluşturur.

### 2.1.1.5. Kemik beslenmesi:

Bir organ olarak kemikler kardiyak çıkışın (out put) %5-10'unu alırlar. Kemik kanlanması; besleyici arter sistemi (iç 2/3 lük kısmın yüksek basınçlı sistemi), metafizyel-epifizyel sistem ve periosteal sistem (dış 1/3 lük kısmın düşük basınçlı sistemi) tarafından sağlanır (Şekil 5).



Şekil 5. Kemik kan ve sinir sistemi şeması (Erişim 20.06.2019, <http://library.open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>'den uyarlanmıştır.) (18).

Besleyici arterler ana sistemik arterlerden köken alır. Diafizial kortekste bulunan foramen nutrisiyadan girerek medüller kanalda inen ve çıkan küçük arterlere dallanır. Havers sistemi içindeki damarlar aracılığıyla olgun diafiz korteksinin en az üçte ikisini besler. Besleyici arter sistemi yüksek basınçlıdır.

Metafizyel-epifizyal sistem eklem çevresi vasküler pleksuslardan doğar.

Periosteal sistem ise primer olarak olgun diafizyal korteksin en çok dış üçte birini besleyen kapillerlerden oluşur. Bu sistem düşük basınçlıdır (17).

Kemik sıvı bileşenlerinin %65'i ekstravasküler alanda, %12'si Haversiyen ve laküner alanda, %3'ü kırmızı kan hücrelerinde ve %20'si diğer alanlardadır. Hipoksi, hiperkapni ve sempatektomi durumlarında fizyolojik kemik kan akımı artar (17).

Spongiyöz kemik ve medüller kavite, kompakt kemiğin içinden geçen arterlerden beslenir. Arterler besleyici foramenlerden, diyafizdeki küçük deliklerden geçer. Spongiyöz kemikteki osteositler, kemiğe nüfuz eden ve kemik iliği boşluklarında dolaşan kanın içine giren periosteumun kan damarlarıyla beslenir. Kan, kemik iliği boşluklarından geçerken, damarlar tarafından toplanır, bu daha sonra foramen vasıtasıyla kemikten çıkar (18).

Kan damarlarına ek olarak, sinirler kemiğin metabolik olarak daha aktif bölgelerinde yoğunlaşma eğilimi göstererek aynı yolları izler. Sinirler ağrıyı hisseder, ayrıca sinirler kan dolaşımını düzenlemede ve kemik büyümesinde rol oynar (18).

#### **2.1.1.6. Kalsiyum ve fosfat deposu:**

İskelet, vücudun  $Ca^{+2}$  miktarının %99'unu içerdiği için,  $Ca^{+2}$  deposu olarak da görev yapar. Kan ve kemik arasında, devamlı bir  $Ca^{+2}$  alışverişi vardır. Serum kalsiyumunun primer hemostatik düzenleyicileri PTH ve 1-25 dihidroksi vitamin D3'tür. Gıdalardan emilen  $Ca^{+2}$ , süratle kemiklerde depo edilir. Kalsiyumun fazlası dışkı ve idrarla atılarak, kan  $Ca^{+2}$  düzeyinin yükselmesine engel olunur. Kandaki  $Ca^{+2}$  miktarı azaldığında ise kemikteki  $Ca^{+2}$  serbest hale gelir. Kemiğin kalsiyumu, biri süratli, diğeri yavaş iki mekanizma ile serbest hale getirilir. Bunlardan ilki, iyonların basit olarak hidroksiapatit kristallerinden interstisiyel sıvıya, buradan da zamanla kana geçmesidir. Erişkin kemikte, çok az kalsifiye olmuş yeni lameller kalsiyumu kolayca alır ve verir. Kan  $Ca^{+2}$  seviyesinin korunmasında bu lamellerin rolü, asıl fonksiyonları koruma ve destek olan lamellerinkinden daha önemlidir. Kalsiyumun serbest hale gelmesindeki ikinci yol ise, kemiği etkileyen hormonlara bağlıdır. PTH kemik matriksinin rezorbsiyonunu başlatan osteoklastları aktive edip sayılarını artırır ve sonuçta  $Ca^{+2}$  serbest hale gelir. Tiroid bezinin parafoliküler hücrelerinde sentezlenen kalsitonin, matriks rezorbsiyonunu inhibe eder. Kemik üzerindeki etkisi PTH etkisinin tersidir.

Kemik mineralinin anahtar bileşeni olan fosfor, enzim sistemlerinde ve moleküler etkileşimlerde önemlidir. Vücut fosfatının %85 kadarı kemikte depolanır. Plazma fosfatının çoğu bağlanmamıştır ve böbreklerin proksimal tübüllerinden geri emilir.  $PO_4$  idrarla atılır.  $Ca^{+2}$  ve  $PO_4$  regülasyonu Tablo 3 (18)'de gösterilmektedir.

**Tablo 3.** Kalsiyum ve Fosfat regülasyonu (19)

Parametre	Paratiroid hormon (PTH) (Peptid)	1,25-(2 OH) D (Steroid)	Kalsitonin (Peptid)
<b>Örijin</b>	Paratiroid bezin ana hücreleri	Böbreğin proksimal tübülü	Tiroid bezinin parafoliküler hücreleri
<b>Üretimi stimule eden faktörler</b>	Serum Ca <sup>2+</sup> azalır.	Yükselmiş PTH Azalmış serum Ca <sup>2+</sup> Azalmış serum iyonik P	Yükselmiş serum Ca <sup>2+</sup>
<b>Üretimi inhibe eden faktörler</b>	Serum Ca <sup>2+</sup> yükselir. Yükselmiş 1,25-2 (OH) D	Azalmış PTH Yükselmiş serum Ca <sup>2+</sup> Yükselmiş serum iyonik P	Azalmış serum Ca <sup>2+</sup>
<b>Hormon faaliyetine göre uç organlar üzerine etki</b>			
<b>Barsak</b>	Direkt etki yok Böbrekte 1,25-2 (OH) D üretiminin stimülasyonu ile barsak üzerinde indirekt olarak etki yapar.	Güçlü bir şekilde barsaktan Ca <sup>2+</sup> ve P absorpsiyonunun stimülasyonu	?
<b>Böbrek</b>	Proksimal tübülüs hücre mitokondrilerinde 25-(OH)D-1 $\alpha$ -OH'laz 25-(OH)D'ı 1,25-2 (OH) D'ye dönüşümü için stimule eder. Filtre edilmiş Ca <sup>2+</sup> 'nın fraksiyonel rezorpsiyonunu artırır. İdrarla P atılımını artırır.	?	?
<b>Kemik</b>	Kemiğin osteoklastik rezorpsiyonunu stimule eder. Preosteoklastların toplanmasını stimule eder.	Güçlü bir şekilde kemiğin osteoklastik rezorpsiyonunu stimule eder.	Osteoklastik kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. Normal insan fizyolojisindeki rolü?
<b>Ekstrasellüler sıvı ve serumda Ca<sup>2+</sup> ve P konsantrasyonları üzerine net etki</b>	Artmış serum Ca <sup>2+</sup> Azalmış serum P	Artmış serum Ca <sup>2+</sup> Artmış serum P	Azalmış serum Ca <sup>2+</sup> (geçici)

**2.1.1.7. Kemiğe etki eden hormonlar:**

Parathormon ve kalsitonin dışında kemiğe etki eden başka hormonlar da vardır. GH özellikle epifizyel kıvrımda uyararak kemik uzamasını sağlar. GH kalsiyumun barsaktaki emilimini, idrardaki atılımından daha çok artırarak pozitif bir Ca<sup>+2</sup> dengesi oluşturur. İnsülin ve somatomedin bu etkiye katkıda bulunur (17).

Cinsiyet hormonları kemikleşme merkezlerinin ortaya çıkışı ve gelişim zamanlarını etkileyerek kemik yapımını uyarır. Östrojen, kemik rezorpsiyonunu önler, ancak östrojen tedavisi kemik oluşumunu da azaltır (17).

Kortikosteroidler, kollagen sentezini önler ve osteoblastların verimliliğini azaltarak kemik kaybını artırır (17).

Tiroid hormonları, kemik rezorpsiyonunu, yapımdan daha çok etkileyerek osteoporozu neden olur (17).

### **2.1.2. Kemiğin Oluşumu**

Kemik; osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile intramembranöz kemikleşme veya daha önce var olan kırıkta matriks üzerine kemik matriksinin çöküşü ile endokondral kemikleşme ile şekillenir. İkisinde de ilk oluşan ve geçici olan primer kemik dokusu, kısa süre sonra yerini sekonder (lameller) kemik dokusuna bırakır. Büyürken, primer yapı, rezorbe alanlar ve sekonder kemik yapı birlikte yan yana görülür (17).

#### **2.1.2.1. İntramembranöz kemikleşme:**

İntramembranöz kemikleşme; kafatasının düz kemiklerinin, mandibula, maksilla ve klavikuların gelişimi sırasında oluşur. Periosteumda kemik ilavesiyle kemik büyümesinde ve kırıklarının iyileşmesinde kemiğin onarımı sürecinde önemli bir süreçtir. Mezankimel kök hücrelerin osteoprogenitör hücrelere farklılaşmasından türetilen fibröz membranın gelişmesiyle başlar. Osteoprogenitör hücreler daha sonra osteoblastlara ayrışır ve bu yeni kemik dokusunun oluşumuna yol açar (20).

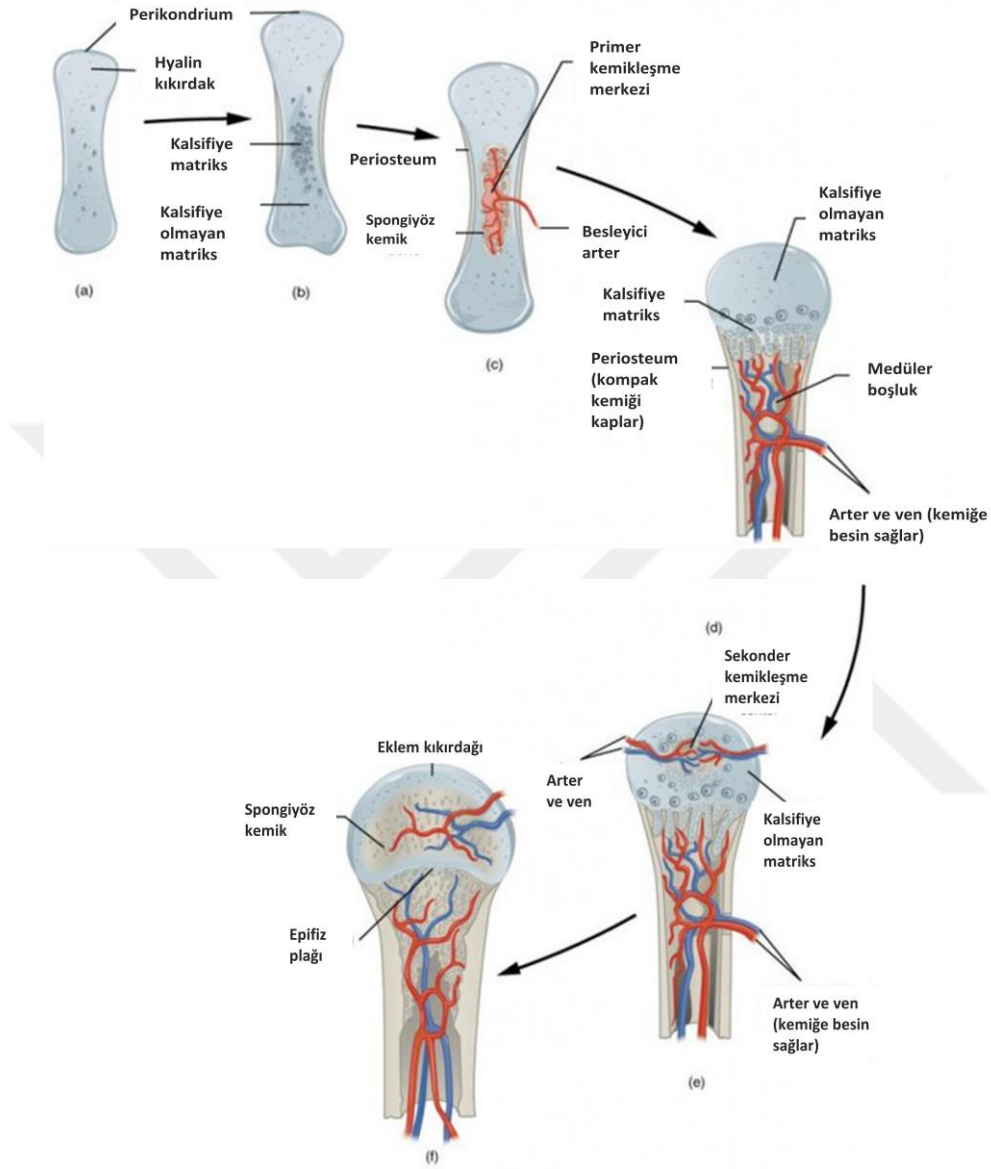
#### **2.1.2.2. Endokondral kemikleşme:**

Endokondral kemikleşme; vertebral kolon, pelvis, üst ve alt ekstremitelerde kemiklerinin gelişimi ve epifiz büyüme plaklarında postnatal boyuna büyüme sırasında oluşur. Aynı zamanda travma sonrası yüksek mobilite ve/veya kötü vaskülarizasyon bölgelerinde kırıkların iyileşmesinde rol oynar. Gelişme sırasında, endokondral kemikleşme, mezankimel kök hücrelerin kondroblastlara yoğunlaşması ve farklılaşmasıyla bir kondrogenezin ilk oluşumunu içerir (20,21).

Kondrogenez, duran, çoğalan, hipertrofi ve apoptoz geçiren farklı kondrositlerden oluşur. Hipertrofi geçiren kondrositler, osteoprogenitör hücrelerin dağıtımına ve kemikleşme merkezlerinin oluşumunda kondrogenezin vasküler istilasını indüklemek için vasküler endotel büyüme faktörleri gibi anjiyojenik faktörler salgılar. Bu, kondrogenezin, yeni oluşan kemikle kademeli yer değişmesiyle sonuçlanır (22).

GH, insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), tiroid hormonu, PTH, kemik morfogenetik proteinleri ve fibroblast büyüme faktörleri gibi endojen mediatörler,

kondrogenez ve endokondral kemikleşmenin düzenlenmesinde rol oynar (21) Bu kemikleşme türü kısa ve uzun kemiklerin şekillenmesinden sorumludur (Şekil 6).



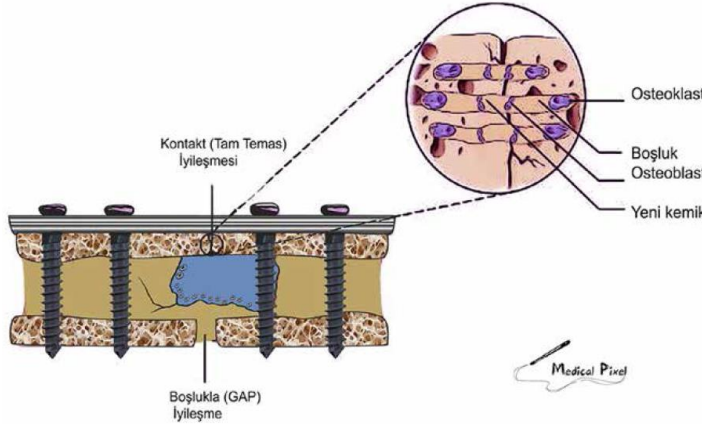
**Şekil 6.** Endokondral kemikleşme. (a) Mezankimel hücreler, kemik iskeletinin kıkırdak modelini üreten kondrositlere farklılaşır. (b) Kıkırdak modelinin kenarındaki kan damarları kemik yakasını tutan osteoblastları getirir. (c) Kılcal damarlar kıkırdağa nüfuz eder, kıkırdak modelinin içinde kemik biriktirir ve primer kemikleşme merkezini oluşturur. (d) Kıkırdak ve kondrositler kemiğin uçlarında büyümeye devam ederken medüller kavite genişler ve yeniden şekillenir. (e) Sekonder kemikleşme merkezleri doğumdan sonra gelişir. (f) Hiyalin kıkırdak, epifiz plağında ve eklem yüzeyinde eklem kıkırdağı olarak kalır (Erişim 21.06.2019, <http://library.open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-4-bone-formation-and-development/>'den uyarlanmıştır.) (23).

## 2.2. KIRIK İYİLEŞMESİ (KAYNAMASI)

Kırık iyileşmesi, kırık olduğu anda başlar ve kırık uçları arasının düzenli kemik dokusu ile birleşmesine kadar sürer (24). Primer ve sekonder kırık iyileşmesi olarak iki şekilde incelenir.

### 2.2.1. Primer Kırık İyileşmesi

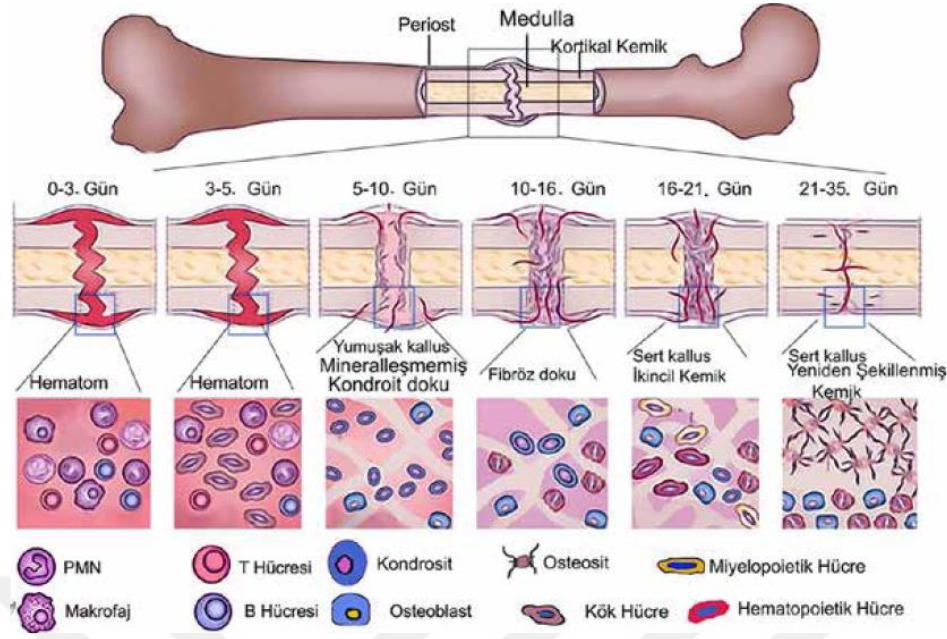
Fragmanlar arasında hareketin olmadığı durumlarda, anatomik redükte pozisyonda doku kanlanmasında herhangi bir bozukluk yoksa kallus dokusu oluşmadan, osteoblast ve osteoklast aktivitesiyle gerçekleşen iyileşmedir. Kırık, tam denge ve rijid tespit mevcudiyetinde primer iyileşir (13). Kontakt iyileşmede, kırık uçları arasında doğrudan bağlantı varsa, osteonların uzanımıyla lamellar kemik oluşur. Gap iyileşmede ise kırık uçları arasında boşluk  $<1$  mm olduğunda osteoblastlar örgü kemik oluşturur ve yeniden şekillenme ile normal lamellar kemik dokusuna dönüşür (Şekil 7) (25).



**Şekil 7.** Primer kemik iyileşmesinin tipleri; kontakt iyileşme kırık fragmanları arasındaki mesafe  $0,01$  mm'den az ise ve gap iyileşme kırık fragmanları arasındaki mesafe  $800 \mu\text{m} - 1$  mm arası ise oluşur (Tanrıkulu S, Gönen E, Kırık iyileşmesi, TOTBİD Dergisi 2017'den uyarlanmıştır.) (13).

### 2.2.2. Sekonder Kırık İyileşmesi

Sekonder iyileşmede kırık fragmanları arasında hareket olduğunda ilk olarak yumuşak kallus, sonrasında da sert kallus oluşur. Kırık bölgesinde subperiosteal alanda intramembranöz kemikleşme ile medüller sert kallus, kırık uçlarında ve periost dışında endokondral kemikleşme ile yumuşak kallus oluşur (Şekil 8) (13).

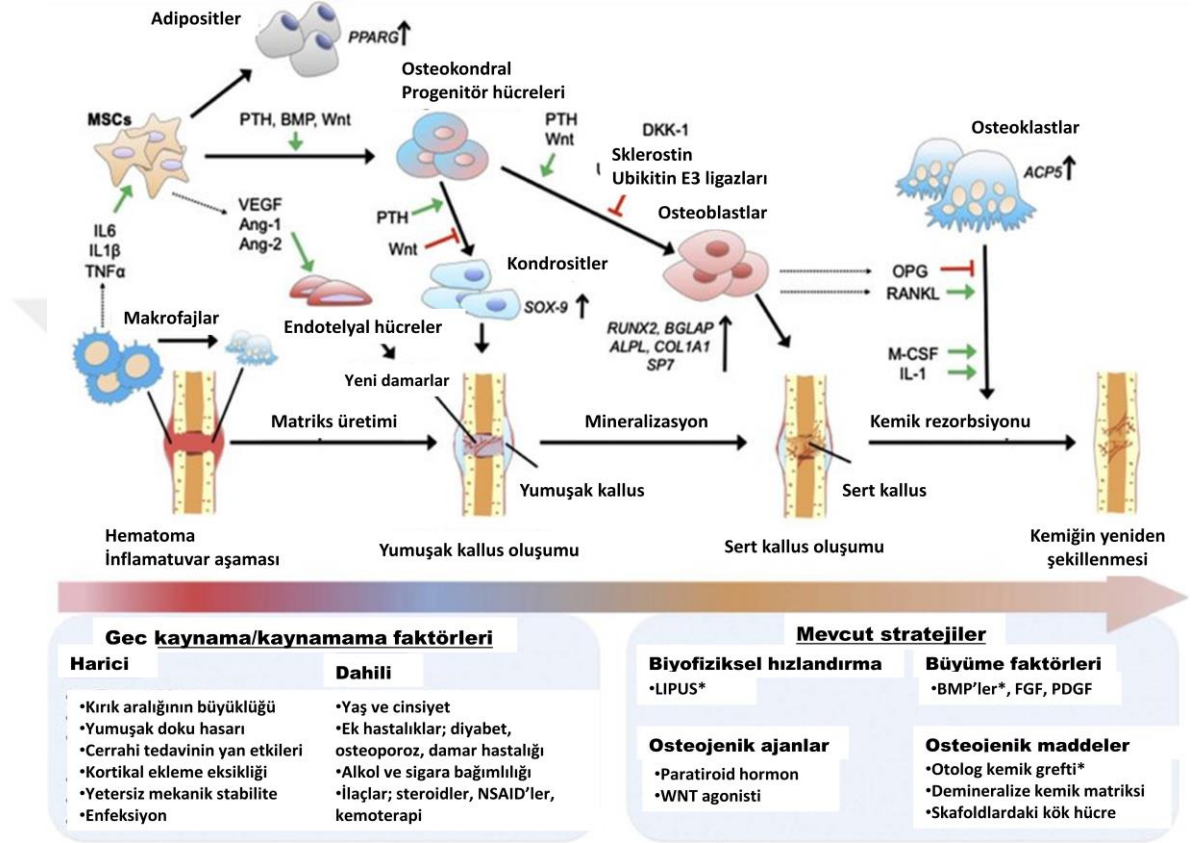


**Şekil 8.** Sekonder kemik iyileşmesinin aşamaları. İnflamatuvar faz, onarım fazı, yumuşak kallus fazı, sert kallus fazı ve yeniden şekillenme fazından oluşur. Her iyileşme döneminde yoğun bulunan primer hücre çeşitleri gösterilmiştir. Zaman değerleri Rat femuru için bildirilen temsili değerlerdir (Tanrıkulu S, Gönen E, Kırık iyileşmesi, TOTBİD Dergisi 2017'den uyarlanmıştır.) (13).

### 2.2.3. Kırık İyileşmesinin Evreleri

Normal kırık iyileşmesi, sistemik olarak dolaşımdaki faktörlerden etkilenen hücresel olayları içeren karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir (Şekil 9). Hematom ve enflamasyon; yumuşak doku hasarı, damar bozulması ve eşzamanlı kemik nekrozu olan yaralanmaya hemen verilen reaksiyonlardır. Hematoma cevaben, makrofajlar ve trombositler gibi inflamatuvar hücreler, kırık bölgelere kan akışını ve hücre göçünü artırmak için sitokinleri salgılar (26). Osteoklastlar kemik kalıntılarını rezorbe etmek için aktive edilir ve sitokin salınımı ile uyarılan mezankimel kök hücreler (MSC'ler) kırığa yerleşir. Enflamatuvar cevap 24 saat içerisinde tepeye ulaşır ve 7 gün sonra düzelir (25). Bir sonraki aşamada, periosteum ve endosteumdan MSC'ler çoğalır ve kondrositlere farklılaşır; bu da kırıkdaktan oluşan yumuşak kolajen bakımından zengin bir kallusun oluşumuna katkıda bulunur. Kan damarları da besin sağlamak için kallusa sızar. İyileşme devam ettikçe, kırıkdak; olgunlaşmamış örgü kemiğe geçişi sağlayan sert kallusu oluşturmak için mineralleşmeye uğrar. Osteoblastlar, bu ilerleyici aşamada, tip I kollajeni sentezleyerek ve doğrudan kalsifiye doku üreterek

önemli bir rol oynar. Son yeniden şekilleme aşamasında, fazla kemik kallusu osteoklastlar tarafından rezorbe edilir ve sağlıklı kemik morfolojisi ve mekanik özelliklerinin geri kazanılmasıyla, osteoblast ve osteoklast aktivitesinin döngüleri sonuçlanır (27).



**Şekil 9.** Kırık iyileşme evrelerinin şeması, çeşitli kaynamama faktörlerinin yanı sıra mevcut klinik tedavilere genel bakış. \* FDA-onaylı kırık tedavilerini gösterir. (Kısaltmalar: ACP5: Asit Fosfataz 5; ALPL: Alkalın Fosfataz; ANG: Anjiyopoietin; BGLAP: Kemik Gama Karboksil Glutamat Proteini (Osteokalsin); BMP: Kemik Morfogenetik Proteini; COL1A1: Kollajen Tip I, alfa 1; DKK-1: Dickkopf-ilişkili Protein 1; IL: Interlökin; LIPUS: Düşük Yoğunluklu Pulse Ultrason; M-CSF: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör; MSC: Mezenkimal Kök Hücre; OPG: Osteoprotegerin; PPARG: Peroksizom Proliferatör-Aktive Gama Reseptörü; PTH: Paratiroid Hormon; RANKL: Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand; RUNX2: Runt-İlişkili Transkripsiyon Faktörü 2; SOX-9: Cinsiyet tayin eden bölge Y-Kutu 9; SP7: Osteriks; TNF $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör Alfa; VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü; Wnt: Wingless-Related Integration Site) (Wanga Y, Newman MR, Benoit DSW, Development of controlled drug delivery systems for bone fracture-targeted therapeutic delivery, Eur J Pharm Biopharm 127, 2018'den uyarlanmıştır.) (27).

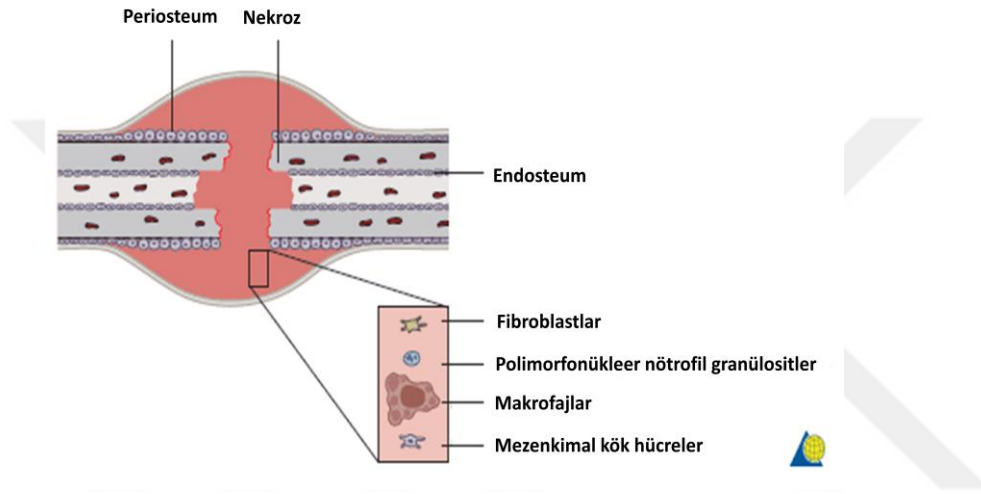
### 2.2.3.1. İnflamatuvar (hematom, yangı) dönem (1-4 gün):

Tüm doku travmalarında, dolayısıyla kırıklarda, ilk verilen yanıt “inflamasyon” yani “yangı”dır. Bu dönem ilk 3-4 günlük süreyi kapsar. İnflamasyon fazında hasarlı, nekrotik dokular yok edilir, inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler sayesinde anjiyogenezis uyarılır. Kırık hattındaki kemikte bulunan mezankimel ve osteoprogenitör hücreler, fibroblastlar, endosteal yüzeydeki osteoblastlar çoğalarak granülasyon dokusu oluşumunu sağlar (13).

Travmanın şiddetine bağlı olarak, kemik kırıldığında kırık uçları, periost, çevre yumuşak dokular ve damarlar yaralanır. Vazodilatasyon ve beraberinde plazma eksudasyonu nedeniyle, kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur. Kırık kemik uçları arasına ve uçların etrafına kan ve lenf sıvısı toplanır. Bu birikintiyeye kırık hematomu denir. Bu sıvı birikerek periostu kaldırır. Trombosit ve trombotik faktörler, kanamanın durmasını ve pıhtılaşmayı sağlamak için bu bölgeye toplanır. Pıhtılaşma ile birlikte kırık uçları arasında, periost altında ve periost yırtılmışsa bunun etrafında hematom oluşur. Hematom sağlam yumuşak dokular tarafından sarılır (24). Kırık hematomu ortamında bulunan trombositler ve ortamdaki diğer hücreler büyüme faktörü ile birlikte diğer proteinleri [Epidermal büyüme faktörü (EGF), Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Trombositten üretilmiş büyüme faktörü (PDGF), Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ), Kemikten türetilmiş büyüme faktörü (BDGF), İnterlökin-1 (IL-1)] salar. Bunlar, kırık iyileşmesinde önemli olan hücre göçü, periosteal hücre çoğalması ve onarım dokusu matriksinin sentezi için gereklidir.

Komşu Haversiyen sistemler arasında fazla anastomoz bulunmadığı için, kırık uçları arasında iki tarafta da belli bir mesafeye kadar alandaki dolaşım durur. Buradaki osteositler lizise uğrayarak yerlerini boş lakunalar alır. Sonuçta kırık alanında, kemik dokuda daha geniş olmak üzere nekroz bölgesi oluşur. Kırık uçlarda 1-5 mm arasında nekroz gelişir. Kırık uçları ve çevre dokulardan prostoglandinlerin salınımı yanında ortamdaki nekrotik materyalin varlığı akut inflamasyonun başlatılmasında önemli rol almaktadır. Kırık bölgesindeki hematom 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Fibrinojen eklenen lizin, fenilalanin, gamaglobulin ve albuminle fibrine dönüşür. Polimorf nüveli lökositler ve makrofajların damar dışına göç etmeleri ile fibrin matriks oluşur. Ayrıca makrofaj, histiosit ve fibroblastların yaptığı kollajen de fibrin matriksi oluşumuna etkilidir. Fibrin açısından da kemik yapımı için gerekli hücre

çoğalması başlar. Bu dönemde fibrin matriksi içindeki öncü hücreler, lokal biyolojik etkilerle değişik dokuları oluşturmak için farklılaşmaya hazırdır. Kırık bölgesinde ortamın pH'ı asitken, daha sonra yavaş yavaş nötrale döner ve sonra hafif alkali seviyede kalır. Büyük kırıklarda makrofaj monositler, bütün vücudu etkileyen bir sitokin olan IL-1 salgılar. IL-1 yaralanma bölgesinde lenfositlerin göçü ile kemik rezorbsiyonunu sağlar ve orta beyin aracılığıyla ateş oluşturur. IL-1 ayrıca kaslardan Prostaglandin-E2 (PG-E2) oluşumunu artırır (Şekil 10).



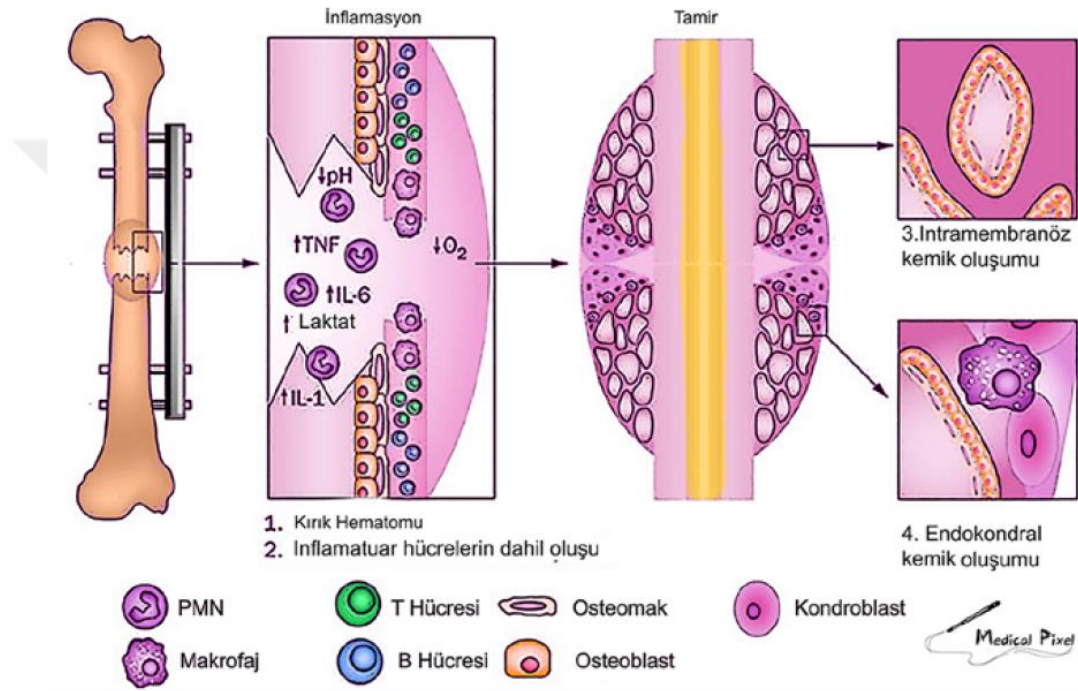
**Şekil 10.** İnflamasyon aşaması. Tipik inflamatuvar kaskadıyla granülasyon dokusunda çözülen hematoma oluşumu (Erişim 17.08.2019, [https://www2.aofoundation.org/wps/portal/surgerymobile?contentUrl=/srg/popup/further\\_reading/PFxM2/12\\_33\\_biol\\_fx\\_heal.jsp](https://www2.aofoundation.org/wps/portal/surgerymobile?contentUrl=/srg/popup/further_reading/PFxM2/12_33_biol_fx_heal.jsp)'den uyarlanmıştır.) (28).

### 2.2.3.2. Onarım (reperasyon) dönemi (2-40 gün):

#### Kallus oluşumu

Hasarlı dokunun yerini iyileşme dokusunun almasıyla, artan hücre sayısı ve matriks üretimi ile birlikte onarım başlar. İyileşme sürecinde BMP2, mezankimel hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve hücre göçünde önemli role sahiptir. Hematomun ardından fibrinden zengin granülasyon dokusu oluşur. Kırık uçları arasında santral bölgede ve periostun dış kısmında endokondral kemikleşme başlar, daha çok fibröz ve kırık dokusu içeren yumuşak kallus oluşur. Bu kallus; kırık dokusu matriksin mineralizasyonu, kondrositlerin apoptozu, damarlanma, osteoblastların çoğalması ve endokondral kemikleşme ile sert kallusa dönüşür. Hayvan

çalışmalarında, yumuşak kallus oluşumunun 7-9. günlerde başladığı, matrikste proteoglikan ve tip 2 kollajen seviyesinde artış olduğu görülmüştür (12). Kırık bölgesinde subperiosteal alanda fragmanları birbirine bağlayan intramembranöz kemikleşme ile sert kallus oluşur. İntramembranöz kemikleşmede mezankimel kök hücreler osteoblastlara farklılaşır ve doğrudan kemik dokusu oluşur. TNF beta (TNF B2 ve 3) etkisiyle kırıkta oluşumu ve endokondral kemikleşme uyarılırken; BMP5 ve 6, intramembranöz kemikleşme için gerekli hücre çoğalmasını sağlar (Şekil 11) (29).



**Şekil 11.** Sekonder iyileşmede, intramembranöz ve endokondral kemikleşme bir arada izlenir. (Tanrıku S, Gönen E, Kırık iyileşmesi, TOTBİD Dergisi 2017'den uyarlanmıştır.) (13).

### Damarlanma

İyileşme sürecinin başarısı, yeniden kanlanmanın sağlanmasına bağlıdır. Endokondral kemikleşmede kondrosit apoptozu, hücrelerin ve matriks dokusunun uzaklaştırılması, kan damarlarının bu bölgeye doğru büyümesi ve ilerlemesini sağlar. Damarlanma anjiyopoetine ve VEGF'ye bağımlı olarak iki yoldan gerçekleşir. İyileşmenin erken dönemlerinde anjiyopoetin 1 ve 2 seviyesi artar. Osteoblastlardan ve hipertrofik kondrositlerden salınan VEGF, damarlanmada kritik role sahiptir; endotelial mezankimel hücre çoğalmasını uyarır, damar invazyonunu sağlayarak avasküler kırıkta dokusunun vasküler kemik dokusuna dönüşümünü sağlar.

Anjiyogeneziste BMP'ler VEGF ile sinerjistik etki gösterir; ayrıca mekanik uyarı kırık bölgesinde VEGFR-2 reseptörü üzerinden anjiyogenik etki gösterir (30).

### **Mineralizasyon ve kırıkta kallus rezorpsiyonu**

Yumuşak kallusun sert kallus ile yer değiştirmesi sürecinde M-CSF (makrofaj koloni uyarıcı faktör), RANKL (nükleer kappa ligand reseptör aktivatör), OPG (osteoprotegerin) ve TNF-alfa etkisiyle mineralize kırıkta doku rezorpsiyonu başlar. M-CSF, RANKL, OPG'nin örgü kemik yapımında osteoblast ve osteoklastlar üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir. TNF-alfa'nın kondrosit apoptozunu başlatmasının yanı sıra mezankimel kök hücreleri uyarıcı etkisi de vardır.

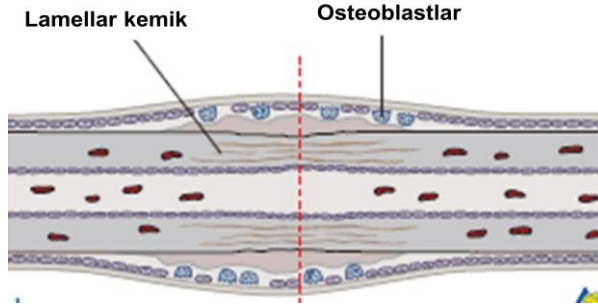
Kallus dokusundaki kondrositlerin sitoplazmasında ayrıştırılan kalsiyum granülleri, ekstrasellüler matrikse taşınarak buradaki fosfat ile birleşir ve mineral depolanması başlar. Kalsiyum fosfat depolarından apatit kristaller oluşur. Yapılan çalışmalarda mineralizasyona; Tip 1 kollajen, osteokalsin, osteonektin ve alkalin fosfataz seviyelerine bakılarak sert kallus oluşumunun 14. günde en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Sert kallus oluşumu arttıkça, mineralize kırıkta, örgü kemik ile yer değiştirir ve iyileşme dokusu mekanik olarak daha rijid hale gelir.

Onarım kırık uçlarında birleşme olana, kortikal kemik uçlarında devamlılık sağlanana kadar sürer. İyileşme dokusu oluşumunun hızı, miktarı, içeriği ve şekli değişkenlik gösterebilir. Kemiğin kansellöz ya da kortikal yapısı, çevre yumuşak doku desteği, stabilitesine göre iyileşme değişkendir (13).

### **2.2.3.3. Kemiğin yeniden şekillenme (remodeling) dönemi:**

Sert kallus dokusu stabiliteyi sağlayan rijid bir yapı olmasına rağmen, normal kemiğin biyomekanik özelliklerine sahip değildir. Sert kallusu santral kavitesi olan lamellar kemiğe dönüştüren bir yeniden şekillenme sürecine ihtiyaç vardır. Rezorptif fazda IL-1 ve TNF alfa'nın seviyesinde artış görülür (31). Bir taraftan osteoklastların etkisiyle sert kallus rezorpsiyonu, diğer taraftan osteoblastların etkisiyle lamellar kemik oluşumu denge içinde gerçekleşir. Kırık onarımı esnasında 3-4. haftalardan itibaren başlayan yeniden şekillenme süreci, klinik olarak iyileşme sonrası da yıllarca devam edebilir. Kemik, maruz kaldığı streslere bağlı olarak yeniden şekillenir. Aksiyel yüklenmeyle birlikte, kristalize dokuda oluşan elektriksel polariteye bağlı, elektropozitif konveks yüzeyde osteoklast, elektronegatif konkav yüzeyde osteoblast aktivitesini uyarır. Eksternal kallus dokusu lamellar kemiğe, internal kallus medüller

kaviteye dönüşür. Onarım fazında oluşan örgü kemik, lamellar kemikle yer değiştirir ve iyileşme süreci tamamlanır (13) (Şekil 12).



**Şekil 12.** Yeniden şekillenme aşaması. Örgü kemiğin, yüzey erozyonu ve osteonal yeniden şekillenme yoluyla lameller kemiğe dönüşümü (Erişim 17.08.2019, [www2.aofoundation.org/wps/portal/surgerymobile?contentUrl=/srg/popup/further\\_reading/PFxM2/12\\_33\\_biol\\_fx\\_heal.jsp](http://www2.aofoundation.org/wps/portal/surgerymobile?contentUrl=/srg/popup/further_reading/PFxM2/12_33_biol_fx_heal.jsp)'den uyarlanmıştır.) (28).

## 2.2.4. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

### 2.2.4.1. Yerel faktörler:

1. Travmanın derece ve etkisi
2. Kırık uçlarının birbirine göre konumu
3. Kırık yerinin dolaşımı
4. Eklem içi kırıklar
5. Kırılan kemiğin türü
6. Kırık çizgisinin özelliği
7. Cilt ve yumuşak doku yaralanması
8. Yerel bir enfeksiyon varlığı
9. Yerel patolojik koşullar
10. Kırığın açık kırık olup kırık hematomunun dışarı akması
11. Elektrik akımı
12. Kırık bölgesinde denervasyon olması
13. Yeterli tespit yapılmaması veya tespit süresinin kısa tutulması

### 2.2.4.2. Genel faktörler:

**Yaş:** Azalan yaşla orantılı olarak mezankimel hücre farklılaşması, yeni kemik dokusu gelişmesi ve kırığın yeniden şekillenmesi hızlanır (17).

**Genel durum:** Diyabet, anemi, tüberküloz, raşitizm gibi hastalıklar ve beslenme bozuklukları kırık iyileşmesini geciktirir. İltihabi olaylar (tüberküloz, kronik hastalıklar), hiperemi nedeniyle  $Ca^{+2}$  tuzlarının çözünmesini etkiler. Artan lökositlerin proteolitik enzimleri, matriksin bozulmasına neden olur ve osteoid oluşumunu engeller (32).

### **Hormonlar:**

**Büyüme hormonu:** İnsülin ve büyüme hormonu gibi anabolizan hormonlar kırık iyileşmesini hızlandırmaktadır. Proteine bağlı  $Ca^{+2}$  artışını etkileyerek kırık iyileşmesine yardımcı olur. Kallus hacminde artışa sebep olur.

**Kalsitonin:** Kalsitonin PTH'nun antagonistidir. Hem kompakt, hem de trabeküler kemik yapımını artırır. Osteoklastları inhibe ederek kemik çözünmesini azaltır. Kalsitonin dozu ve yeni kemik oluşumu arasında doğru orantı vardır, fakat iyileşmeyi olumlu yönde etkileme mekanizması henüz açıklanamamıştır.

**Östrojen:** Kemik çözünmesini engelleyici etkisi vardır.

**Kortikosteroidler:** Kollajen sentezini inhibe ederek kemik oluşumunu engeller, çözünmesini artırır. Mezankimel hücrelerden osteoblast gelişimi ve matriks oluşumu için gerekli yapı taşlarının sentezini yavaşlattığından, kırık iyileşmesini geciktirir. Kortizon, aynı zamanda kallus oluşumunu azaltır. FGF, EGF ve PDGF üzerine antagonist etki yaparak kırık iyileşmesini olumsuz etkiler (24).

**Tiroid:** Kemik çözünmesini, oluşumundan daha çok tetikler. PTH gibi kemiğin yeniden şekillenmesine yardım eder (17,24).

**Paratiroid hormon:** Kalsiyum, fosfat ve D vitamini metabolizmasını etkileyerek kemik mineral dengesinde kilit role sahiptir. Plazmadaki kalsiyum seviyesini ve böbrekteki fosfat fitrasyonunu düzenler. Sürekli salınımı osteoklastik aktiviteyi uyarırken; aralıklı ve dengeli salınımının osteoprogenitör hücreleri etkileyerek, osteoblastik aktiviteyi artırarak kırık iyileşmesini uyardığı ve hızlandırdığı bilinmektedir. Çalışmalarda, paratiroid hormon kullanılan hastalarda kemik kütlelerinin arttığı, kırık riskinin azaldığı, kırık iyileşmesinin hızlandığı görülmüştür. PTH, osteoklast sayısını artırıcı, kemiğin yeniden şekillenmesini uyarıcı ve osteositleri uyararak osteolizi hızlandırıcı etkileri vardır. Osteoblastların üzerine dolaylı etkisi olsa da, net sonuç kemik kaybı ve kırık iyileşmesinin yavaşlamasıdır (17,33).

**Vitaminler:** A vitamini normal dozda mezankimel hücre farklılaşmasını uyararak kırık iyileşmesine yardım eder. Eksikliğinde osteoblast düzenlenmesinde ve osteoklast aktivitesinde bozulma olur ve kemik oluşumu engellenir (34). A vitamini fazlalığında ise hücre çoğalmasının olmamasıyla birlikte kırıkta kolonlarında erozyon oluşur. Osteoklastlara dönüşüm fazla uyarılır ve kırık iyileşmesi gecikir (24). C Vitamini, dolaylı yoldan kemik iyileşmesini olumlu etkiler. D Vitamini, normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırır. D Vitamini eksikliğinde  $Ca^{+2}$  düzeyi düşer ve kemik kalsifikasyonu zayıflar. Kalsiyumun kemikten kana geçişi yanında, kemik hücrelerinde sitrat üretimini artırır. Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme evresinde rol oynar. Sonuç olarak; D Vitamini normal dozda kırık iyileşmesini hızlandırırken, toksik dozda olumsuz etki eder (24). B6 Vitamini eksikliği ve K Vitamini antagonistleri ise kırık iyileşmesine olumsuz etki eder (24,33).

**İlaçlar:** Kondroitin sülfat, hiyalüronidaz ve dikumaral kırık iyileşmesine yardım eder. Deneysel çalışmalarda L-Dopa ve klonidinin büyüme hormonunu arttırarak kırık iyileşmesini olumlu etkilediği gösterilmiştir (17,24). İndometazinin yüksek dozlarda kırık iyileşmesini durdurduğu bilinmektedir. Lazer tedavisinin deneysel kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir (32,24).

**Hiperbarik oksijen:** Günde iki saat kadar 2–3 atmosfer basıncında uygulanan oksijen uygulanmasının kırık iyileşmesine yardım ettiği gözlenirken, 6 saat/gün dozda uygulamaların kırık iyileşmesini geciktirdiği izlenmiştir (24).

**Kırık bölgesi egzersiz ve stresleri:** İyi redükte ve tespit edilmiş kırık kemiklere erkenden fonksiyon ve kontrollü yük verilir veya yürütülürse kemik gelişimi uyarılarak iyi sonuç alınmaktadır (17,24). Bunun nedeni PGE–2 miktarının artması ve bu bölge dolaşımına olumlu bir etkisi olmasıdır.

**Elektriksel uyarım ve ultrason:** Gecikmiş kaynama ve kaynamama tedavisinde elektromanyetik uyarı %64-85 arası değişen başarı oranları bildirilmiş, ancak hala taze kırıkların tedavisinde etkili olduğu ispatlanamamıştır.

#### **2.2.4.3. Kırık iyileşmesinde biyokimyasal faktörler:**

Kırık iyileşmesinde biyokimyasal faktörler Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Kırık iyileşmesinde biyokimyasal faktörler (13).

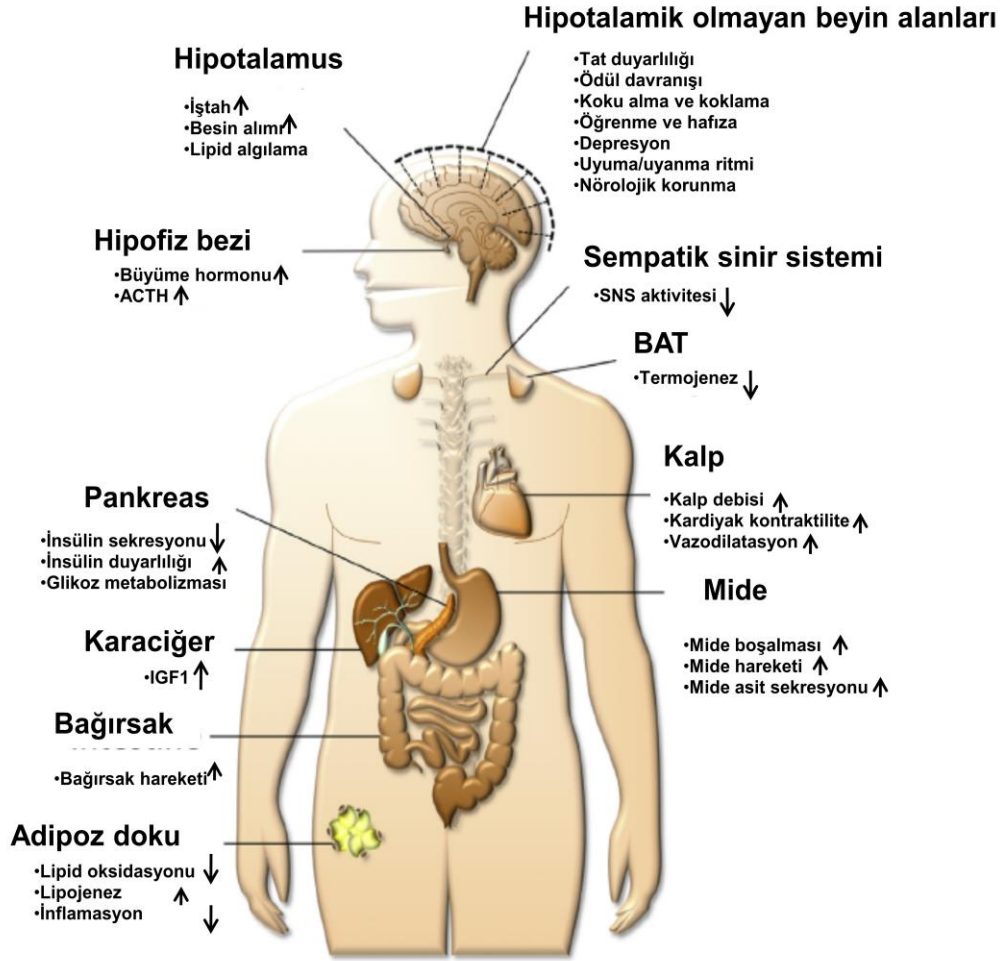
<b>Biyokimyasal Sinyal</b>	<b>Etkileri</b>	<b>Yükseldiği Fazlar</b>
Bone Morfojenik Proteini (BMP)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mezankimel kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşması</li><li>• Matriks sentezi</li><li>• Hücre migrasyonu</li><li>• Kemik oluşumunun aktivasyonu</li></ul> 15 çeşit BMP bulunmuştur: <ul style="list-style-type: none"><li>- Kemik iyileşmesi üzerine etkileri konusunda en çok çalışma yapılan BMP 2.</li><li>- Kaynamama ve osteonekroz tedavisinde en fazla çalışma yapılan BMP 7.</li><li>- Kırık iyileşmesi tedavisinde BMP kullanımı tartışmalı</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• İnflamatuvar evre</li><li>• Yumuşak kallus evresi</li><li>• Sert kallus evresi</li></ul>
Transforming Büyüme Faktörü Beta (TGF-B)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mezankimel hücrelerden Tip 2 kollajen ve proteoglikan sentezini uyarır</li></ul> Osteoblast, kondrosit ve fibroblastlar üzerindeki etkileriyle; <ul style="list-style-type: none"><li>• matriks oluşumunu</li><li>• damarlanmayı</li><li>• enkodral kemikleşmede kalsifikasyonu</li><li>• kırık kallusunda kırıkta ve kemik oluşumunu kontrol ettiği düşünülüyor.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kırık hematomu oluşmasıyla artar</li><li>• Yeniden şekillenme safhasına kadar yüksek</li><li>• Özellikle yumuşak kallus evreleri</li><li>• Sert kallus evreleri</li></ul>
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mezankimel kök hücre çoğalmasında,</li><li>• kırıkta oluşumu</li><li>• damarlanma</li><li>• osteoblastik aktivitede etkilidir.</li></ul> Kırık iyileşmesinde belirgin olarak FGF2 olmak üzere FGF1, FGFR1, FGFR4 ün etkili olduğu tespit edilmiştir.	<ul style="list-style-type: none"><li>• İnflamatuvar evre</li><li>• Yumuşak kallus evresi</li><li>• Sert kallus evresi</li></ul>
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nötrofillerin, makrofajların, öncül hücrelerin kırık bölgesine gelmesini sağlar.</li><li>• VEGF, IL6 seviyesini artırarak anjiyogenezisi uyararak iyileşmeye olumlu etkisi vardır.</li></ul> Kırık iyileşmesinde trikalsiyon fosfat ile birlikte hazırlanmış PDGF uygulamaları konusunda yapılan çalışmalar vardır.	<ul style="list-style-type: none"><li>• İnflamatuvar evre</li><li>• Yumuşak kallus evresi</li><li>• Sert kallus evresi</li></ul>
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 (IGF 2)	Kırıkta matriks <ul style="list-style-type: none"><li>• Tip 1 kollajen üretimini</li><li>• damarlanmayı</li><li>• osteoprogenitör hücre çoğalmasını uyarır</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yumuşak kallus evresi</li><li>• Sert kallus evresi</li><li>• Yeniden şekillenme evresi</li><li>- osteoklast fonksiyonlarını düzenleyerek</li></ul>
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Damarlanma osteoblast çoğalması ve farklılaşmasını uyarır.</li><li>• BMP ile birlikte VEGF uygulamaları üzerine çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yumuşak kallus evresi</li><li>• Sert kallus evresi</li></ul>

### 2.3. GHRELİN HORMONU

1999'da, Masayasu Kojima, Kenji Kangawa ve ark., ön hipofiz bezinden büyüme hormonu (GH) salımını uyarabilen büyüme hormonu salgılatıcı reseptör

(GHSR)1a için endojen ligand olarak gastrointestinal peptid hormonu ghrelini keşfetmiştir (35).

2000 yılında, Mark Heiman ve Matthias Tschöp, ghrelinin beyinde; gıda alımını, vücut ağırlığını, yağlanmayı ve glikoz metabolizmasını düzenlemek için hareket ettiğini keşfetmiştir (36). Ghrelinin, oreksijenik nöral devrelerin aktivasyonu yoluyla sistemik metabolizmayı modüle ettiği de bulunmuştur (37) (Şekil 13).



**Şekil 13.** Ghrelinin fizyolojik etkilerini gösteren şema (Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML et al., Ghrelin, Molecular Metabolism 4, 2015'den uyarlanmıştır.) (38).

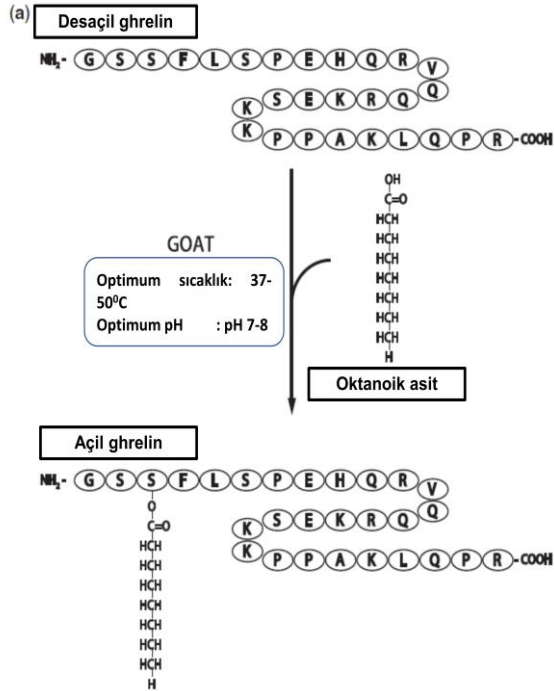
Ghrelin, GH salınımında (3), iştah düzenlemesinde (39) ve enerji dengesinde rolleri olan pleiotropik 28 amino asit peptid hormonudur (3); kemik metabolizması ve oluşumunda (40-43) ve kıkırdak metabolizmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Ortaya çıkan kanıtlar, ghrelin sinyallemesinin, osteoblastların ve osteoklastların ikili regülasyonu yoluyla kemik homeostazında potansiyel bir anabolik düzenleyici rolü



### 2.3.2. Açıl ve Desaçil Ghrelin

İnsan, rat ve faredeki ghrelin geninin 5 farklı ekzonunun birleşmesi ile 117 aminoasitten oluşan ve molekül ağırlığı 13 kDa olan pre-proghrelin molekülü şekillenir. Ghrelin bu yapıda 2 ve 3. ekzondan oluşur. 23 aminoasitten oluşan 1. ekzon kodlamaya katılmaz, artık kısım olarak ayrılır. Kalan parça artık 94 aminoasite sahiptir ve proghrelin olarak adlandırılır. Proghrelin molekülü de ayrılmaya uğrar ve 28 aminoasitten oluşan ghrelin molekülü ile 66 aminoasitten oluşan C-terminal parçası (C-ghrelin) ortaya çıkar. 28 aminoasitlik ghrelinin, 3. aminoasiti olan Serin'e n-oktanil grubu bir yağ asidi bağlanarak, ghrelinin, büyüme hormonunun da salınımını sağlayan aktif formunu oluşturur. Bu formuna açıl ghrelin denir. Yağ asidi bağlanmamış formu ise desaçil ghrelin'dir (54). Ghrelin, açıl ghrelini (55) oluşturmak üzere ghrelin Oasiltransferaz ile post-translasyonel olarak açile edilir.

Desaçil ghrelin, kanda, açillenmiş ghrelin'den daha fazla miktarlarda dolaşır. Desaçil ghrelin, GHS-R1a'ya bağlanmaz ve endokrin aktivitesi yoktur (Şekil 15).



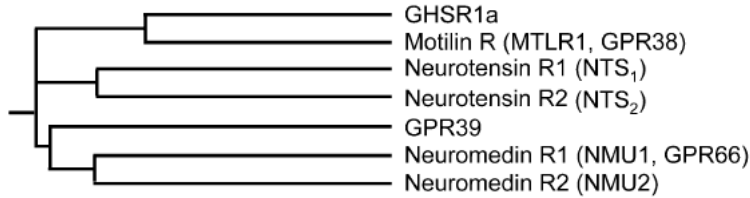
Şekil 15. İnsan ghrelinin yapısı ve oktanoik asitin GOAT ile modifikasyon işlemi (Kojima M and Kangawa K, Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*, 2005'den uyarlanmıştır.) (51).

### 2.3.3. Ghrelin Reseptörü

GHS-R insan ghrelin reseptörü geni, kromozom 3 üzerinde, q2627 konumunda tanımlanmıştır. Ghrelin reseptörü, 7 transmembran alanı (7TM) ile tipik bir G-protein-bağlı reseptör (GPCR)'dür; iki ayrı Haberci Ribonükleik Asit-messenger ribonucleic acid (mRNA) olarak ifade edilir. İlki, GHS-R tip 1a, ghrelin reseptörü olarak rolüne uygun bağlayıcı ve fonksiyonel özelliklere sahip bir 7TM GPCR'yi kodlar. Diğer GHS-R mRNA, tip 1b, alternatif ekleme ile üretilir. GHS-R geni 2 ekzondan oluşur; ilk ekzon TM1TM5'i ve 2'nci ekzon TM6TM7'yi kodlar. Tip 1b, yalnızca ilk ekzondan türetilir ve 7 TM alanından sadece beşini kodlar. Bu nedenle, 1b, 1a'nın kesik COOH-terminali şeklindedir ve fizyolojik olarak aktif değildir (56).

#### 2.3.3.1. Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör 1a (GHSR1a):

Moleküler olarak tanımlanmış ghrelin reseptörü GHSR1a, bir A reseptörü ailesi ve motilin (GHSR1a ile %52 homoloji), nörotensin 1 ve 2 (%35 homoloji), neuromedin reseptörleri 1 ve 2 (%30 homoloji) ve G protein-bağımlı orphan reseptör 39 (GPR39) (%30 homoloji) içeren ghrelin reseptör grubunun üyesidir (Şekil 16) (57). Sentetik GH salgılatıcılar GHS-R1a ile doğrudan bağlanarak, hipofiz bezi somatrop hücrelerinden GH salınımına yol açar. Ghrelin etkisini GHS-R1a üzerinden gösterir.

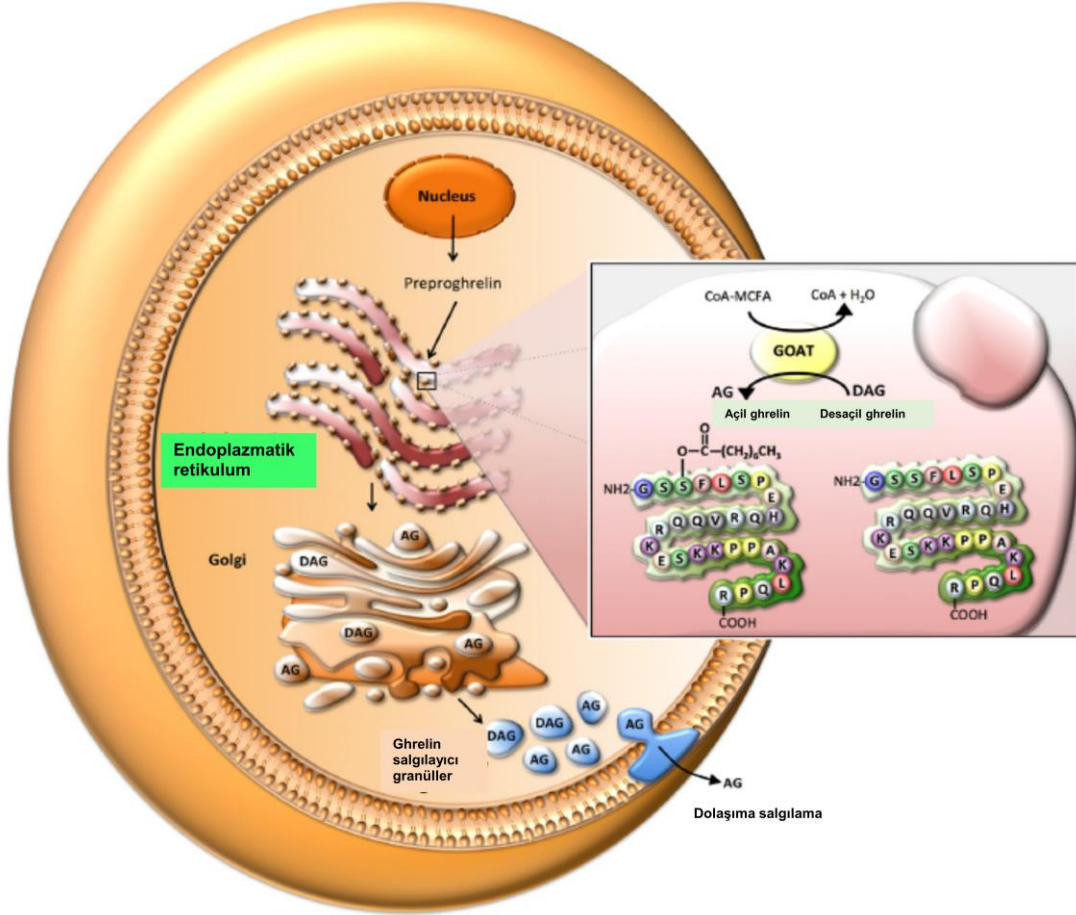


Şekil 16. Ghrelin reseptör ailesi (Alexander SPH, Mathie A, and Peters JA, Guide to receptors and channels (GRAC), 5th edition. Br J Pharmacol, 2011'den uyarlanmıştır.) (58).

#### 2.3.3.2. Ghrelin O-açıltransferaz:

Yang ve ark. (55) tarafından, 2008 yılında, ghrelinin açıl modifikasyonunu katalize eden bir enzim keşfedilmiştir. Pozisyona özgü yinelemeli BLAST ve önceden prokaryotlar, bitkiler, insanlar ve fareler dahil çeşitli türlerden membran-bağlı O-açıltransferaz (MBOAT) dizileri kullanarak, fare genomu tarafından kodlanan 16 MBOAT tanımlanmıştır. Sonra bunların klonları izole edilmiş ve onları heterolog hücre çizgilerinde eksprese edilen ghrelinin oktanolasyonunu katalize etme

yetenekleri açısından test edilmişlerdir. Bu enzimlerden sadece MBOAT4'ün, ghrelini oktanolatlayabildiği bulunmuş ve bu enzim ghrelin O-açıltransferaz (GOAT) olarak yeniden adlandırılmıştır. Bu enzimin dağılımı, ghrelini eksprese eden periferik dokular olan gastrointestinal sistem ve testis ile sınırlıdır. GOAT'ın optimum sıcaklığı 37-50<sup>0</sup>C'dir ve optimum pH aralığı pH 7-8'dir (59) (Şekil 17).



**Şekil 17.** Çeviri sonrası işlem ve ghrelinin açılışını üzerine şematik görünüm (Müller TD et al., Ghrelin, Molecular Metabolism, 2015'den uyarlanmıştır.) (38).

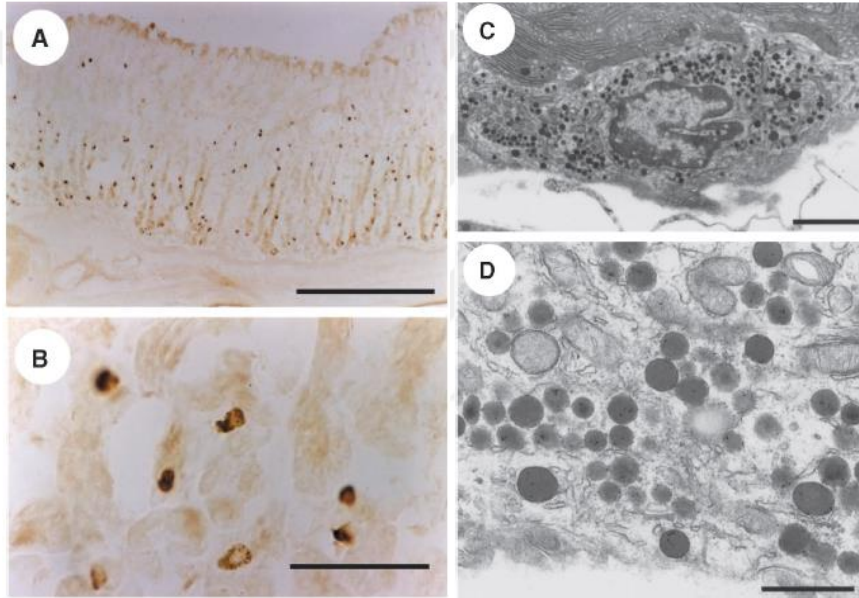
### 2.3.4. Ghrelinin Dokularda Dağılımı

Vücutta ghrelin üretimi ile ilişkili iki hüresel alan bulunmaktadır. İlki oksintik bez; ikincisi ise nöronal hücre gruplarının sinaptik ileti ile ghrelin salınımı yaptığı santral sinir sistemi. Ghrelin çoğunlukla mide fundus mukozası oksintik bezleri içindeki X/A benzeri hücreler tarafından üretilir (3). Bu hücreler rat ve insan sindirim sisteminde; ışık ve elektron mikroskopisi, immünohistokimyasal yöntem, ayrıca in situ hibridizasyon metodu kullanılarak tanımlanabilmiştir (60). Ghrelin

mRNA'sının ekspresyonu revers transkripsiyonu PCR yöntemiyle az miktarda da plasenta, testis, böbrek, hipofiz, prostat, ince barsak, pankreas, beyin ve diğer birçok organda gösterilmiş olması, onun birçok biyolojik aktivitede düzenleyici rol oynayan bir peptid olduğunu göstermektedir.

#### 2.3.4.1. Mide ve gastrointestinal organlar:

Ghrelin esasen midede üretilir. Midede, ghrelin içeren hücreler, fundusta pylorustan daha fazla bulunur (61,62). Hibridizasyon ve immünohistokimyasal analizler, ghrelin içeren hücrelerin, midenin mukozal tabakasında bulunan ayrı bir endokrin hücre tipi olduğunu göstermektedir (Şekil 18) (61).



**Şekil 18.** Midede ghrelin hücreleri. A: midede ghrelin-immünoaktif hücreler boyundan oksintik bezin tabanına kadar bulunur. Ölçek, 400 m. B: A'nın büyütülmüş şekli. Ölçek 40 m. C ve D: oksi bezinde bir ghrelin üreten hücrenin immünoelektron fotoğrafları. C: Bu oval hücre, sitoplazmasında; yuvarlak, kompakt, elektron yoğun granüllere sahiptir. Ölçek, 2 m. D: C'nin büyütülmüş şekli. Ölçek 500 nm. Sitoplazmada bulunan granüller, ghrelin için immüno gold boyamasıyla işaretlenir. [Kojima ve diğ., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 (3) ile Date ve diğ., a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000 (61)'den uyarlanmıştır.]

Oksintik mukozada dört çeşit endokrin hücre belirlenmiştir. Bunlar ECL, D, enterochromaffin (EC) ve X/A benzeri hücrelerdir. ECL hücrelerinde histamin ve

üroguanilin, D hücrelerinde somatostatin, EC hücrelerinde serotonin, X/A benzeri hücrelerde ise açıl ghrelin sentezi mevcuttur. X/A benzeri hücreler fonksiyonel oksintik bezlerde endokrin hücre miktarının % 20'sini oluşturmaktadır. Açıl ghrelin immunoreaktif hücreler; duodenum, jejunum, ileum, meme ve kolonda bulunmaktadır (51). İntestinal sistemin açıl ghrelin konsantrasyonu duodenumdan kolona doğru azalmaktadır. Midede olduğu gibi bağırsakta da, n-oktanil açıl ghrelin ve des-açıl ghrelin formları bulunmaktadır (61).

Ghrelin pozitif hücreler kapillerlere yakın yerleşimlidir ve oksintik bez lümeni ile irtibatı yoktur. Bu da salınımın gastrointestinal kanala değil, gastrik damarlara olduğunu göstermektedir. Böylelikle de tüm vücudu dolaşır (63).

Pankreas da açıl ghrelin sentezleyen bir organdır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) "Radioimmunoassay" (RIA) ile yapılan analizler, hem n-oktanil açıl ghrelin hem de desaçıl ghrelinin rat pankreasında bulunduğunu göstermiştir. Pankreasın  $\alpha$  ve  $\beta$  hücrelerinde diğer hormonların yanı sıra açıl ghrelin, Langerhans adacığının  $\epsilon$  hücrelerinde ise sadece açıl ghrelin bulunmaktadır (64).

#### **2.3.4.2. Beyin ve hipofiz:**

Ghrelin reseptörü GHS-R'nin esas olarak hipotalamus ve hipofizde eksprese edilmesi nedeniyle, endojen ligandının esasen hipotalamik bölgelerde var olduğu düşünülmektedir. Bu, bir başka GH salgılayan peptid GHRH'nin hipotalamusta üretildiği ve hipofiz somatotroflerinden GH salımını uyarmak için hipofizyal portal sisteme salgıladığı bulgusuyla desteklenir. Bununla birlikte, beynin ghrelin içeriğinin çok düşük olduğu bulunmuştur (3).

Lateral hipotalamus, arküat nükleus (ARC), ventromediyal nükleus (VMN), dorsomediyal nükleus (DMN), paraventriküler nükleus (PVN) ve üçüncü ventrikülün ependimal tabakasındaki çekirdekler arası boşlukta açıl ghrelin ekspresyonu mevcuttur (65). Ayrıca hipotalamusun dışında yer alan stria terminalis, amygdala, talamus ve habenulanın nükleusunda da açıl ghrelin ekspresyonu bulunmaktadır.

Nitrik Oksit (NO)'in besin alımının önemli bir düzenleyicisi olduğu bilinmektedir. İntraserebroventriküler ghrelin uygulaması hipotalamusdaki NOS seviyelerini artırır. Ghrelinin gıda alımını artırıcı etkisinin N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) uygulanımı ile inhibe olduğu gözlenmiştir. Bu durum, ghrelinin en azından bir kısım etkilerini NO üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

### **2.3.4.3. Diğer dokular:**

Ghrelın mRNA böbreklerde, özellikle glomerüllerde eksprese edilir (66). Ayrıca, fare böbreğinden peptit özütleri, n-oktanoil ve desaçıl ghrelın peptidlerini önemli miktarlarda içerir (67).

Ghrelın-immünoreaktif hücreler, 1'inci trimester insan plasentasında sitotrofoblast hücrelerinde saptanabilirken, 3'üncü trimester plasentada tespit edilememiştir (68). Ghrelın içeren hücreler, insan plasentanın sinsitiyotrofoblast hücrelerinde ve rat plasentasının labirent trofoblastlarının sitoplazmasında da belirlenmiştir. Plasental ghrelın mRNA, 16. günde gebeliğin son aşamalarında azalan keskin bir ekspresyon zirvesi ile hamileliğin erken döneminde saptanamamıştır.

Ghrelın immünoreaktif hücreleri, interstisyel Leydig hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde tanımlanmıştır (69). Ancak, Sertoli hücrelerinde ghrelın seviyeleri çok düşüktür. Ayrıca, ghrelın reseptörü, germ hücrelerinde, esas olarak pachten spermatoitlerinde ve somatik Sertoli ve Leydig hücrelerinde tespit edilmiştir (70).

Caminos ve ark. ilk kez kondrositlerde açıl ghrelının sentez ve sekresyonunu göstermişlerdir (47). Tükürük bezinde (71) ve diş dokusunda açıl ghrelın varlığı immunohistokimyasal ve RIA yöntemlerle tespit edilmiştir (72).

Kalp ve aortada da ghrelının mRNA'sı olduğu bildirilmiştir. İntravenöz ghrelın enjeksiyonu yapılan gönüllü deneklerde ghrelının kan basıncını azalttığı, kardiyak indeksi ve hacmi artırdığı belirtilmiştir (66). Ayrıca ghrelın, arterlerdeki endotelin-1'in damar daraltıcı etkisini de ortadan kaldırmaktadır.

Açıl ghrelın, normal insan dokularının yanı sıra hipofiz adenomları (73), nöroendokrin tümörler (74), tiroid ve medullar tiroid karsinomları, pankreas endokrin tümörleri ve akciğer tümörlerinde de tanımlanmıştır (75,76).

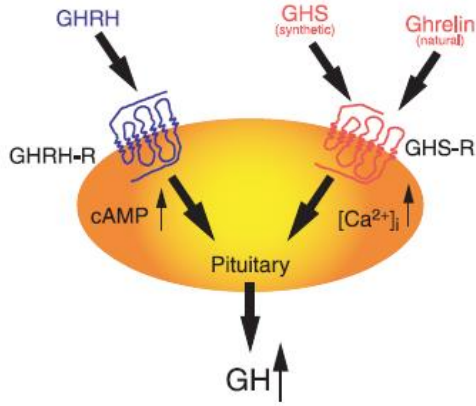
### **2.3.5. Ghrelinin Düzenlenmesi**

Ghrelinin salgılanması düşük enerji durumlarında hızlanır, ancak düzenleyici mekanizma hala bilinmemektedir. Mide su alımı ile dilate edilse bile, plazma konsantrasyonunda değişiklik olmaz; bu, midedeki gerilme uyarılarının ghrelın sekresyonunu değiştirmedini gösterir (77,78). Öte yandan, plazma ghrelın konsantrasyonu glukoz uygulamasıyla azalır; açlık sırasında artar ve yemek yenildiğinde azalır (79). Bu nedenle, ghrelın salgılanmasının düzenlenmesi için plazma glukoz konsantrasyonunun önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, ghrelının

fizyolojik aktiviteye sahip olması için, GOAT ile yağ asidi modifikasyonu esastır; bu nedenle GOAT dinamiklerine ve aynı zamanda sentez, depolama ve salıverme salgılama sürecine dikkat edilmelidir (80).

Ghrelinin GH salgılatıcı etkileri in vitro olarak ve de ratlarda yapılan intraserebroventriküler ve intraperitoneal çalışmalarda gösterilmiştir (35,81). Ghrelin, GHRH salınımını artırırken, somatostatin salınımını baskılamaktadır (82). Somatostatin büyüme hormonunun salınımını inhibe eder (83). Somatostatinin bu formu hipotalamustan salgılanmaktadır. Ayrıca diğer bir formu da pankreasta Langerhans adacıklarının Delta (D) hücrelerinden salgılanır.

GH salınımı iki farklı yolla gerçekleşmektedir. Birincisinde GHRH hipofiz içine büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörü (GHRH-R) vasıtasıyla girer ve intrasellüler cAMP seviyesini yükselterek GH salınımı uyarır. İkincisinde ise büyüme hormonu salgılatıcı (GHS) reseptör vasıtasıyla hipofiz içine girmesi ve fosfolipaz C aktivasyonu sonucu intrasellüler  $Ca^{+2}$  iyonu derişiminin yükseltilmesiyle GH salınımı uyarılır (Şekil 19) (3).



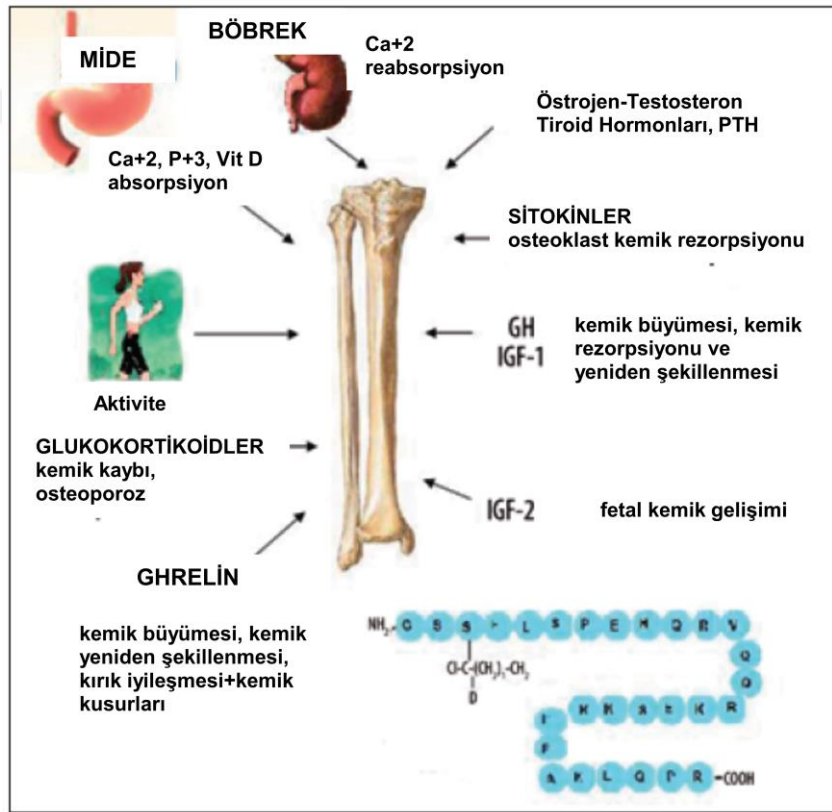
**Şekil 19.** Hipofizden büyüme hormonu salınımının düzenlenmesi (Kojima M and Kangawa K, Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*, 2005'den uyarlanmıştır.) (51).

### 2.3.6. Ghrelin ve Kemik Metabolizması

Ghrelinin kemik üzerinde doğrudan ve dolaylı etkileri olduğu bildirilmiştir (44). Ghrelin, GHRH ile sinerjistik olarak hipofizer GH salınımını uyarır (3) ve GH eksenini, ghrelin ekseninin kemikteki bazı etkilerine aracılık edebilir. GH, büyüme hormonu reseptörü (GHR) yoluyla doğrudan etki ederek ve dolaylı olarak, ağırlıklı

karaciğerden ve ayrıca kemik ve kıkırdak içindeki epifiz büyüme plağında IGF-I salınımını uyararak doğrudan kemik metabolizmasını geliştirir. GH ve IGF-I, boyuna kemik büyümesinin, iskelet olgunlaşmasının ve kemik kütlesinin kazanılmasının temel belirleyicileridir ve kemik oluşması ile yeniden şekillenmesini düzenleyerek kemik kütlesinin ve yoğunluğunun korunmasında önemlidir (84,85).

Paratiroid hormonu, kalsitonin, D vitamini, östrojen, kortikosteroidler, tiroid hormonları, büyüme hormonu, insülin benzeri büyüme faktörleri ve ghrelin, kemik homeostazındaki değişken mekanizmalara katkıda bulunur (Şekil 20) (86).



**Şekil 20.** Kemik büyümesine, yeniden şekillenmesine ve kemik absorpsiyonuna katkıda bulunan faktörler (Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G, Ghrelin, another factor affecting bone metabolism Med Sci Monit, 2010'dan uyarlanmıştır.) (86).

Ghrelinin kemik ve kıkırdak üzerinde GH'den bağımsız etkileri olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, GH eksikliği olan ratlarda 4 hafta boyunca 50 µg/kg/gün dozunda ghrelin intraperitoneal enjeksiyonu, femurun kortikal ve trabeküler kemiğinin kemik mineral yoğunluğunu artırmıştır (44).

Ghreltin, GH'in yanı sıra ön hipofizden prolaktin ve kortikotropin (ACTH) salınımını uyarır. Öte yandan, sadece açile edilmiş ghreltin formu GHS-R1a reseptörünü aktive etmesine rağmen, son kanıtlar, desaçil ghreltinin muhtemelen alternatif bir reseptör yoluyla hareket ederek hücresele fonksiyonu ve vücut büyümesini modüle edebileceği öne sürülmektedir (87). Desaçil ghreltin ile direkt tedavi, ratların kemik iliğinde adipogenezi değiştirir ve in vitro desaçil ghreltin, insan kardiyomyositlerinin ve endotel hücrelerinin apoptozisini inhibe eder (88).

Ghreltin, GH salımını uyarmasıyla kemik üzerinde dolaylı bir etkiye sahip olabilir. Bununla birlikte, GHS-R1a agonisti heksarelin, GH tedavisi ile gözlemlenmeyen bir etki olarak ratlarda kemik rezorpsiyonunun işaretleyicilerini inhibe eder (89). Bu, kemirgenlerde, GH sekretagoglarının kemik üzerinde GH'den bağımsız etkileri olabileceğini düşündürmektedir (90). Ayrıca, oksi mukozadan elde edilen ekstraktlar osteoblast hücre hatlarında  $Ca^{2+}$  hücre içi depolarını harekete geçirir, bu da gastrik mukozada bir osteotropik hormonun mevcut olduğunu gösterir (44,91).

Ghreltinin insan kemik hücreleri tarafından üretildiği ve ghreltin ile desaçil ghreltinin, MAPK ve PI3K sinyal yollarının aktivitesini içeren bir mekanizma vasıtasıyla insan osteoblastlarının çoğalmasını uyardığı belirtilmektedir. Bu veriler insanlarda kemik metabolizması için yeni bir düzenleme mekanizmasını ortaya çıkarmaktadır. Desaçil ghreltinin güçlü etkileri, kemikte henüz tanımlanmamış yeni bir reseptör/sinyal yolunu gösterir (41).

Ratlarda açil ghreltin, osteoblastların proliferasyon ve farklılaşmasını uymaktadır. Diş ratlarda 12 hafta boyunca GHRP-6 veya peptid analogu olan ipamorelin verildiğinde kemik mineralizasyonun arttığı kemik dansitometri ölçümlerinde gösterilmiştir (44).

Ayrıca, ghreltin, osteoblast farklılaşma markörlerinin ekspresyonunu, ALP aktivitesini ve matristeki kalsiyum birikimini artırmıştır. Bu nedenle, ghreltin doğrudan kemik oluşumunu uyarır (44). Ek olarak, ghreltinin, farelerde cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) ve runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx2) yollarını modüle ederek de, osteoblastlarda GHS-R ile kemiğin yeniden şekillenmesini düzenlediği bildirilmiştir (92). Ayrıca, ghreltinin kronik merkezi uygulaması, vücut ağırlığından bağımsız bir mekanizma ile kemik kütesini artırır, bu da ghreltinin merkezi sinir sistemi boyunca kemik anabolik etkisi olabileceğini düşündürür (43).

Ghrelin ve desaçil ghrelin osteoblast aktivitesini uyarır ve kemikte ghreline ve desaçil ghrelinde yaygın olan GRLR'ye etki eden bileşikler, yaşa bağlı kemik kaybıyla mücadelede etkili olabilir (48).

Ghrelinin, AMPK'nın fosforilasyonunu aktive ederek kemik oluşumunu ve kütlesini düzenlediği gösterilmiştir (93).

Ghrelin osteoklastogenezde ikili rollere sahiptir: osteoklastogenez sistemik olarak uyararak, osteoklast progenitörlerini lokal olarak inhibe etmek. Ghrelin ve leptin kemik metabolizması üzerinde ters etkilere sahiptir; ghrelinin sistemik osteoklastojenik aktivitesi leptin tarafından baskılanır. Öte yandan, ghrelinin sistemik osteoklastojenik etkisi, kemik oluşumu üzerindeki doğrudan koruyucu etkisini maskeleyen yaşla birlikte azalır (46). Sağlıklı yaşlı kadınlarda yapılan bir çalışma, kantitatif BT kullanılarak serum ghrelin ve trabeküler BMD arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (94). Bu nedenle, ghrelin, kemik oluşumunu ve kemik kütlesini artırmakla birlikte, kemik metabolizması üzerindeki etkisi yaşa bağlıdır (95).

#### **2.3.6.1. Ghrelinin kemikte, kemik türevi hücre dizilerinde ve kıkırdakta ekspresyonu:**

Ghrelinin kemik ve kemik-türevi hücre dizilerinde ekspresyonu, kemik dokularında rol oynayabileceğini göstermektedir. İnsan ve kemirgen osteoblastları, ghrelin ve GHSR1a ekspresyonu yapar (41,44,91,96). Ghrelin mRNA insan kemik biyopsilerinde ve SV-HFO insan pre-osteoblastik hücre dizisinde ve TE-85 ile MG-63 insan osteosarkom hücre dizilerinde eksprese edilir (97). Ghrelin ve GHSR1a mRNA ile protein, insan osteoblast kültürlerinde ve MG-63 ile Sa-OS2 insan osteosarkom hücre dizilerinde tespit edilmiştir (96).

Ghrelin kondrositlerde eksprese edilir ve kondrogenezde rol oynayabilir. Ghrelin peptidi ve mRNA, insan ve kemirgen kondrositlerinde, immünoreaktif ghrelin ise epifiz büyüme plağının proliferatif ve maturatif bölgelerinde eksprese edilir. Pozitif <sup>125</sup>I ghrelin bağlanması gösteren çalışmalar (47), ghrelinin kıkırdaktaki etkilerini alternatif ghrelin reseptörleri yoluyla yapabileceğini belirtmektedir.

#### **2.3.6.2. İn vitro çalışmalarında ghrelinin kemik fonksiyonel etkileri:**

İn vitro çalışmalar, ghrelin uygulamasının, osteoblastların farklılaşmasını, çoğalmasını ve aktivitesini artırarak kemik oluşumunu artırdığını göstermiştir (41,44,45,91,96). Eksogen ghrelin uygulaması, insan SV-HFO pre-osteoblastik

hücrelerinde (39), insan primer osteoblastlarında (45), 21 günlük rat kalvaryadan kültürlenmiş primer osteoblastlarda (44,91) ve MC3T3-E1 primer fare osteoblast hücre dizininde proliferasyonda doza bağlı bir artışı uyarır (96). Ghrelin tedavisi, in vitro primer rat kalvariyal hücrelerinde Runx2 ve kollajen tip  $\alpha 1$  gibi osteoblast farklılaşma markörlerinin ekspresyonu ile osteoblastların farklılaşmasını artırır (44). Ghrelinin verilmesi, ayrıca, osteoblast aktivitesi ile in vitro primer fare osteoblast MC3T3-E1 hücrelerinde (96) ve primer rat calvarisinde, alkalın fosfataz ve osteokalsin üretimini artırır (44,91), bu da ghrelinin osteoblastların farklılaşması ve çoğalmasında rol oynayabileceğine işaret eder.

Ghrelinin osteoblastlar üzerindeki etkisi üzerine yapılan çalışmaların aksine, az sayıda çalışma, ghrelinin osteoklastlarda (kemiği rezorbe eden) rolünü bildirmektedir. 1-2 günlük ratların uzun kemiklerinden izole edilmiş ve sıgır kemik dilimleri üzerinde in vitro ghrelin ile birlikte inkübe edilmiş rat osteoklastları, kemik rezorpsiyonunda bir artışa neden olmuştur, bu da ghrelinin osteoklast aktivitesinin artmasındaki rolünü göstermektedir. Ghrelinin osteoblastik ve osteoklastik hücreleri düzenlediği gösterilmiş olduğundan, kemik oluşumu ve rezorpsiyonu üzerinde ikili bir düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir (45). Ayrıca, GHSR ekspresyonu durdurulmuş farelerin 3 aylıkken kemik iliği kaynaklı osteoklast kültürlerinde, yabani tip kontrol farelerine kıyasla osteoklastogenezis artmıştır (46).

### **2.3.6.3. Ghrelinin kemik homeostazındaki fonksiyonel etkileri:**

Bazı çalışmalar, ghrelinin insan popülasyonlarında kemik mineral yoğunluğunu (BMD) etkilediğini göstermiştir (94,98,99). Ghrelin salgılanması, sağlıklı kızlarda vücut kompozisyonundan, GH-IGF-I ekseninden, kortizolden ve östradiol durumundan bağımsız kemik yoğunluğunu tahmin eder (98). Premenopozal kadınlara kıyasla perimenopozal ve postmenopozal kadınların, omurga, kalça yarıçaplarında ghrelin ile BMD arasında anlamlı bir pozitif ilişki bulunmuştur. Serum ghrelin, yaşlı sağlıklı İtalyan kadın kohort çalışmasında tibia trabeküler BMD ile pozitif korelasyon göstermekte ve erkeklerde de korelasyon göstermektedir, ancak ikincisi istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (94). Newfoundland (Kanada) popülasyonundaki kadınlarda dolaşımdaki ghrelin konsantrasyonu ile kemik yoğunluğu arasında, vertebral kolon, femur boynu ve kalçadaki daha yüksek kemik yoğunluğu ölçümleriyle ilişkilendirilmiş daha yüksek serum ghrelin konsantrasyonları ile korelasyon gösteren faydalı bir ilişki

bulunmuştur. Bu ilişki, ghrelinin in vivo kemik homeostazını düzenlemede rol oynadığını belirten vücut kitle indeksi, fiziksel aktivite, yaş, alkol tüketimi ve sigara gibi faktörlerden bağımsızdır (42). Buna karşın, ghrelin seviyeleri anoreksiya nervozası bulunan kızlarda yükselir ve ghrelin salgılanması lomber omurga ve kalçadaki kemik yoğunluğunu, vücut yapısı, GH-IGF-I eksenini, kortizol ve östradiolden bağımsız olarak öngöremez (98). Rett sendromlu kızlarda serum ghrelin düzeyleri, ghrelin düzeyleri ile BMD arasında bir ilişki bulunmayan, yaşa uygun sağlıklı deneklerden anlamlı olarak daha yüksektir. Bu, ghrelin seviyelerinin anoreksiya nervoza ve Rett sendromunda telafi edici bir şekilde arttığını ve bu koşullara sahip hastaların ghrelin dirençli olabileceğini düşündürmektedir.

GHSR ekspresyonu durdurulmuş farelerde yapılan çalışmalar, ghrelin sinyalleşmesinin kemik kütlesi ve mikro mimarinin ilerleyen yaşla korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (46). 8 haftalık ghrelin-null (100) ve 24 haftalık GHSR-null farelerde (101) BMD densitometri analizi, aynı yaştaki vahşi türlere göre kemik mineral yoğunluğunda bir değişiklik göstermemiştir.

#### **2.3.6.4. Ghrelin ekseninin osteogenez ve kondrojenezdeki rolü:**

Ghrelinin kemik homeostazisini düzenleme üzerindeki etkisini destekleyen çalışmalara ek olarak (42,43), ghrelinin kemik gelişiminde (osteogenez) ve onarımında bir rolü olduğu görülmektedir. Ratlarda ghrelin takviyesi modelinde, ghrelin ile tedavi edilen hayvanlarda kalvariyal kemik defektlerinde artmış kemik oluşumu gözlenmiştir. Bu, ghrelinin kemik iyileşmesi sırasında intramembranöz kemikleşmeyi artırdığını göstermektedir (40). Ghrelin aynı zamanda kondrogenezde de rol oynayabilir (47,102). Ghrelin, in vitro kıkırdak hücrelerinde (kondrositler) cAMP üretimini uyarır, insan ve fare kondrositlerinde kondroitin sülfat tip IV (bir proteoglikan sentez geni) gen ekspresyonunda önemli bir artışa neden olur. cAMP'deki artış, artmış kondrosit apoptozisi ile bağlantılıdır ve ghrelinin, kondrosit metabolizmasında, proteoglikan sentezini ve programlanmış hücre ölümünü artırarak hipertrofik süreçleri teşvik eden düzenleyici bir rol oynayabileceği varsayılmaktadır (47).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. ÇALIŞMA PLANI

Ankara Hastanesi Deneysel Hayvan Araştırma Laboratuvarı Etik Kurulu'ndan araştırma için gerekli izinler alındıktan sonra (15.02.2019 tarih ve 51 no.lu karar), araştırma aynı hastanenin Deneysel Hayvan Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu çalışmada, Avrupa Konseyi'nin önerdiği standartlara (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) (ETS 123) uyulmuştur.

Çalışmada 40 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat kullanılmıştır. Ratların ortalama yaşı 2,8 ay (2,7-2,9 ay) ve ortalama ağırlıkları 220 gram (190-250) olarak belirlenmiştir. Ratlar rastgele seçilerek kontrol (ghrelin verilmeyen) ve deney (ghrelin) grubu olarak 4 gruba ayrılmış, her kafeste 4'er ve 6'şar hayvan olacak şekilde çalışmanın başından sonuna takip edilmiştir. Çalışma süresince su kısıtlaması yapılmamış ve standart rat yemi ile beslenmiştir. Ratlar 22<sup>0</sup>C'de, 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta kalacak şekilde bakılmıştır. Perop antibiyotik profilaksisi yapılmamıştır. Operasyon esnasından çalışma sonuna kadar hiçbir rat ölümü olmamış ve ratlarda postoperatif yara yeri enfeksiyonu görülmemiştir.

Kafesler 1'den 10'a kadar numaralandırılmıştır (Şekil 21). Kontrol ve deney grupları; 2. ve 4. hafta biyomekanik, histoloji, mikrotomografi, ayrıca 4. hafta biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Gruplar A-H arası isimlendirilmiş, kontrol grupları 8'er, deney grupları 12'şer ratdan oluşmuştur (Tablo 5).



Şekil 21. Ratların kafeslere dağılımı.

**Tablo 5.** Ratların dağılımı

Grup	Özellik	Rat sayısı	Sacrifiye zamanı	Kafes sayısı	Kafeste kalan rat sayısı
A-B	2.hafta histoloji kontrol	8	2.Hafta	2	8
C-D	2.hafta histoloji ghrelin inceleme	12	2.Hafta	2	12
A-B	2.hafta biyomekanik kontrol	8	2.Hafta	2	8
C-D	2.hafta biyomekanik ghrelin inceleme	12	2.Hafta	2	12
A-B	2.hafta mikrotomografi kontrol	8	2.Hafta	2	8
C-D	2.hafta mikrotomografi ghrelin inceleme	12	2.Hafta	2	12
E-F	4.hafta histoloji kontrol	8	4.Hafta	2	8
G-H	4.hafta histoloji ghrelin inceleme	12	4.Hafta	2	12
E-F	4.hafta biyomekanik kontrol	8	4.Hafta	2	8
G-H	4.hafta biyomekanik ghrelin inceleme	12	4.Hafta	2	12
E-F	4.hafta mikrotomografi kontrol	8	4.Hafta	2	8
G-H	4.hafta mikrotomografi ghrelin inceleme	12	4.Hafta	2	12
E-F	4.hafta biyokimya kontrol	8	4.Hafta	2	8
G-H	4.hafta biyokimya ghrelin inceleme	12	4.Hafta	2	12

Ameliyat gününden itibaren C ve D grubuna 2 hafta, G ve H grubuna ise 4 hafta her gün, intraperitoneal yöntem ile aynı kişi tarafından, ghrelin (50 mcg/kg/gün) [Ghrelin (rat) (trifluoroacetate salt), Item: 24458, Cayman Chemical Co. USA] verilmiştir (Şekil 22).



**Şekil 22.** Ratlara intraperitoneal yöntem ile ghrelin (50 mcg/kg/gün) verilmiştir.

A, B, C ve D grupları 2. haftanın, E, F, G ve H grupları ise 4. haftanın sonunda, servikal dislokasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edilmiştir.

Ratların sakrifiye edilmeleri sonrası sol femurları kalçadan dezartiküle edilmiştir. Distalde ise diz eklemi hizasından dezartiküle edilerek çıkarılmıştır. Kemik üzerindeki yumuşak dokular nazikçe kemikten sıyrılmış, bu aşamada kallus dokusu korunmuştur. Ratlardan alınan kan örnekleri biyokimyasal incelemeye alınmıştır. Tüm sol femurlar radyolojik olarak incelendikten sonra, her bir femur biyomekanik teste ve histolojik incelemeye tabi tutulmuştur.

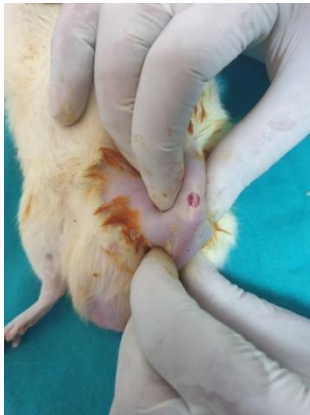
### 3.2. CERRAHİ TEKNİK

Gerekli takip ve hazırlıkları yapılan ratlar laboratuvar ortamında ameliyathaneye alınmıştır. Her bir ratın ağırlığı elektronik tartı ile tartılarak anestezi ilaç dozu hesaplanmıştır. Anestezi olarak Ketamin (Ketalar, Pfizer, Türkiye) 50 mcg. ve Xylazine (Rompun, Bayer, Türkiye) 10 mg/kg kombinasyonu kullanılmıştır. Ratların sol diz bölgeleri traş edildikten sonra povidon iyodür (Batticon, ADEKA, Türkiye) ile boyanmıştır (Şekil 23).



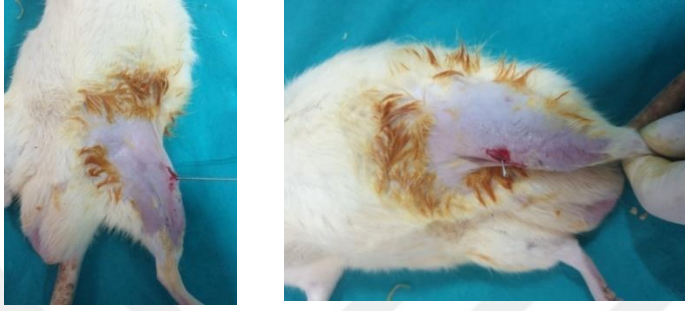
Şekil 23. Ratın sol diz bölgesinin ameliyata hazırlanması.

Anteromedial olarak iki santimetrelik longitudinal insizyon ile cilt ve cilt altı geçilmiş, patella medialinden eklem kapsülü görülmüş ve açılmıştır. Patella laterale devrilerek diz fleksiyona alınmış ve femur kondilleri ortaya çıkarılmıştır (Şekil 24).



Şekil 24. Femur kondillerin ortaya çıkarılması.

Femur kondilleri arasından 1 mm'lik Kirschner teli kullanılarak femur kanalı hazırlanmış ve kanala 0,8 mm'lik Kirschner teli yerleştirilmiştir. Telin sıkıştığı yerde tel 3-4 mm kadar geri çekilerek, femur kondilleri hizasından kesilmiştir. Kanal içinde kalan tel, kondilden dışarı taşmayacak şekilde tekrar kanala itilerek yerleştirilmiştir (Şekil 25).



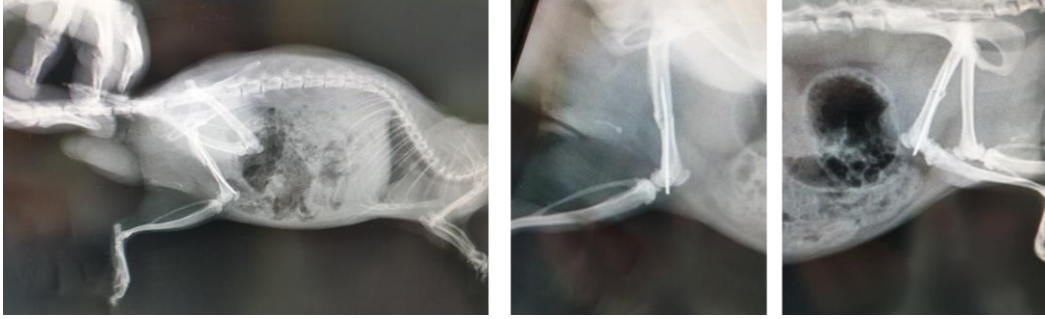
**Şekil 25.** Kirschner telinin yerleştirilmesi.

Diz ekstansiyona alınarak patella redükte edilmiş, kapsül 3/0 vicryl (NEOLACT, İzmir, Türkiye) ile dikilmiş, cilt 2/0 ipek (STERSILK, Tekirdağ, Türkiye) ile kapatılmıştır. Yara yeri povidon iyodür ile silinerek rat ameliyat masasından alınmıştır. Standart kapalı kırık oluşturmak için Bonnarens ve Einhorn tarafından tarif edilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre hayvanın sol femuru; taban, hayvanın yerleştirildiği yer, giyotin ve ağırlık kısmı olmak üzere dört parçadan oluşan künt giyotin sistemine yerleştirilmiştir. Giyotin sisteminin ayar vidaları künt giyotin sadece 1,5 mm hareketine izin verecek şekilde ayarlanmıştır. Beş yüz gramlık demir ağırlık, 35 cm yükseklikten serbest düşmeye bırakılarak kapalı kırık oluşturulmuştur (Şekil 26).



**Şekil 26.** Künt giyotin sisteminde kapalı kırık oluşturulması.

Klinik muayene sonrası oluşturulan kırık direkt radyografilerle radyolojik olarak doğrulanmış (Şekil 27), daha sonra ratlara gruplarına göre ghrelin enjeksiyonları yapılmıştır.



Şekil 27. Kırığın direkt radyografilerle radyolojik olarak doğrulanması.

### 3.3. RADYOLOJİK İNCELEME

Ratlar sakrifiye edilip sol femurlar çıkarıldıktan sonra, kallus dokuları zarar görmeyecek şekilde nazikçe yumuşak dokular temizlenmiş, çıkarılan femurlar gruplar halinde röntgen (Şekil 28) ve ince kesit tomografi (Şekil 29) ile değerlendirilmiştir. Tomografi çekiminde gruplar, karışmaması için ayrı ayrı tomografiye alınmıştır. Çekimde, tüm rat femurlarında intramedüller Kirschner teli mevcut olduğu için Kirschner telleri çıkarılmıştır.

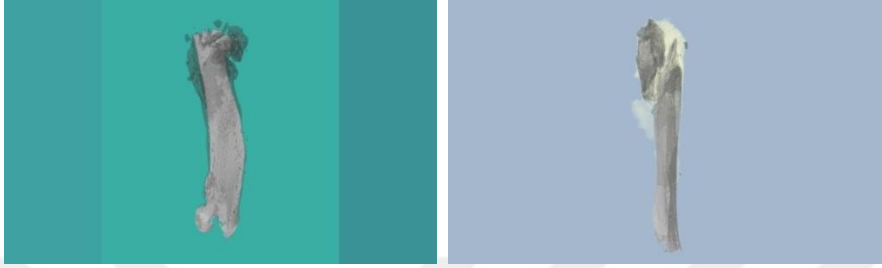


Şekil 28. Sol femurların gruplar halinde konvansiyonel olarak röntgen ile değerlendirilmesi.

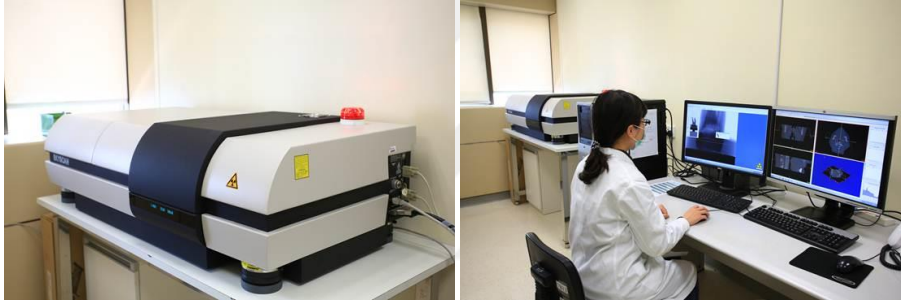


Şekil 29. Sol femurların mikro tomografi ile incelenmesi.

Tarama verileri NRecon (SkyScan, Aartselaar, Belgium) isimli programla yeniden yapılandırılmış ve transvers kesitler alınmıştır. Daha sonra CTan (SkyScan, Aartselaar, Belgium) ve CTvox (SkyScan, Aartselaar, Belgium) isimli programlar ile üç boyutlu modellemeler yapılmış ve hem üç boyutlu hem de iki boyutlu analizler bu programlar ile değerlendirilmiştir (Şekil 30, 31).



Şekil 30. CTan ve CTvox isimli programlar ile yapılan üç boyutlu modellemeler.



Şekil 31. Transvers kesitlerin alınmasında, 2 ve 3 boyutlu modellemelerin yapılmasında NRecon, CTan ve CTvox isimli programların kullanılması.

Radyolojik sonuçlara bakılırken;

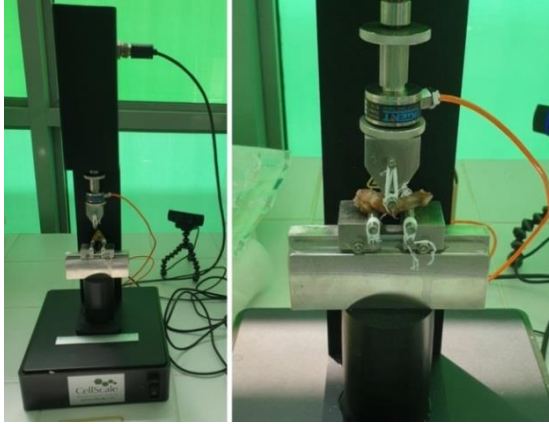
- İkinci hafta kontrol ve ghrelin gruplarının, 4. hafta kontrol ve ghrelin gruplarının total kallus çapı/femur çapı, düşük radyoopak kemik/yüksek radyo opak kemik oranları,

- İkinci hafta kontrol ve ghrelin gruplarının, 4. hafta kontrol ve ghrelin gruplarının, 2. ve 4. hafta ghrelin gruplarının ince kesit tomografilerde; doku hacmi, kemik hacmi, kemik hacim yüzdesi, kemik yüzey, doku yüzey, ara yüzey, kemik yüzey/hacimsel, kemik yüzey yoğunluk, trabeküler kalınlık, trabekül sayısı ve trabeküler ayrışma ölçümleri,

- Birinci grup (kontrol) 2'nci grup (ilaç), 1'inci grup (kontrol) 3'üncü grup (kontrol 2), 4'üncü grup (İlaç 2) 2'nci grup (İlaç) ve 4'üncü grup (İlaç 2) 3'üncü grup (kontrol 2) dansitometri ölçüm skorları karşılaştırılmıştır.

### 3.4. FEMUR KEMİKLERİNİN BİYOMEKANİK ANALİZİ

Ghrelinin kemik iyileşmesindeki etkisini incelemek için rat femur kemiklerinde kırık modeli çalışılmıştır. Ghrelin ile tedavi uygulanan ve uygulanmayan rat grupları, 14. ve 28. günlerde sonlandırıldıktan sonra sol femurları çıkartılmış ve üzerindeki yumuşak dokular ayrılmıştır. Kemikler fosfat tampon çözeltisi ile ıslatılmış sargı bezine sarılarak analiz gününe kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Test günü femurlar oda sıcaklığına getirildikten sonra Univert biyomalzeme mekanik test cihazında (Cell scale, Kanada), 200N yük hücresi kullanılarak 3 noktalı eğme testi ile biyomekanik özellikleri yönünden test edilmiştir (Şekil 32). Test esnasında destek noktaları arası uzaklık 18 mm olarak belirlenmiş ve eğme hızı 10 mm/dk olarak kemikler kırılana kadar kuvvet uygulanmıştır. Test esnasında grupların maksimum yük dayanımı ve kırılma anındaki maksimum gerilme noktaları raporlanmış ve oluşturulan yük-deformasyon grafiğinin kırılma öncesinde doğrusal arttığı bölgenin eğiminden grupların sertlik değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 32. Univert biyomalzeme mekanik test cihazı, 3 noktalı eğme testi sistemi (Sol). Femur kemiklerine uygulanan 3 noktalı eğme testi (Sağ).

### 3.5. KAN PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ

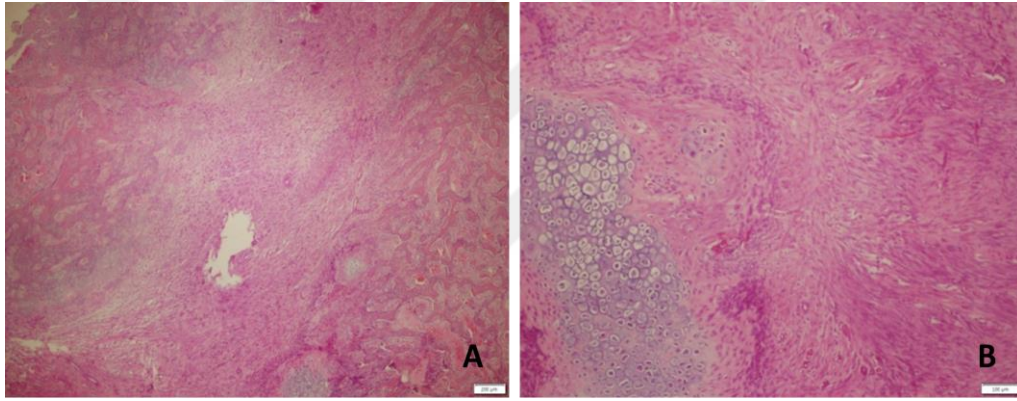
DeneySEL aşamanın sonunda (28. günde), bir önceki gece yem verilmeyen hayvanların canlı ağırlık ölçümleri kaydedilerek, denekler 10 mg/kg Xylazine HCl ile 50 mg/kg Ketamin HCl enjeksiyon uygulanarak anestezi altına alınmıştır.

Anestezi altına alınan deneklerin cilt ya da parmak kısırtma yanıtları kontrol edilerek, bu uyarımlara yanıt vermeyenlerin göğüs kafesleri tekniğine uygun olarak açılmış ve atan kalpten uygun enjektörler vasıtasıyla yaklaşık olarak 5-8 ml tam kan örneği alınmış ve vacutainer SST tüplere aktarılmıştır. Bu örnekler ALP, kalsiyum,

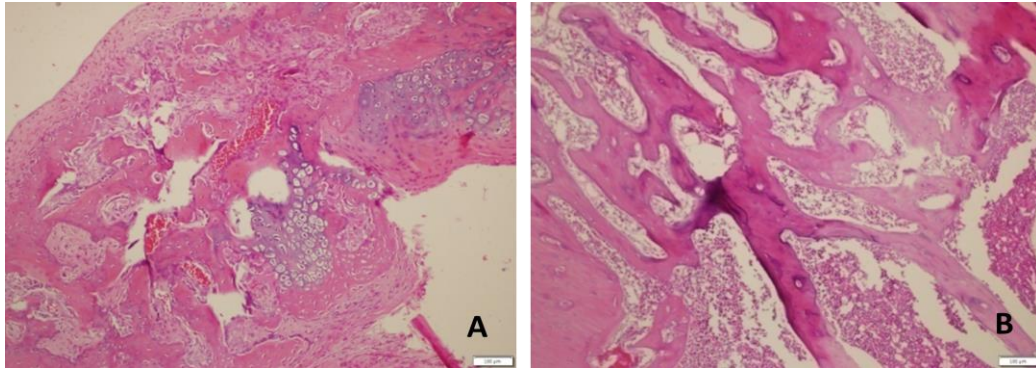
fosfor ölçümü için ayrılmış, biyokimyasal analizlerin yapılması için derhal soğuk zincir altında muhafazaya alınarak laboratuvara gönderilmiştir. Laboratuvarda santrifüj işlemi, soğutmalı santrifüjde 2500 rpm (dakikada devir sayısı)'de 10 dk boyunca yapılmıştır. Elde edilen serumlar 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınarak, gerekli ölçümler yapılmaya kadar derin dondurucuda -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bu deneysel parametreler ticari orijinal ROCHE® kitleri ile COBAS-8000 otoanalizatörde çalışılmıştır.

### 3.6. HİSTOLOJİK İNCELEME

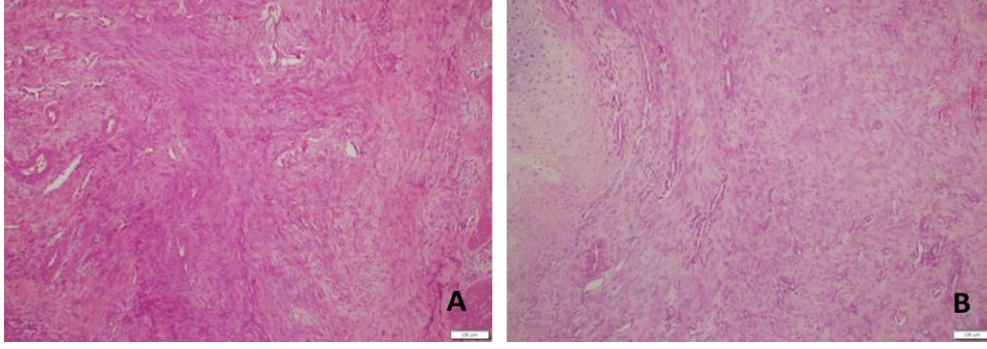
Radyolojik incelemenin ardından histolojik inceleme yapılacak gruplardaki tüm femurlar %10'luk formol solüsyonunda 2 gün fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası %10'luk asetik asitte yaklaşık 4 gün dekalsifiye edilmiştir. Sonrasında parafin bloğa alınan örneklerden üçer mikronluk kesitler alınmış ve örnekler hematoksilin-eozin ile boyanmıştır. Örneklerle ilişkin değerlendirmeler Şekil 33-36'da gösterilmiştir.



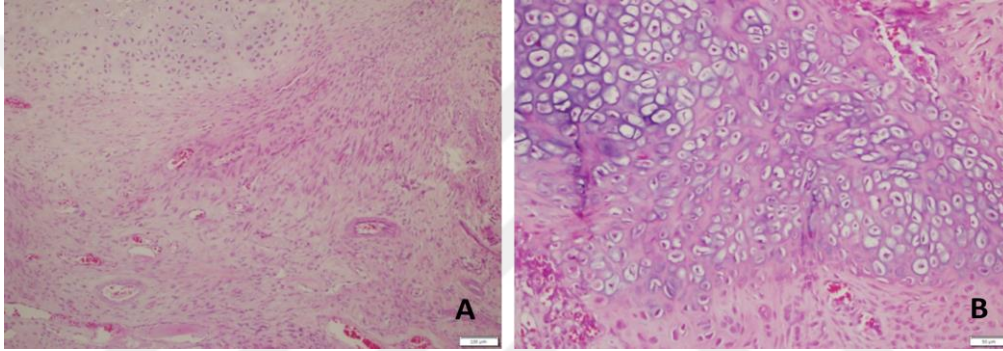
**Şekil 33.** İlaç 1 (Grade 2) İlaç 3 (Grade 3) örnekleri: A. İlaç 1 (Grade 2) İyileşme alanında yaygın fibröz doku ile minimal kırık dokusu izlenmektedir. (HVE) B. İlaç 3 (Grade 3) İyileşme alanında fibröz doku ile solda kartilaj dokusu görülmektedir. (HVE)



**Şekil 34.** İlaç 23 (Grade 7) İlaç 20 (Grade 10) örnekleri: A. İlaç 23 (Grade 7) İyileşme alanında encondral kemikleşme izlenmektedir. B. İlaç 20 (Grade 10) İyileşme alanında matür kemik dokusu hakimiyeti mevcuttur.



**Şekil 35.** Kontrol 1 (Grade 1) Kontrol 5 (Grade 2) örnekleri: A. Kontrol 1 (Grade 1) Tamamen fibroz dokudan oluşan iyileşme alanı görülmektedir. B. Kontrol 5 (Grade 2) Yaygın fibröz doku yanında solda kıkırdak alanları gözlenmektedir.



**Şekil 36.** Kontrol 14 (Grade 3) Kontrol 15 (Grade 4) örnekleri: A. Kontrol 14 (Grade 3) İyileşme alanında fibröz doku ve kıkırdak dokusu görülmektedir. B. Kontrol 15 (Grade 4) Yaygın kıkırdak dokusu yanında fibrozis alanları izlenmektedir. (HYE)

### 3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Araştırma kapsamında, gruptaki denek sayısı  $n < 30$  olduğundan parametrik olmayan testlerin uygulanmasına karar verilmiştir (103). Bu doğrultuda 1, 2, 3 ve 4'üncü grupların; total kallus ve femur çapları, yüksek ve düşük radyopak kemik, doku ve kemik hacimleri, kemik hacim yüzdesi, doku, kemik ve ara yüzeyleri, kemik yüzey/hacimsel, kemik yüzey yoğunluk, trabeküler kalınlık, trabekül sayısı, trabeküler ayrışma ve histolojik grade ölçümleri ile dansitometri ölçümlerini karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Benzer şekilde, ilaç ve kontrol gruplarının ALP, Ca ve P ölçümlerini ve histolojik ölçümlerini karşılaştırmak için de Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Biyomekanik test deney sonuçları arasındaki istatistiksel fark post-hoc Tukey HSD ile tek-yönlü ANOVA testi uygulanarak karşılaştırılmıştır. Veriler SPSS 25.0 kullanılarak analiz edilmiştir. Güven aralığı %95 olarak belirlenmiş,  $p < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. RADYOLOJİK BULGULAR

Değerlendirmede; total kallus çapı (TKÇ), düşük radyoopasiteli kemik (DRK), yüksek radyoopasiteli kemik (YRK) ve femur çapı (FÇ) ayrı ayrı ölçülmüştür (Tablo 6-10). İnce kesit tomografilerde; doku hacmi, kemik hacmi, kemik hacim yüzdesi, kemik yüzey, doku yüzey, ara yüzey, kemik yüzey/hacimsel, kemik yüzey yoğunluk, trabeküler kalınlık, trabekül sayısı ve trabeküler ayrışma ölçümleri yapılmıştır (Tablo 11-15).

**Tablo 6.** Birinci grup (kontrol) total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçüm sonuçları

1. Grup Kontrol	Total kallus çapı (mm)	Femur çapı (mm)	Yüksek radyopak kemik (mm)	Düşük radyopak kemik (mm)
1	5,779	3,616	3,411	4,883
2	7,261	3,630	3,850	5,840
3	8,901	4,180	4,212	5,610
4	7,410	3,228	3,112	5,929
5	8,347	4,168	3,904	5,168
6	9,323	3,820	3,850	6,159
7	5,957	3,857	3,796	5,029
8	6,644	3,815	3,250	5,292

**Tablo 7.** İkinci grup (ilaç) total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçüm sonuçları

2. Grup İlaç	Total kallus çapı (mm)	Femur çapı (mm)	Yüksek radyopak kemik (mm)	Düşük radyopak kemik (mm)
1	6,438	3,404	3,395	5,752
2	6,69	3,987	3,571	5,237
3	7,308	4,117	3,439	5,463
4	9,003	3,726	3,537	6,247
5	5,506	3,533	3,558	4,216
6	8,76	3,517	3,575	5,255
7	6,408	4,414	3,960	4,996
8	6,739	3,902	3,936	5,449
9	6,376	4,052	3,626	5,102
10	7,066	4,247	3,855	5,439
11	8,062	4,169	3,819	6,034
12	5,941	3,688	3,527	4,338

**Tablo 8.** Üçüncü grup (kontrol 2) total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçüm sonuçları

3. Grup Kontrol 2	Total kallus çapı (mm)	Femur çapı (mm)	Yüksek radyoopak kemik (mm)	Düşük radyoopak kemik (mm)
1	8,544	4,141	3,986	6,346
2	8,367	4,057	3,722	5,216
3	7,763	4,052	3,844	5,372
4	7,802	3,968	3,988	5,466
5	6,575	3,803	3,794	4,644
6	6,631	3,896	3,803	4,870
7	8,643	4,034	4,233	7,198
8	7,967	4,189	3,788	5,434

**Tablo 9.** Dördüncü grup (ilaç) total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçüm sonuçları

4. Grup İlaç	Total kallus çapı (mm)	Femur çapı (mm)	Yüksek radyoopak kemik (mm)	Düşük radyoopak kemik (mm)
1	5,975	3,684	4,034	5,084
2	7,248	4,146	4,407	5,557
3	9,818	4,508	5,610	6,778
4	7,052	4,488	4,073	5,638
5	7,768	3,664	3,763	5,314
6	9,158	4,744	4,744	5,117
7	7,437	3,622	3,438	5,405
8	6,256	3,702	3,387	5,195
9	6,927	3,455	3,747	5,940
10	7,508	3,961	3,879	5,363
11	9,862	4,112	3,387	5,550
12	7,565	3,763	4,210	6,301

**Tablo 10.** Beşinci grup femur total kallus çapı, düşük ve yüksek radyoopasiteli kemik ve femur çapı ölçüm sonuçları

5. Grup Femur	Total kallus çapı (mm)	Femur çapı (mm)	Yüksek radyoopak kemik (mm)	Düşük radyoopak kemik (mm)
1		3,927		
2		3,573		

**Tablo 11.** İnce kesit tomografide 1. grubun; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçüm sonuçları

Grup 1	1	2	3	4	5	6	7	8
Doku hacmi (mm <sup>3</sup> )	2,34215136	1,54982740	6,69224782	0,96412933	9,34256643	6,30988316	6,22068831	1,69246991
Kemik hacmi (mm <sup>3</sup> )	0,64527287	1,44551965	1,51896156	0,79979467	2,39347912	4,20508923	2,11399896	0,81825070
Kemik hacim yüzdesi (%)	2755043440	9326971836	2269732979	8295512368	2561907525	6664290178	3398336099	4834654070
Doku yüzey (mm <sup>2</sup> )	12,72362999	10,26687736	23,54676863	6,81153000	27,23416033	22,02693644	20,71445237	8,44083977
Kemik yüzey (mm <sup>2</sup> )	13,37782480	12,08450908	28,04372610	8,95543331	30,03114610	28,62804616	33,81563635	2,08369132
Ara yüzey (mm <sup>2</sup> )	2,91374725	8,99765334	5,55288295	5,60375398	5,36094679	4,89103799	5,64548506	0,67563227
Kemik yüzey/hacimsel (1/mm)	20,73204273	8,35997564	18,46243307	11,19716546	12,54706833	11,22013727	15,99605152	25,46519579
Kemik yüzey yoğunluk (1/mm)	5,71176783	7,79732573	4,19047932	9,28862246	3,21444288	2,98392166	5,43599593	1,23115413
Trabeküller kalınlık (mm)	0,21408894	0,42520099	0,27059395	0,33547881	0,30405807	0,42817302	0,25525585	0,16196939
Trabekül sayısı (1/mm)	1,28686865	2,19354425	0,83879664	2,47273811	0,84257180	0,77331904	1,33134504	0,29849183
Trabeküller ayırışma (mm)	0,35609116	0,13678243	0,59876886	0,19952666	0,84861761	0,81200447	0,43291517	0,69824047

**Tablo 12.** İnce kesit tomografide 2. grubun; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçüm sonuçları

Grup 2	1	2	3	4	5	6
Doku hacmi (mm <sup>3</sup> )	1,72227671	1,76391996	1,70835569	0,75844389	7,79027110	0,55140769
Kemik hacmi (mm <sup>3</sup> )	0,71197560	1,08647225	0,42535658	0,50564024	2,79486298	0,36462375
Kemik hacim yüzdesi (%)	4133921119	6159419232	2489859605	6666811461	3587632504	6612598177
Doku yüzey (mm <sup>2</sup> )	11,83516067	8,51679563	8,84391728	4,74816748	23,27352143	4,13836355
Kemik yüzey (mm <sup>2</sup> )	12,23089101	11,71888935	7,47915814	6,94437215	36,72156625	4,71245201
Ara yüzey (mm <sup>2</sup> )	9,82337708	4,19183519	2,53875998	2,95845270	10,18037048	2,50827212
Kemik yüzey/hacimsel (1/mm)	17,17880630	10,78618376	17,58326650	13,73382016	13,13895046	12,92415008
Kemik yüzey yoğunluk (1/mm)	0,11642252	6,64366277	4,37798650	9,15607897	4,71377257	8,54622113
Trabeküler kalınlık (mm)	0,16520482	0,33927389	0,23229871	0,32662625	0,39724654	0,28503004
Trabekül sayısı (1/mm)	3,55079151	1,81547104	1,07183531	2,04111319	0,90312491	2,31996536
Trabeküler ayrışma (mm)	0,08810013	0,31246738	0,56583299	0,22724288	0,56531470	0,26073551

Grup 2	7	8	9	10	11	12
Doku hacmi (mm <sup>3</sup> )	5,99651739	0,59543500	2,91491978	0,91961981	8,26743735	5,18429129
Kemik hacmi (mm <sup>3</sup> )	3,61250729	0,48479121	1,17246314	0,47840815	3,07964858	2,09369234
Kemik hacim yüzdesi (%)	6024342216	814179904	40,22	5202238427	3725034072	4038531442
Doku yüzey (mm <sup>2</sup> )	20,07933971	4,14157014	12,60258189	5,45672934	23,50445309	19,85982935
Kemik yüzey (mm <sup>2</sup> )	43,52108468	6,47373403	15,08415395	7,17778751	42,86750429	31,27175679
Ara yüzey (mm <sup>2</sup> )	13,85888996	3,19254314	4,13439725	2,41442357	9,57232998	8,61196885
Kemik yüzey/hacimsel (1/mm)	12,04733477	13,35365384	12,86535452	15,00348084	13,91960906	14,93617577
Kemik yüzey yoğunluk (1/mm)	7,25772675	10,87227660	5,17480929	7,80516846	5,18510180	6,03202155
Trabeküler kalınlık (mm)	0,30305838	0,29958396	0,34702043	0,27574128	0,32054829	0,26653730
Trabekül sayısı (1/mm)	1,98784877	2,71770191	1,15909104	1,88663750	1,16208203	1,51518436
Trabeküler ayrışma (mm)	0,36196939	0,12462575	0,38619998	0,25841730	0,44891566	0,41500914

**Tablo 13.** İnce kesit tomografide 3. grubun; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçüm sonuçları

Grup 3	1	2	3	4	5	6	7	8
Doku hacmi (mm <sup>3</sup> )	5,01906606	1,91887215	1,31178638	2,03806642	1,28032033	4,76504988	1,56153807	1,13531771
Kemik hacmi (mm <sup>3</sup> )	3,23039766	1,01948993	1,13103179	1,14702378	0,37142327	3,00137626	0,47220404	0,61057426
Kemik hacim yüzdesi (%)	6436252524	5312964350	8622072952	5628007202	2901018298	62398733248	3023967532	5378003451
Doku yüzey (mm <sup>2</sup> )	17,47571691	12,30923892	7,21736172	13,32839022	8,09772768	15,67903214	8,22479426	7,12909053
Kemik yüzey (mm <sup>2</sup> )	26,36525009	14,30559075	6,93613128	13,86380757	5,82899887	25,05794421	6,05064232	9,92861134
Ara yüzey (mm <sup>2</sup> )	2,91374725	4,69562019	5,71165623	4,02216412	2,43147906	9,54608217	69383033	3,00828934
Kemik yüzey/hacimsel (1/mm)	8,16161131	14,03210596	6,13256971	15,77180402	15,69368248	8,14663156	12,81361822	16,26110373
Kemik yüzey yoğunluk (1/mm)	5,25301914	7,45520787	5,28754634	7,31597327	4,55276600	5,25301914	3,87479655	8,74522720
Trabeküler kalınlık (mm)	0,28596474	0,41375768	0,66137336	0,82428916	0,24589582	0,46680392	0,30944643	0,27453678
Trabekül sayısı (1/mm)	1,54730723	1,87235967	1,30366197	1,43290027	1,17977537	1,33540604	0,97721844	1,95893735
Trabeküler ayrışma (mm)	0,38178277	0,23914465	0,30872356	0,27669290	0,44289193	0,42660641	0,53747362	0,21966209

**Tablo 14.** İnce kesit tomografide 4. grubun doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçüm sonuçları

Grup 4	1	2	3	4	5	6
Doku hacmi (mm <sup>3</sup> )	4,76092247	5,03063896	1,18071077	1,27904144	4,08110454	1,21828674
Kemik hacmi (mm <sup>3</sup> )	2,37426811	2,22423692	0,99900615	1,02720175	1,23178830	0,62636629
Kemik hacim yüzdesi (%)	4986991766	4421380551	8461057278	8031027910	3018271866	5141369977
Doku yüzey (mm <sup>2</sup> )	17,86455670	18,41143879	7,36831311	11,78361521	15,54506560	6,61923723
Kemik yüzey (mm <sup>2</sup> )	18,07442167	16,98133828	11,42824313	12,19516672	13,80795810	7,95210505
Ara yüzey (mm <sup>2</sup> )	9,82337708	8,69765260	4,95108673	8,54011291	5,06143858	3,35152979
Kemik yüzey /hacimsel (1/mm)	7,52609244	7,63468050	11,43961241	11,87222151	11,20968441	12,69561472
Kemik yüzey yoğunluk (1/mm)	4,03668025	3,37558279	9,67912158	9,53461423	3,38338751	6,52728524
Trabeküler kalınlık (mm)	0,71387403	0,64135208	0,36041191	0,35389582	0,34876000	0,31791370
Trabekül sayısı (1/mm)	0,77082155	0,68938430	2,34760758	2,26931980	0,86542948	1,61722188
Trabeküler ayrışma (mm)	0,78023361	0,81107374	0,11373795	0,19210047	0,83097686	0,39665130

Grup 4	7	8	9	10	11	12
Doku hacmi (mm <sup>3</sup> )	13,08388192	4,85161850	3,12560396	2,43660343	2,43931096	7,94788889
Kemik hacmi (mm <sup>3</sup> )	2,51222933	2,44269567	1,3190898	2,17259992	2,04333857	6,76529423
Kemik hacim yüzdesi (%)	1920094774	5034805751	4220271790	8916510149	8376703919	8512064424
Doku yüzey (mm <sup>2</sup> )	37,04229811	16,52690815	12,78033565	10,54686406	13,41235646	22,81879012
Kemik yüzey (mm <sup>2</sup> )	51,72325797	22,96800578	6,41863488	11,02322976	19,64738645	30,93189564
Ara yüzey (mm <sup>2</sup> )	8,87594047	8,91240850	0,90470997	8,65458304	11,23080474	16,63974511
Kemik yüzey /hacimsel (1/mm)	20,58858933	9,40272914	48,65957388	5,07375042	9,61533579	4,57214344
Kemik yüzey yoğunluk (1/mm)	3,95320428	4,73409147	2,05356627	4,52401471	8,05448210	3,89183795
Trabeküler kalınlık (mm)	0,19135281	0,38707818	0,08892388	0,92927822	0,42074196	0,82889098
Trabekül sayısı (1/mm)	1,00343171	1,30072065	0,47459378	0,95950921	1,99093619	1,02692207
Trabeküler ayrışma (mm)	0,68490814	0,74336684	0,86046487	0,27515046	0,20521326	0,33153672

**Tablo 15.** İnce kesit tomografide sağlam grubun doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçüm sonuçları

Sağlam Grup		
	Doku hacmi (mm <sup>3</sup> )	0,64895065
	Kemik hacmi (mm <sup>3</sup> )	0,36550104
	Kemik hacim yüzdesi (%)	5632185502
	Doku yüzey (mm <sup>2</sup> )	4,60362388
	Kemik yüzey (mm <sup>2</sup> )	3,78018994
	Ara yüzey (mm <sup>2</sup> )	0,79869275
	Kemik yüzey /hacimsel (1/mm)	23,48136901
	Kemik yüzey yoğunluk (1/mm)	5,82508074
	Trabeküler kalınlık (mm)	0,18917758
	Trabekül sayısı (1/mm)	1,31132056
	Trabeküler ayrışma (mm)	0,29918251

Üçüncü (kontrol 2-28 günlük ghrelin verilmeyen) ve dördüncü (ilaç-28 günlük ghrelin verilen) grupların total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyopak kemik ve düşük radyopak kemik ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 16).

**Tablo 16.** Üçüncü ve 4'üncü grupların total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyopak kemik ve düşük radyopak kemik ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Total kallus çapı (mm)	4. Grup ilaç	12	5479,90	4152,84	34,00	-1,08	0,28
	3. Grup Kontrol 2	8	4750,04	3994,11			
Femur çapı (mm)	4. Grup ilaç	12	3987,42	413,51	39,00	-0,69	0,49
	3. Grup Kontrol 2	8	4017,50	125,87			
Yüksek radyopak kemik (mm)	4. Grup ilaç	12	4056,58	641,42	44,00	-0,31	0,76
	3. Grup Kontrol 2	8	3894,75	166,40			
Düşük radyopak kemik (mm)	4. Grup ilaç	12	5603,50	508,11	43,00	-0,39	0,70
	3. Grup Kontrol 2	8	5568,25	827,55			

Birinci (kontrol-14 günlük ghrelin verilmeyen) ve ikinci (ilaç-14 günlük ghrelin verilen) grupların; total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyopak kemik ve düşük radyopak kemik ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 17).

**Tablo 17.** Birinci ve 2'nci grupların total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyopak kemik ve düşük radyopak kemik ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Total kallus çapı (mm)	2. Grup ilaç	12	6436,42	2296,43	40,00	-0,62	0,54
	1. Grup Kontrol	8	5176,53	3294,08			
Femur çapı (mm)	2. Grup ilaç	12	3896,33	321,53	40,00	-0,62	0,54
	1. Grup Kontrol	8	3789,25	310,00			
Yüksek radyopak kemik (mm)	2. Grup ilaç	12	3649,83	192,31	47,00	-0,08	0,94
	1. Grup Kontrol	8	3673,13	374,92			
Düşük radyopak kemik (mm)	2. Grup ilaç	12	5294,00	598,91	41,00	-0,54	0,59
	1. Grup Kontrol	8	5488,75	463,07			

Dördüncü (ilaç-28 günlük ghrelin verilen) ve ikinci (ilaç-14 günlük ghrelin verilen) grupların total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyopak kemik ve düşük radyopak kemik ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 18).

**Tablo 18.** İkinci ve 4'üncü grupların total kallus çapı, femur çapı, yüksek radyopak kemik ve düşük radyopak kemik ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Total kallus çapı (mm)	4. Grup ilaç	12	5479,90	4152,84	61,00	-0,64	0,53
	2. Grup ilaç	12	6436,42	2296,43			
Femur çapı (mm)	4. Grup ilaç	12	3987,42	413,51	66,00	-0,35	0,73
	2. Grup ilaç	12	3896,33	321,53			
Yüksek radyopak kemik (mm)	4. Grup ilaç	12	4056,58	641,42	45,00	-1,56	0,12
	2. Grup ilaç	12	3649,83	192,31			
Düşük radyopak kemik (mm)	4. Grup ilaç	12	5603,50	508,11	54,00	-1,04	0,30
	2. Grup ilaç	12	5294,00	598,91			

Dördüncü (ilaç-28 günlük ghrelin verilen) ve üçüncü (kontrol 2-28 günlük ghrelin verilmeyen) grupların total kallus çapı/femur çapı ve yüksek radyopak kemik/düşük radyopak kemik oranı ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 19).

**Tablo 19.** Üçüncü ve 4'üncü grupların total kallus çapı/femur çapı ve yüksek radyopak kemik/düşük radyopak kemik oranı ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Total kallus çapı (mm)/ Femur çapı (mm)	4. Grup İlaç	12	1,36	1,02	39,00	-0,71	0,48
	3. Grup Kontrol 2	8	1,19	1,00			
Yüksek radyopak kemik (mm)/ Düşük radyopak kemik	4. Grup İlaç	12	0,72	0,10	44,00	-0,31	0,76
	3. Grup Kontrol 2	8	0,71	0,07			

İkinci (ilaç-14 günlük ghrelin verilen) ve birinci (kontrol-14 günlük ghrelin verilmeyen) grupların total kallus çapı/ femur çapı ve yüksek radyopak kemik/düşük radyopak kemik oranı ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 20).

**Tablo 20.** Birinci ve 2'nci grupların total kallus çapı/femur çapı ve yüksek radyopak kemik/düşük radyopak kemik oranı ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Total kallus çapı (mm)/ Femur çapı (mm)	2. Grup ilaç	12	1,68	0,62	45,00	-0,23	0,82
	1. Grup Kontrol	8	1,40	0,90			
Yüksek radyopak kemik (mm)/ Düşük radyopak kemik	2. Grup ilaç	12	0,70	0,09	41,00	-0,54	0,59
	1. Grup Kontrol	8	0,67	0,08			

Dördüncü (ilaç-28 günlük ghrelin verilen) ve ikinci (ilaç-14 günlük ghrelin verilen) grupların total kallus çapı/ femur çapı ve yüksek radyopak kemik/ düşük radyopak kemik oranı ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 21).

**Tablo 21.** İkinci ve 4'üncü grupların total kallus çapı/femur çapı ve yüksek radyopak kemik/düşük radyopak kemik oranı ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Total kallus çapı (mm)/ Femur çapı (mm)	4. Grup ilaç	12	1,36	1,02	65,00	-0,41	0,69
	2. Grup ilaç	12	1,68	0,62			
Yüksek radyopak kemik (mm)/ Düşük radyopak kemik	4. Grup ilaç	12	0,72	0,10	61,50	-0,61	0,54
	2. Grup ilaç	12	0,70	0,09			

Birinci (kontrol-14 günlük ghrelin verilmeyen) ve ikinci (ilaç-14 günlük ghrelin verilen) grupların doku hacmi, kemik hacmi, kemik hacim yüzdesi, doku yüzey, kemik yüzey, ara yüzey, kemik yüzey /hacimsel, kemik yüzey yoğunluk, trabeküler kalınlık, trabekül sayısı, trabeküler ayrışma ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 22).

**Tablo 22.** Birinci ve 2'nci grupların; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Doku hacmi	1. Grup Kontrol	8	4,39	3,12	35,00	-1,00	0,32
	2. Grup ilaç	12	3,18	2,86			
Kemik hacmi	1. Grup Kontrol	8	1,74	1,18	33,00	-1,16	0,25
	2. Grup ilaç	12	1,40	1,18			
Kemik hacim yüzdesi	1. Grup Kontrol	8	50,13	27,62	43,00	-0,39	0,70
	2. Grup ilaç	12	50,67	16,56			
Doku yüzey	1. Grup Kontrol	8	16,47	7,79	30,00	-1,39	0,16
	2. Grup ilaç	12	12,25	7,55			
Kemik yüzey	1. Grup Kontrol	8	19,63	11,83	45,00	-0,23	0,82
	2. Grup ilaç	12	18,85	15,16			
Ara yüzey	1. Grup Kontrol	8	4,96	2,40	46,00	-0,15	0,88
	2. Grup ilaç	12	6,17	3,98			
Kemik yüzey /hacimsel	1. Grup Kontrol	8	15,50	5,76	46,00	-0,15	0,88
	2. Grup ilaç	12	13,96	1,97			
Kemik yüzey yoğunluk	1. Grup Kontrol	8	4,98	2,65	33,00	-1,16	0,25
	2. Grup ilaç	12	6,32	2,77			
Trabeküler kalınlık	1. Grup Kontrol	8	0,30	0,09	46,00	-0,15	0,88
	2. Grup ilaç	12	0,30	0,06			
Trabekül sayısı	1. Grup Kontrol	8	1,25	0,74	27,00	-1,62	0,11
	2. Grup ilaç	12	1,84	0,77			
Trabeküler ayrışma	1. Grup Kontrol	8	0,51	0,27	29,00	-1,47	0,14
	2. Grup ilaç	12	0,33	0,15			

Üçüncü (kontrol 2-28 günlük ghrelin verilmeyen) ve dördüncü (ilaç-28 günlük ghrelin verilen) grupların doku hacmi, kemik hacmi, kemik hacim yüzdesi, doku yüzey, kemik yüzey, ara yüzey, kemik yüzey /hacimsel, kemik yüzey yoğunluk, trabeküler kalınlık, trabekül sayısı, trabeküler ayrışma ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 23).

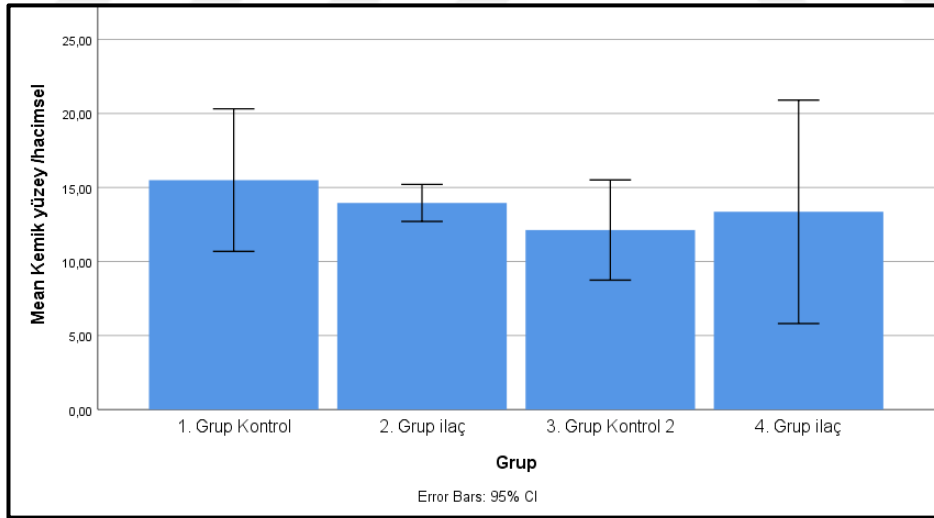
**Tablo 23.** Üçüncü ve 4'üncü grupların; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Doku hacmi	3. Grup Kontrol 2	8	2,38	1,58	32,00	-1,23	0,22
	4. Grup ilaç	12	4,29	3,41			
Kemik hacmi	3. Grup Kontrol 2	8	1,37	1,12	30,00	-1,39	0,16
	4. Grup ilaç	12	2,14	1,60			
Kemik hacim yüzdesi	3. Grup Kontrol 2	8	54,43	18,55	47,00	-0,08	0,94
	4. Grup ilaç	12	59,20	24,21			
Doku yüzey	3. Grup Kontrol 2	8	11,18	4,07	30,00	-1,39	0,16
	4. Grup ilaç	12	15,89	8,12			
Kemik yüzey	3. Grup Kontrol 2	8	13,54	8,19	35,00	-1,00	0,32
	4. Grup ilaç	12	18,60	12,46			
Ara yüzey	3. Grup Kontrol 2	8	4,91	2,42	24,00	-1,85	0,06
	4. Grup ilaç	12	7,97	4,06			
Kemik yüzey /hacimsel	3. Grup Kontrol 2	8	12,13	4,05	36,00	-0,93	0,35
	4. Grup ilaç	12	13,36	11,88			
Kemik yüzey yoğunluk	3. Grup Kontrol 2	8	5,97	1,67	34,00	-1,08	0,28
	4. Grup ilaç	12	5,31	2,53			
Trabeküler kalınlık	3. Grup Kontrol 2	8	0,44	0,21	42,00	-0,46	0,64
	4. Grup ilaç	12	0,47	0,26			
Trabekül sayısı	3. Grup Kontrol 2	8	1,45	0,33	34,00	-1,08	0,28
	4. Grup ilaç	12	1,28	0,63			
Trabeküler ayrışma	3. Grup Kontrol 2	8	0,35	0,11	37,00	-0,85	0,40
	4. Grup ilaç	12	0,52	0,29			

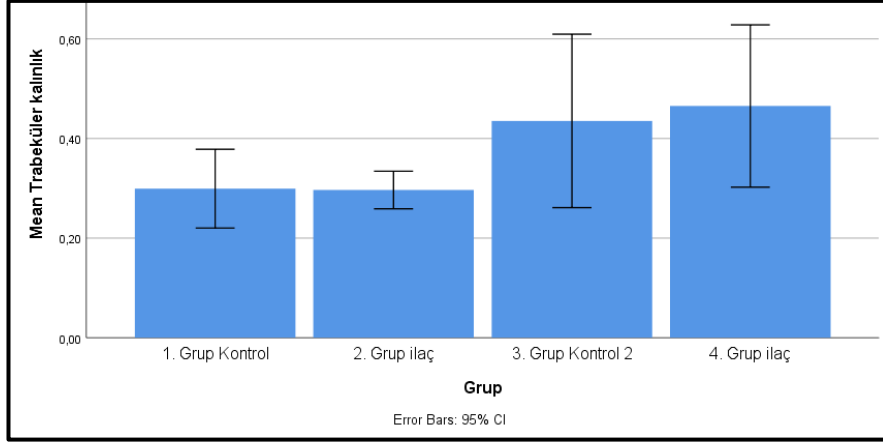
İkinci (ilaç-14 günlük ghrelin verilen) ve dördüncü (ilaç-28 günlük ghrelin verilen) grupların doku hacmi, kemik hacmi, kemik hacim yüzdesi, doku yüzey, kemik yüzey, ara yüzey, kemik yüzey yoğunluk, trabekül sayısı, trabeküler ayrışma ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Bununla birlikte, grupların kemik yüzey/hacimsel ve trabeküler kalınlık ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İkinci grubun kemik yüzey/hacimsel ölçüm skorları, dördüncü grubun ise trabeküler kalınlık ölçüm skorları anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır (Tablo 24) (Şekil 37,38).

**Tablo 24.** İkinci ve 4'üncü grupların; doku, kemik ve trabeküle ilişkin ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Doku hacmi	2. Grup ilaç	12	3,18	2,86	55,00	-0,98	0,33
	4. Grup ilaç	12	4,29	3,41			
Kemik hacmi	2. Grup ilaç	12	1,40	1,18	46,00	-1,50	0,13
	4. Grup ilaç	12	2,14	1,60			
Kemik hacim yüzdesi	2. Grup ilaç	12	50,67	16,56	54,00	-1,04	0,30
	4. Grup ilaç	12	59,20	24,21			
Doku yüzey	2. Grup ilaç	12	12,25	7,55	54,00	-1,04	0,30
	4. Grup ilaç	12	15,89	8,12			
Kemik yüzey	2. Grup ilaç	12	18,85	15,16	63,00	-0,52	0,60
	4. Grup ilaç	12	18,60	12,46			
Ara yüzey	2. Grup ilaç	12	6,17	3,98	53,50	-1,07	0,29
	4. Grup ilaç	12	7,97	4,06			
Kemik yüzey /hacimsel	2. Grup ilaç	12	13,96	1,97	29,00	-2,48	<b>0,01</b>
	4. Grup ilaç	12	13,36	11,88			
Kemik yüzey yoğunluk	2. Grup ilaç	12	6,32	2,77	48,00	-1,39	0,17
	4. Grup ilaç	12	5,31	2,53			
Trabeküler kalınlık	2. Grup ilaç	12	0,30	0,06	32,00	-2,31	<b>0,02</b>
	4. Grup ilaç	12	0,47	0,26			
Trabekül sayısı	2. Grup ilaç	12	1,84	0,77	39,00	-1,91	0,06
	4. Grup ilaç	12	1,28	0,63			
Trabeküler ayrışma	2. Grup ilaç	12	0,33	0,15	48,00	-1,39	0,17
	4. Grup ilaç	12	0,52	0,29			



**Şekil 37.** Grupların kemik yüzey/hacimsel ölçüm skorları



**Şekil 38.** Grupların trabeküler kalınlık ölçüm skorları

Grupların dansitometri ölçüm sonuçları Tablo 25’de, grafiği ise Şekil-39’dadır.

**Tablo 25.** Grupların dansitometri ölçüm sonuçları

1.Grup kontrol	Dansitometri (gr/cm3 ca)	3.Grup kontrol	Dansitometri (gr/cm3 ca)	2.Grup ilaç	Dansitometri (gr/cm3 ca)	4.Grup ilaç	Dansitometri (gr/cm3 ca)
1	1,446	1	1,853	1	1,562	1	1,834
2	1,378	2	1,205	2	1,445	2	1,090
3	1,427	3	0,916	3	1,374	3	1,798
4	1,417	4	1,422	4	1,332	4	1,355
5	1,393	5	1,327	5	1,557	5	1,854
6	1,685	6	1,387	6	1,550	6	1,859
7	1,402	7	1,366	7	1,334	7	1,823
8	1,427	8	1,364	8	1,574	8	1,860
				9	1,369	9	1,861
<b>Femur</b>	<b>Dansitometri (gr/cm3 ca)</b>			10	1,584	10	1,858
1	1,753			11	1,352	11	1,808
2	1,416			12	1,467	12	1,866

Tablo 26 incelendiğinde, 1 ve 2’nci grupların dansitometri ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). 1 ve 2’nci grubun (ilaç) dansitometri ölçüm skor ortalamaları birbirine oldukça yakın çıkmıştır.

**Tablo 26.** Birinci ve ikinci grupların dansitometri ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Grade	1. Grup kontrol	8	1446,88	98,60	48,00	0,00	1,00
	2. Grup İlaç	12	1458,33	102,75			

Tablo 27 incelendiğinde, 1’inci (14 günlük ghrelin verilmeyen) ve 3’üncü (28 günlük ghrelin verilmeyen) grupların dansitometri ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). 1’inci grubun (kontrol-14 günlük ghrelin verilmeyen) dansitometri ölçüm skorları 3’üncü grubun (kontrol 2-28 günlük ghrelin verilmeyen) skorlarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

**Tablo 27.** Birinci ve üçüncü grupların dansitometri ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Grade	1. Grup kontrol	8	1446,88	98,60	13,00	-2,00	0,046
	3. Grup Kontrol 2	8	1355,00	259,04			

Tablo 28 incelendiğinde, 2'nci (14 günlük ghrelin verilen) ve 4'üncü (28 günlük ghrelin verilen) grupların dansitometri ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). 4'üncü grubun (İlaç 2-28 günlük ghrelin verilen) dansitometri ölçüm skorlarının 2'nci grubun (İlaç-14 günlük ghrelin verilen) skorlarından anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür.

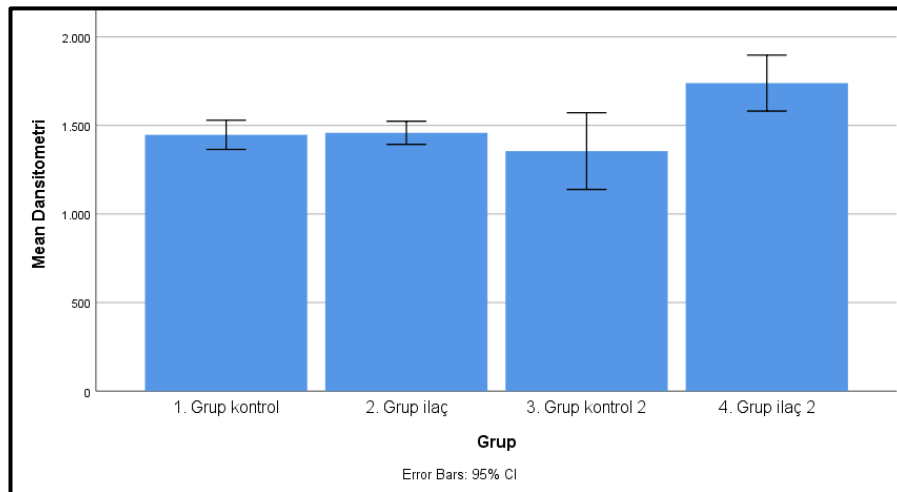
**Tablo 28.** İkinci ve dördüncü grupların dansitometri ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Grade	2. Grup İlaç	12	1458,33	102,75	21,00	-2,94	0,003
	4. Grup ilaç 2	12	1738,83	248,71			

Tablo 29 incelendiğinde, 3'üncü (28 günlük ghrelin verilmeyen) ve 4'üncü (28 günlük ghrelin verilen) grupların dansitometri ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). 4'üncü grubun (İlaç 2-28 günlük ghrelin verilen) dansitometri ölçüm skorları 3'üncü grubun (kontrol 2-28 günlük ghrelin verilmeyen) skorlarından anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır.

**Tablo 29.** Üçüncü ve dördüncü grupların dansitometri ölçümlerinin karşılaştırılması

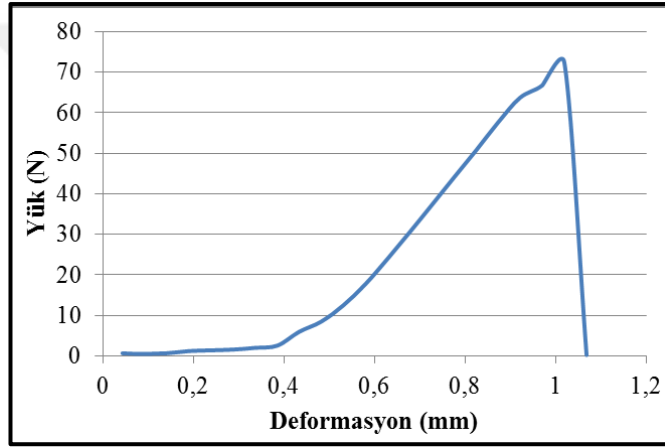
Ölçüm	Grup	N	Ort	Ss	U	Z	p
Grade	3. Grup Kontrol 2	8	1355,00	259,04	16,00	-2,47	0,014
	4. Grup ilaç 2	12	1738,83	248,71			



**Şekil 39.** Grupların dansitometri ölçüm skorları

## 4.2. BİYOMEKANİK BULGULAR

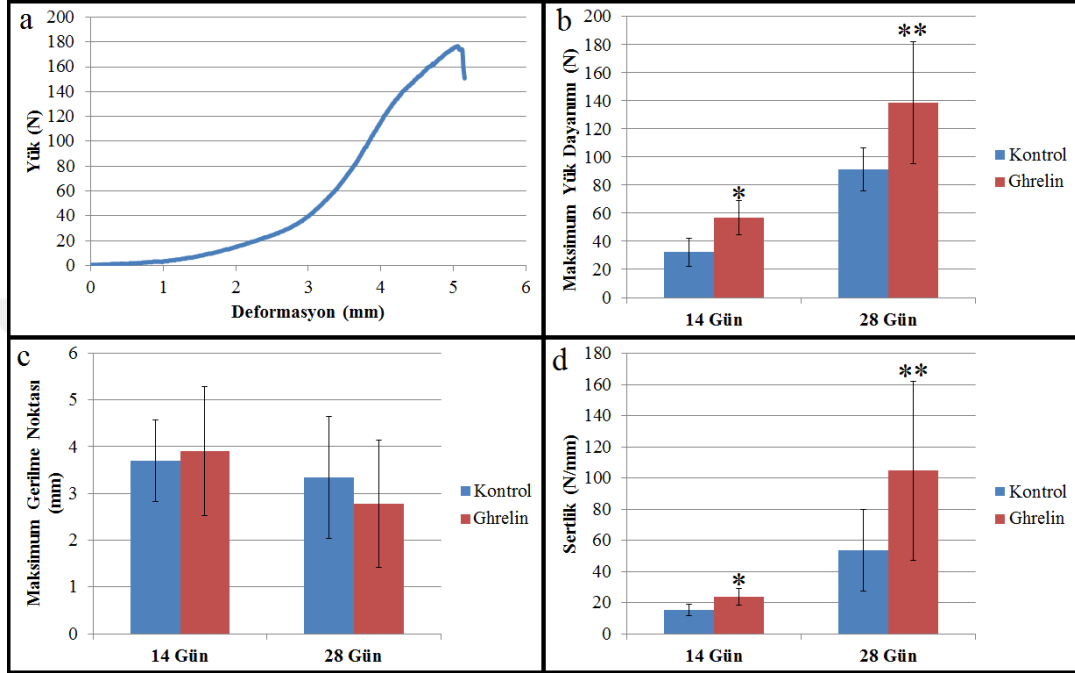
Biyomekanik test sonuçları ile karşılaştırmak için ilk olarak sağlıklı (kırık oluşturulmamış) femurlara 3 noktadan eğme testi uygulanmıştır. Test sonucunda elde edilen örnek yük/deformasyon grafiği Şekil 40'da gösterilmiştir. Grafikten maksimum yük dayanımı, kırılma anındaki maximum gerilme noktaları ve grafiğin kırılmadan önce doğrusal arttığı bölgenin eğiminden sertlik değerleri hesaplanmıştır. Sağlıklı femur kemikleri,  $83.88 \pm 16.3$  N maksimum yük dayanımı ve kırılma anında  $1.28 \pm 0.1$  mm maximum gerilme miktarı göstermişlerdir. Sağlıklı femurların sertlik miktarları  $128.03 \pm 13.7$  N/mm olarak hesaplanmıştır (n=2).



Şekil 40. Sağlıklı femurlar ile yapılan 3 noktalı eğme testi yük/deformasyon grafiği.

Ghrelın verilen rat grubunun 28 günlük iyileşme süresi sonrası femur kemiğine uygulanan 3 noktalı eğme testi yük/deformasyon grafiği Şekil 41a'dadır. Grafikte kemiğin kırılma noktası net bir şekilde görülmektedir. Kırılma testi öncesinde kemikler incelendiğinde 14 ve 28 günlük iyileşme süresi sonunda kırılma bölgesinde kalın bir kallus dokusu olduğu görülmüştür. Üç noktadan eğme testi sonucu kemikler kallus bölgesinden kırılma eğilimi göstermiştir. Maksimum yük dayanımı açısından, 14 ve 28 günlük iyileşme süresi sonunda ghrelın verilen gruplarda, kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek yük dayanımı görülmüştür (Şekil 41b). Grupların kırılmadan önce ulaşabildikleri maksimum gerilme noktaları birbiriyle benzer bulunmuştur (Şekil 41c). Sağlıklı kemik sonuçları ile karşılaştırıldığında, kırık modeli oluşturulan deney gruplarının maksimum gerilme noktaları daha yüksek çıkmıştır. Bu durumun kırıldıktan sonra iyileşen kemik dokusunun kalın kallus dokusu nedeniyle daha güçlü iyileşmesinden olduğu düşünülmüştür. Sertlik değerleri hesaplandığında ghrelın

grupları, istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek sertlik değerine sahip görülmüştür (Şekil 41d). Biyomekanik analiz sonucunda, ghrelin tedavisinin femur kırık modelinde kemik iyileşme süresini kısalttığı ve biyomekanik özellikler yönünden daha iyi bir kemik doku oluşumunu desteklediği görülmüştür (Tablo 30).



**Şekil 41.** (a) Ghrelin grubu ratların 28 günlük iyileşme süresi sonrası femur kemiğine uygulanan 3 noktalı eğme testi yük/deformasyon grafiği, (b) ghrelin ve kontrol rat gruplarının 14 ve 28 günlük iyileşme süresi sonrasında femur kemiklerine yapılan 3 noktalı eğme testi analizi sonucu elde edilen maksimum yük dayanımı, (c) maksimum gerilme noktası ve (d) sertlik grafikleri. \* Ghrelin grubu ile kontrol grubu arasındaki 14 gün sonunda istatistiksel anlamlı farklılık;  $P<0,01$ . \*\* Ghrelin grubu ile kontrol grubu arasındaki 28 gün sonunda istatistiksel anlamlı farklılık;  $P<0,05$ .

**Tablo 30. Üç noktalı eğme testi ölçüm sonuçları**

		Maks. Yük Dayanımı (N)	Maks. Gerilme Noktası (mm)	Sertlik (N/mm)	Alan Atalet Momenti (I)	Maks. Eğilme Momenti (N.m)	Maks. Eğilme Gerilmesi (N/M2)	Elastisite Modülü (E)	Maks. Eğilme Gerilmesinde Yer Değiştirme (m)	Maks. Eğilme Gerilmesinde Şekil Değiştirme (E)
14 Gün	K1	40,683	3,154	18,661	8,9102E-06	0,183069	103346,387	446809,4921	0,003154	587,578519
	K2	28,042	5,33	12,67	1,99558E-05	0,126189	26147,35693	29868,10346	0,00533	816,27963
	K3	20,614	3,183	14,01	4,09877E-05	0,092763	7196,952795	6702,472521	0,003183	374,886667
	K4	36,007	3,235	20,15	6,1466E-05	0,1632375	9162,289154	5598,49056	0,003235	413,361111
	K5	64,377	3,752	21,93	9,31754E-06	0,2896965	127786,1906	444115,8015	0,003752	571,137778
	K6	47,642	4,635	19,78	1,96528E-05	0,214389	45926,22158	61258,07973	0,004635	722,716667
	K7	39,139	3,966	15,28	1,56066E-05	0,1761255	45028,39244	88389,63049	0,003966	586,086667
	K8	21,33	2,815	10,99	5,11213E-05	0,095985	7923,444249	6689,752824	0,002815	439,974074
	I1	33,501	1,999	21,37	1,39761E-05	0,1507545	44710,49353	194440,8862	0,001999	306,883519
	I2	24,551	3,311	11,664	1,36866E-05	0,1104795	31723,31073	85055,00156	0,003311	481,934444
	I3	68,226	5,295	18,086	1,39104E-05	0,307017	95677,7486	157826,7751	0,005295	850,141667
	I4	33,054	3,176	14,933	1,52425E-05	0,148743	45669,34974	114620,6984	0,003176	550,506667
I5	33,591	1,521	51,103	3,32732E-05	0,1511595	21374,74376	51316,12136	0,001521	265,048333	
I6	49,342	5,523	19,608	2,8719E-05	0,222039	31660,18129	24251,84928	0,005523	837,655	
I7	67,689	5,291	27,382	1,12563E-05	0,3046005	105400,3197	215022,6941	0,005291	763,275741	
I8	70,642	4,014	16,835	9,70616E-06	0,317889	163428,7395	509659,033	0,004014	741,846667	
I9	34,217	2,729	21,533	1,43431E-05	0,1539765	47449,78741	147287,0526	0,002729	446,747407	
I10	43,525	2,207	30,37	2,61141E-05	0,1958625	26850,91288	56605,38331	0,002207	292,631852	
I11	43,525	2,207	30,152	2,86911E-05	0,1958625	26521,33613	50888,82552	0,002207	317,562778	
I12	47,284	2,938	26,27	2,86911E-05	0,212778	28811,82901	41528,70593	0,002938	422,745556	
28 Gün	K1	92,569	3,606	47,35	2,38881E-05	0,4165605	102884,076	145116,4952	0,003606	787,977778
	K2	86,035	5,656	27,71	1,89702E-05	0,3871575	92859,74918	105153,2781	0,005656	953,140741
	K3	57,576	2,171	30,95	1,29226E-05	0,259092	86714,44647	375542,6371	0,002171	347,762037
	K4	103,398	3,718	71,42	8,5797E-06	0,465291	248652,104	947081,1156	0,003718	631,371481
	K5	103,129	4,261	35,34	7,50929E-06	0,4640805	370805,303	1408030,447	0,004261	946,888889
	K6	103,398	3,425	49,53	8,56471E-06	0,465291	259680,6773	1075579,271	0,003425	606,351852
	K7	89,436	1,726	62,19	1,1687E-05	0,402462	182515,023	1099339,85	0,001726	338,807407
	K8	94,001	2,121	106,62	1,22959E-05	0,4230045	178890,0982	833412,2571	0,002121	408,488889
	I1	46,299	1,585	72,45	2,87414E-05	0,2083455	28053,52007	74821,54086	0,001585	227,183333
	I2	176,695	5,061	77,69	9,15538E-06	0,7951275	405580,7755	1063508,606	0,005061	875,365556
	I3	192,357	2,342	124,32	1,13524E-05	0,8656065	384294,4359	1756169,922	0,002342	437,173333
	I4	76,101	1,599	63,86	9,75131E-06	0,3424545	168570,3371	1313548,189	0,001599	284,266667
I5	105,814	2,342	69,29	7,27111E-06	0,476163	350355,4148	2499756,045	0,002342	464,062963	
I6	69,389	1,269	83,09	2,21942E-05	0,3122505	280,0123912	267960,9123	0,001269	207,505	
I7	83,082	3,476	64,62	1,00314E-05	0,373869	186722,2103	650625,8098	0,003476	644,991111	
I8	169,446	1,075	188,15	8,54432E-05	0,762507	35741,18906	47278,0387	0,001075	159,458333	
I9	169,446	1,075	194,45	6,58299E-06	0,762507	583782,6585	10022955,96	0,001075	200,666667	
I10	87,831	3,206	56,75	3,02314E-05	0,3952395	46869,65387	58755,25986	0,003206	425,685556	
I11	122,466	3,711	61,82	1,72766E-05	0,551097	141948,1571	269002,7888	0,003711	611,627778	
I12	63,667	3,478	29,63	7,51407E-06	0,2865015	180157,8796	837576,5516	0,003478	608,65	

### 4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR

ALP, kalsiyum, fosfor parametreleri Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında ölçülmüştür. (Tablo 31).

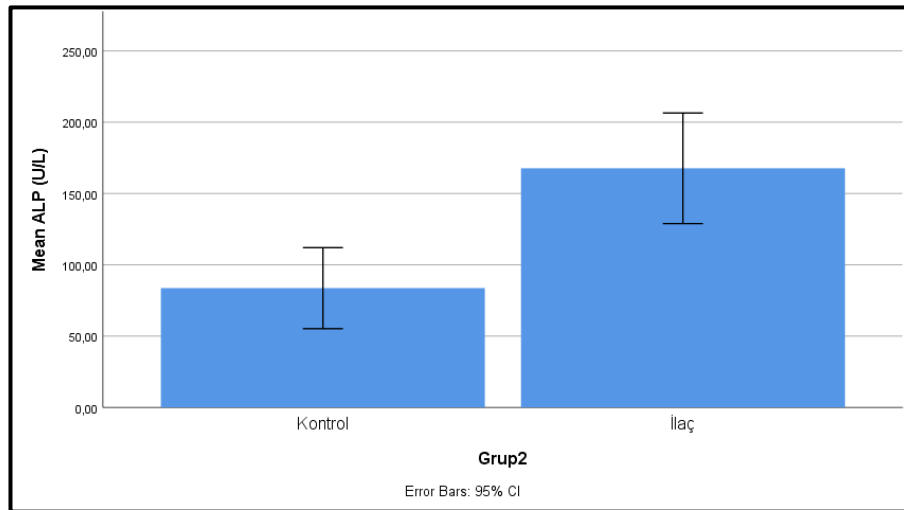
**Tablo 31.** Kontrol, ilaç ve sağlam gruplarının biyokimya ölçüm sonuçları

		ALP (U/L)	Ca (mg/dL)	P (mg/L)
İlaç Grubu	1	111	8,97	5,99
	2	156	9,28	6,42
	3	135	9,57	7,5
	4	147	9,89	6,54
	5	116	10,65	6,44
	6	146	9,65	7,55
	7	303	9,54	5,63
	8	238	10,06	7,19
	9	161	10	8,85
	10	122	8,76	8,9
	11	199	8,89	6,38
Kontrol Grubu	1	63	10,23	5,99
	2	70	10,14	6,33
	3	90	9,29	6,62
	4	154	9,35	6,03
	5	64	9,89	8,14
	6	45	9,76	6,53
	7	117	9,29	7,52
	8	76	9,85	7,07
Sağlam Grup		64	9,94	6,97

Kontrol ve ilaç gruplarının Ca ve P ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemekle ( $p>0,05$ ) birlikte, grupların ALP ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İlaç grubunun ALP ölçüm ortalamaları anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır (Tablo 32) (Şekil 42).

**Tablo 32.** Kontrol ve ilaç gruplarının ALP, Ca ve P ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
ALP (U/L)	Kontrol	8	83,63	33,99	6,00	-3,14	<0,01
	İlaç	11	167,64	57,72			
Ca (mg/dL)	Kontrol	8	9,73	0,38	34,50	-0,79	0,43
	İlaç	11	9,57	0,57			
P (mg/L)	Kontrol	8	6,78	0,75	39,50	-0,37	0,71
	İlaç	11	7,04	1,08			



**Şekil 42.** Kontrol ve İlaç Gruplarının ALP (U/L) Ölçüm Skorları

#### 4.4. HİSTOLOJİK BULGULAR

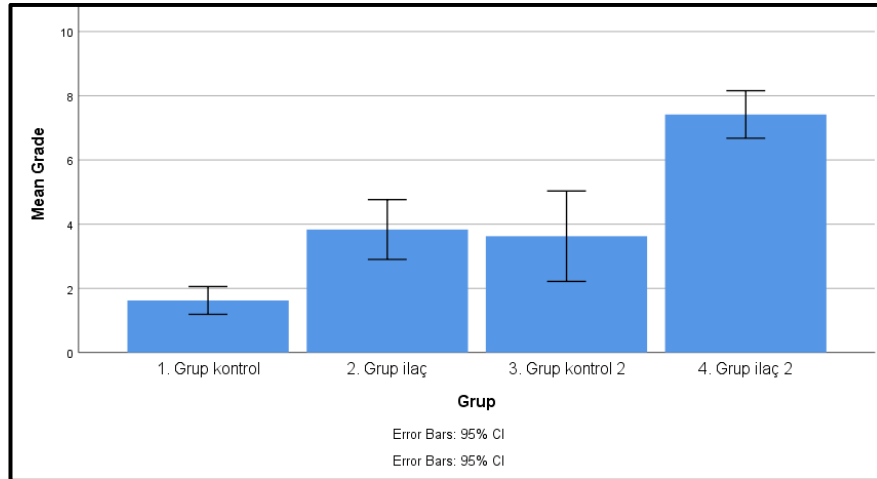
Boyanan örnekler, Huo ve ark.(104)'nın iyileşmenin histolojik skalasına (Tablo 33) göre skorlanmıştır (Tablo 34). Grade ölçüm skorlarının grafiği Şekil 43'dedir.

**Tablo 33.** Kırık iyileşmesinin histolojik skalası

Skor	Kırık bölgesi histolojik bulguları
1	Fibröz doku
2	Ağırlıklı fibröz doku
3	Eşit miktarda fibröz ve kıkırdak doku
4	Ağırlıklı kıkırdak ve az miktarda fibröz doku
5	Kıkırdak doku
6	Ağırlıklı kıkırdak ve az miktarda immatür kemik dokusu
7	Eşit miktarda kıkırdak ve immatür kemik dokusu
8	Ağırlıklı immatür kemik ve az miktarda kıkırdak doku
9	İmmatür kemik ile kırık iyileşmesi
10	Matür kemik ile kırık iyileşmesi

**Tablo 34.** Örneklerin iyileşmenin histolojik skalasına göre skorlanması

Kontrol 1	Grade	İlaç 1	Grade	Kontrol 2	Grade	İlaç 2	Grade
K1	1	İ1	2	K9	2	İ13	6
K2	2	İ2	2	K10	6	İ14	8
K3	2	İ3	3	K11	2	İ15	8
K4	1	İ4	6	K12	2	İ16	8
K5	2	İ5	4	K13	3	İ17	6
K6	1	İ6	3	K14	4	İ18	8
K7	2	İ7	6	K15	4	İ19	8
K8	2	İ8	6	K16	6	İ20	10
		İ9	3			İ21	7
		İ10	3			İ22	6
		İ11	4			İ23	7
		İ12	4			İ24	7



**Şekil 43.** Grupların grade ölçüm skorları.

Tablo 35 incelendiğinde, 1'inci (14 günlük ghrelin verilmeyen) ve 2'nci (14 günlük ghrelin verilen) grupların grade ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). 2'nci grubun (ilaç-14 günlük ghrelin verilen)

grade ölçüm skorları 1'inci grubun (kontrol-14 günlük ghrelin verilmeyen) ölçüm skorlarından anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır.

**Tablo 35.** Birinci ve ikinci grupların grade ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Grade	1. Grup Kontrol	8	1,63	0,52	5,00	-3,42	<0,001
	2. Grup İlaç	12	3,83	1,47			

Tablo 36 incelendiğinde, 1'inci (14 günlük ghrelin verilmeyen) ve 3'üncü (28 günlük ghrelin verilmeyen) grupların grade ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). 3'üncü grubun (kontrol 2-28 günlük ghrelin verilmeyen) grade ölçüm skorları 1'inci grubun (kontrol-14 günlük ghrelin verilmeyen) ölçüm skorlarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

**Tablo 36.** Birinci ve üçüncü grupların grade ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Grade	1. Grup Kontrol	8	1,63	0,52	7,50	-2,76	0,01
	3. Grup Kontrol 2	8	3,63	1,69			

Tablo 37 incelendiğinde, 2'nci (14 günlük ghrelin verilen) ve 4'üncü (28 günlük ghrelin verilen) grupların grade ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). 4'üncü grubun (İlaç 2-28 günlük ghrelin verilen) grade ölçüm skorları 2'nci grubun (İlaç-14 günlük ghrelin verilen) ölçüm skorlarından anlamlı olarak daha yüksek görülmüştür.

**Tablo 37.** İkinci ve dördüncü grupların grade ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	$\bar{X}$	Ss	U	Z	p
Grade	2. Grup İlaç	12	3,83	1,47	4,50	-3,96	<0,001
	4. Grup İlaç 2	12	7,42	1,16			

Tablo 38 incelendiğinde, 3'üncü (28 günlük ghrelin verilmeyen) ve 4'üncü (28 günlük ghrelin verilen) grupların grade ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmiştir ( $p<0,05$ ). 4'üncü grubun (İlaç 2-28 günlük ghrelin verilen) grade ölçüm skorları 3'üncü grubun (kontrol 2-28 günlük ghrelin verilmeyen) ölçüm skorlarından anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır.

**Tablo 38.** Üçüncü ve dördüncü grupların grade ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	Grup	N	Ort	Ss	U	Z	p
Grade	3. Grup Kontrol 2	8	3,63	1,69	3,00	-3,54	<0,001
	4. Grup İlaç 2	12	7,42	1,16			

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın en önemli bulgusu; Ghrelin'in kırık iyileşme süresini kısaltması ve biyomekanik özellikler yönünden daha iyi bir kemik doku oluşumu sağlamasıdır. Bu sonucu, çalışmada elde edilen; yüksek trabeküler kalınlık, kemik yüzey/hacim ve ALP oranı, yeni kemik yüzeyi görünümü, yüksek yük dayanımı, maksimum gerilme noktaları ve sertlik değeri hususları desteklemektedir.

Ghrelinin kırık iyileşmesindeki rolünü araştırma çalışmalarını yönlendiren temel düşünce, Aydın ve ark. (72) tarafından diş odontoplast tabakasında ghrelin sentezinin gösterilmesidir. Ayrıca, ghrelinin ratlarda intramembranöz kemik onarımını (40), insan osteoblast TE85 hücrelerini nitrik oksit/siklik guanozin monofosfat sinyal yoluyla (105) uyardığı ve osteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinde proliferasyonu ve farklılaşmayı teşvik ederken apoptozu önlediği gösterilmiştir (96).

Ghrelin ekseninin kondrojenez ve endokondral kemikleşmede önemli rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır (47,102). İn vitro olarak, ghrelinin, primer kültürlenmiş osteoblast hücrelerinin, sırasıyla UMR106 hücreleri ve MC3T3-E1 hücrelerini içeren ölümsüzleştirilmiş osteoblast hücre hatlarının çoğalmasını uyardığı tespit edilmiştir (91).

Ghrelin ve GHSR1a'nın ekspresyonu osteoblastlarda görülmüş (41,44,91) ve ghrelinin, rat, fare ve insan osteoblastlarının çoğalması (41,44,45,91), fare ve rat osteoblastlarının farklılaşması (44) üzerinde olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir. Osteoblastların aksine, sadece birkaç çalışma, ghrelinin osteoklast fonksiyonunda bir rolü olduğunu bildirmiştir. Ghrelin ve GHSR1a'nın fare osteoklastları tarafından eksprese edildiği (46) ve ghrelinin rat osteoklast rezorpsiyonunu artırdığı bildirilmiştir (45). Bu çalışmalar, ghrelinin osteoblastların ve osteoklastların işlevini doğrudan düzenleyebileceğini göstermektedir.

Kemik sertliğinde önemli olan yapı kortikal kemiktir ve sağlamlığı etkileyen birincil etmendir. Kemik entegrasyonunun oluşumunda belirleyici rol oynayan trabeküler kemiktir. Lee ve ark. (106) 2017 yılında yaptıkları çalışmada 4 farklı kemik kalitesi kategorisindeki kemik örneklerini Mikro-BT ile taramışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda kemik kalitesi ile kemik hacim yoğunluğu, kemik yüzey alanı / kemik hacmi oranı arasında istatistiksel olarak ilişki olduğunu ortaya

koymuşlardır. Yine Rocabado ve ark. (107) 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada ratlarda overektomi sonrası kırık morfolojisini mikrotomografi kullanarak analiz etmişlerdir. Kemik yüzeyi, incelenen alandaki trabeküllerin ortalama yüzey alanını ifade etmektedir. Trabekül sayısı ve trabekül kalınlığı kemik yüzeyi ile doğru orantılı parametrelerdir. Kemik hacmi hem trabekül sayısı tarafından hem de trabekül kalınlığı tarafından doğru orantılı olarak etkilenmektedir. Trabeküler sayı, incelenen alandaki mm başına hesaplanan ortalama trabekül sayısıdır. Trabekül sayısının artması kemik gücünü artıran bir etmendir. Trabeküler kalınlık, inceleme alanında gözlemlenen trabeküllerin ortalama kalınlığını ifade etmektedir.

Mikrotomografik incelemede deney grubunun ortalama trabekül kalınlığı ve kemik yüzey yoğunluğu istatistiksel olarak önemli düzeyde artış göstermiştir. Kemik yüzey yoğunluğu değeri, trabekül kalınlığı ve hacminden etkilenen bir parametredir. Kemik gelişiminin devam ettiği bölgelerde daha yüksek kemik yüzey yoğunluğu değerlerine ulaşılmaktadır. Bu değerlerin yüksek oluşu, incelenen bölgedeki kemiğin mekanik özelliklerinin olumlu yönde etkilendiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda radyolojik kaynama oranları bakımından 28 gün ghrelin verilen grupta trabekül kalınlığında anlamlı olarak artış saptanmıştır. 4 grup arasında total kallus çapı ve miktarı açısından anlamlı fark tespit edilmemiştir. Deney grubunda ortalama trabeküler kalınlıkta artış, deney grubu lehine kemikleşme miktarında artışı ifade etmektedir. Trabeküler kalınlık arttıkça kemik gücü de artacaktır.

Oluşan yeni kemik dokusunun ortalama hacim yüzdesinin, deney grubunda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda gruplar arasında trabekül sayısı ölçümleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Grupların maksimum yük dayanımı sonuçları incelendiğinde, 14 ve 28 günlük iyileşme süresi sonunda ghrelin uygulanan grupların, kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek yük dayanımına sahip olduğu görülmüştür. Sağlıklı kemik sonuçları ile karşılaştırıldığında, kırık modeli oluşturulan deney gruplarının maksimum gerilme noktalarının daha yüksek olduğu izlenmiştir. Bu durumun kırıldıktan sonra iyileşen kemik dokusunun kalın kallus dokusu nedeniyle daha güçlü iyileşmesinden olduğu düşünülmüştür. Grupların sertlik değerleri hesaplandığında ghrelin uygulanan grupların istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek

sertlik değerine sahip olduğu grlmtr. Biyomekanik analiz sonucunda, ghrelin tedavisinin femur kırık modelinde kemik iyileşme süresini kısalttığı ve biyomekanik özellikler yönünden daha iyi bir kemik doku oluşumunu desteklediği grlmtr.

Endokondral ve intramembranöz kemik ossifikasyonu aşamasında tip 1 kollajen seviyesi, Alkalenfosfataz (ALP) ve kemik spesifik proteinler matriksin mineralizasyonuna kadar artar. Yeni olumu rgms kemiğin lameller kemiğe dönüşümü balar. Bizim literatür araştırmamıza göre ghrelinin ALP aktivitesini ve kalsifiye birikimi artırdığı gösterilmiştir. Bu veriler, ghrelinin osteoblast farklılaşmasını uyardığını teyit etmektedir. Aynı zamanda ghrelinin, osteoblast farklılaşma göstergeleri COLI, ALP ve OCN'yi kodlayan genlerin transkripsiyonunu artırdığı bulunmuştur. Ancak, ghrelinin transkripsiyon göstergesi Runx2'yi değitirmedıği grlmtr (44). Çalışmamızda grupların ALP lmleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. İlaç grubunun ALP lm ortalamaları anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır.

Osteoblastlarda ghrelin ve GHS-R1a tanımlanmış ve ghrelinin, doğrudan in vitro osteoblast proliferasyonunu ve farklılaşmasını teşvik ettiği ve in vivo olarak kemik mineral yoğunluğunu artırdığı gösterilmiştir (44). Büyüme hormonu salgılatıcılarının iskelet büyümesini (9) hızlandırdığı ve BMD'yi artırdığı bildirilmiştir. Bu bulgular, ghrelinin, in vivo kemik formasyonunu artırdığını düşündürmektedir. Bu hipotezin desteğinde, normal SD ratlarında, ghrelin tedavisinin salin tedavisi ile karşılaştırıldığında BMD'yi önemli ölçüde artırdığı grlmtr (44). Normal SD ratlarda, ghrelin, GH salgılamasını (3) harekete geçirir ve GH-IGF-I ekseninin aktivasyonu yoluyla kemik oluşumunu teşvik edebilir (44). Bu eksen boyunca kemik oluşumu üzerine ghrelinin etkilerinin büyüklüğünü değerlendirmek için, GH eksikliği olan SDR'lerde ghrelinin BMD zerine etkisi incelenmiştir. Kemik oluşumu üzerinde ghrelinin direkt etkisini değerlendirmeye imkan veren bu ratlar, GH ve dolayısıyla GH-IGF-I eksenine sahip değildir. Beklendiği gibi, ghrelin SDR'lerde bile BMD'yi artırır. Genel olarak, vücut ağırlığı gibi dinamik yükleme, kemik oluşumunu teşvik eder ve BMD'yi artırır. Bu faktörlerin karıştırıcı etkilerini ortadan kaldırmak için, uygun ghrelin konsantrasyonları kullanılarak bir in vivo çalışma yapılmış (36), öyle ki, vücut ağırlığında ve gıda alımında artış olmamıştır. In vitro çalışmaların bulguları ile

birlikte, bu veriler ghrelinin doğrudan kemik oluşumunu teşvik ettiğini ve BMD'yi artırdığını açıkça ortaya koymaktadır (44).

Ghrelinin kemik ve kıkırdak mikro ortamları üzerinde doğrudan ve dolaylı düzenleyici etkileri olduğu görülmektedir (44,46,47,96). Bazı insan popülasyonlarında ghrelin seviyeleri ile kemik mineral yoğunluğu (BMD) arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir (42,94,98,99) ve ghrelinin uygulaması kemirgenlerde BMD'yi artırmıştır (44). Bu bulgular bize yaptığımız çalışmada ghrelinin postop 28.gün deney grubunda BMD'yi diğer gruplara göre artırdığını göstermiştir.

Ghrelinin ve GHS-R1'in rat osteoblastlarında tespit edilmesi, osteoblastların ghrelin sinyaline duyarlı olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda ghrelinin direkt olarak osteoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını uyardığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda ghrelinin ALP ve OSC gen transkripsiyonunu da artırdığı gözlenmiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak ghrelinin kemik yapımını artırıcı rol oynadığı sonucuna varılmıştır (44,91).

Travma sonrası kırık iyileşmesi süreci kemik iliği hücrelerini içeren hematoma aracılığı ile inflamatuvar yanıt başlar. İnflamasyon fazında hasarlı dokular yok edilir; inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler aracılığı ile anjiyogenezis uyarılır. Endosteal yüzeyde osteoblastlar çoğalarak granülasyon dokusu oluşumu sağlanır (108). Hasarlı dokunun yerine artan hücre sayısı ve matriks üretimi ile birlikte onarım fazı başlar. Yapılan hayvan çalışmalarında, yumuşak kallus oluşumunun 7.–9. Günlerde başladığı; matrikste proteoglikan ve Tip 2 kollajen seviyesinde artış olduğu görülmüştür (109). Kırık uçları arasında ve periostun dış kısmında encondral kemikleşme başlar, çoğunlukla fibröz ve kıkırdak dokudan oluşan yumuşak kallus meydana gelir. Kırık hattında meydana gelen damarlanma, kondrosit apoptozisi ve osteoblastların çoğalması ile sert kallus oluşumu başlar. Aynı zamanda, kırık bölgesinde subperiosteal alanda fragmanları birbirine bağlayan intramembranöz kemikleşme ile sert kallus oluşumu gerçekleşir. İntramembranöz kemikleşmede mezenkimal kök hücreler osteoblastlara farklılaşır ve direkt kemik dokusu oluşumu olur. Bu çalışmada histomorfometrik analiz için kırık iyileşmesi skorlaması yapılmıştır. Ghrelin verilen gruplarda yeni kemik oluşumu ve osteoblast aktivitesi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu veriler günlük verilen ghrelin dozunun rat

femurlarında kırık iyileşmesinin erken fazını, artmış yeni kemik oluşumu, osteoblast aktivitesi ile histolojik olarak hızlandırdığı görülmüştür.

Çalışmamızda histolojik inceleme açısından ghrelin verilen gruplar ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ghrelin grubu preperatlarda 28.günde belirgin olarak encondral kemikleşme ve immatür kemik dokusu hakimiyeti izlenmiştir. Ghrelin verilen grup preperatlarında yalnızca bir tanesinde matür kemik oluşumu gözlenmiştir. Kontrol grubunda 28.günde incelenen preperatlarda yaygın kıkırdak dokusu ve fibröz doku görülmüştür. Çalışmanın 14.gününde deney grubu ile kontrol grubu arasında fibröz doku ve kıkırdak doku oluşumu açısından anlamlı bir fark izlenmiştir. Yapılan çalışmalarda mineralizasyona; Tip 1 kollajen, osteokalsin, osteonektin ve alkalin fosfataz seviyelerine bakılarak sert kallus oluşumunun 14. günde en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir (109). Deney grubu ve kontrol grubu preperatlarındaki histolojik görüntüler yumuşak kallus ve sert kallus oluşumunu destekler niteliktedir.

Histolojik incelemeler çalışmamızda osteoblastik aktivite açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Osteoblastik aktivite artışının kırık iyileşmesini olumlu etkilediği bilinmektedir (110). Deney grubunda kontrol grubuna göre osteoblastik aktivitenin daha fazla olması bu preperatların kırık iyileşmesinde daha ileri evrede olduğunu göstermektedir.

Bu göstergelerin her biri, farklılaşmayı harekete geçiren belli bir mekanizmayı belirtir. BMP2 ve TGF- $\beta$ , transkripsiyon, osteoblast farklılaşmasına yol açarak, Smad ve Runx2 faktörlerini aktive eden kemik oluşum faktörlerini temsil eder (45,47). Ghrelin tedavisi, birçok farklılaşma markörünün aktivasyonuna yol açmakla birlikte, ghrelinin, bağımsız bir şekilde Runx2'de osteoblast farklılaşmasını etkilediği düşünülerek, Runx2 mRNA ekspresyonunu değiştirmemiştir. Ancak, daha ilkel stromal hücrelerin aksine, bu çalışmada kullanılan hücre kültürü yöntemi, olgun osteoblastik hücreleri içermiştir; bu da bu çalışmada Runx2 ekspresyonunu etkilemede ghrelinin yetersizliğine neden olabilir. Osteoblast farklılaşmada ghrelinin modülasyonunun ayrıntılı mekanizmaları belirsiz kalır ve daha fazla çalışma gerektirir (44).

Ortaya çıkan kanıtlar, ghrelinin aktif olarak kemik yeniden şekillenmesine katıldığı kavramını desteklemektedir. İlk olarak, ghrelin reseptörü, primer

kültürlenmiş osteoblastlarda ve ölümsüzleştirilmiş osteoblast hücre hatlarında mRNA ve protein seviyesinde gösterilmiştir; bu, ghrelinin osteoblast hücreleri üzerinde fizyolojik bir fonksiyona sahip olabileceğine işaret eder (44,96). İkincisi, osteoblastik hücrelerin, hücre çoğalması ve farklılaşmasındaki artışla eksojen ghreline tepki verdiği bildirilmiştir (44,91,96). Üçüncüsü, in vivo olarak ghrelinin tatbik edilmesi, femurdaki endokondral kemik oluşumu ile karakterize edilen kemik mineral yoğunluğunu artırır. Bu etki büyüme hormonuna bağlı değildir, çünkü büyüme hormonu eksikliği olan cüce ratlarda benzer bir uyarıcı etki gözlenmiştir (44). Son olarak, in vitro deneyler, ghrelinin osteoblastlarla kemikleşmeyi uyarabildiğini göstermiştir (91,96). Tüm bu çalışmalar, ghrelinin fizyolojik koşullarda kemik yeniden şekillenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir (40).

Bulgular, ghrelinin intramembranöz kemik onarımı sırasında kemik rejenerasyonunu tetikleyebileceğine dair net kanıtlar sunmaktadır. Bu etki, osteoblastların, kemik defekti etrafındaki mezankimel kök hücrelerden farklılaşmasının uyarılmasıyla oluşabilir, (1) ghrelin, osteoblastların çoğalmasının ve farklılaşmasının güçlü bir uyarıcısıdır; ve (2) ALP, osteokalsin ve kollajen tip I osteoblast farklılaşma markörlerinin ekspresyonu, ghrelin ile artmaktadır (40). Diğer çalışmalarla birlikte (44,91,96), bu bulgular ghrelinin yüz ve kalvariadaki kemik defektlerinin iyileşmesinde kullanılabileceğini göstermektedir (40).

Osteoblastlar, adipositler ve miyositler, yaygın prekürsör hücrelerden, mezankimel kök hücrelerden türetildiğinden, bulgular ghrelinin osteoblast hücrelerinin (91,96) ve miyositlerin (111,112) farklılaşmasını uyardığını ortaya koyar. Ghrelinin, mezankimel kök hücrelerin soy tayininde önemli bir düzenleyici olarak yararlanılabileceği değerlendirilmektedir. Ghrelinin büyüme ve gelişmedeki önemi, ghrelinin endodermik, mezodermik ve ektodermik dokulardan türetilen çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlediğini gösteren çalışmalar ile açıklanmıştır (113).

Kemik metabolizmasının açıl ghrelin tarafından düzenlenmesi, açıl ghrelinin osteoblastlar ve osteoklastlar üzerindeki doğrudan etkisinin bir sonucu olabilir veya diğer hormonlarla dolaylı etkileşimler olabilir veya hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmaların bir kombinasyonu olabilir (41,44-46,91,96). Açıl ghrelinin ana fonksiyonlarından biri, büyüme hormonu salınımının uyarılmasıdır (3).

Çalışmamızda kontrol ve deney grupları arasında enfeksiyon saptanmamıştır. Takiplerde yara yeri akıntısı gözlenmemiştir. Bu bulgu ghrelinin antiinflamatuvar etkisinin hem kırık iyileşmesini hızlandırdığı hem de yara yeri iyileşmesi üzerine etkilerinin olabileceğini destekler niteliktedir.

Çalışmanın kısıtlılıklarından biri genetik ve moleküler analiz yapılmamasıdır. Kırık iyileşmesi aşamasında yapılan çalışmaların bir kısmında genetik incelemeler ve moleküler analizler yol gösterici olmuştur.

Çalışmamızda kontrol ve deney gruplarının nörolojik, endokrin, gastrointestinal ve kardiyovasküler semptomlar tam olarak değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda mikrotomografik olarak kortikal kemik morfolojisi trabeküler kemik morfolojisi ile karşılaştırılmamıştır.

Ghrelinin kırık iyileşmesinde serum ALP seviyesini artırmaktadır. Bizim çalışmamızda kemik yapım belirteçlerinden Osteokalsin, Tip 1 kollajen C-terminal propeptit (P1CP) ve Tip 1 kollajen N-terminal propeptit (P1NP) ölçümleri yapılmamıştır.

Bunlarla birlikte ghrelinin doz ve uygulanma süresi dikkatle incelenmelidir. Kırık iyileşmesi sonucu olumsuz etkisi gözlenmemesine rağmen diğer ilaçlarla olabilecek etkileşimler göz önünde bulundurulmalıdır. Ghrelinin birçok dokuda sistemik etkisi bulunmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda ghrelinin farklı uygulanma dozları ve formlarının oluşabilecek yan etkiler açısından incelenmesi gerekmektedir.

## 6. SONUÇ

Ghrelın uygulanan grupların kontrol gruplarına göre, 14 ve 28 günlük iyileşme süresi sonunda; kemik yüzey/hacimsel ve trabeküler kalınlık ölümleri ile ALP ölümlerinin daha yüksek çıktığı, daha yüksek yük dayanımına sahip olduğu, sağlıklı kemik sonuçları ile karşılaştırıldığında da, kırık modeli oluşturulan deney gruplarının maksimum gerilme noktalarının daha yüksek olduğu grlmştir. Bu durumun kırıldıktan sonra iyileşen kemik dokusunun kalın kallus dokusu nedeniyle daha güçlü iyileşmesinden olduğu dşnlmştir. Grupların sertlik değerleri hesaplandığında ise ghrelın uygulanan grupların daha yüksek sertlik değerine sahip olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak; bu bulgular, Ghrelın'ın kırık iyileşme süresini kısalttığını ve biyomekanik tespitlerden yola çıkılarak daha iyi bir kemik doku oluşumu sağladığını göstermektedir.

Gelecek alışmalarda, Ghrelın'ın insanlarda kırık iyileşmesine etkisinin araştırılarak, farmakolojik uygulamalarda dikkate alınmasının uygun olacağı değerlendirilmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Emeli A, Inanmaz ME, Işık C, Bentli R, Karakurt L, Belhan O, Serum Ghrelin Levels During Fracture Healing and Immunohistochemical Investigation of Ghrelin in Bone Tissue, *Acta Medica Mediterranea*, 2014, 30: 137
2. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury*. 2007 May; 38 Suppl 2:S11-8.
3. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, and Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656–660.
4. Choi K, Roh SG, Hong YH, et al., 2003 The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 144:754–759.
5. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC 1998 Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 19:55–79.
6. Lee, N.J. and H. Herzog, NPY regulation of bone remodelling. *Neuropeptides*, 2009. 43(6): p. 457-63.
7. Del Fattore, A., A. Teti, and N. Rucci, Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012. 4: p. 2302-21.
8. [http://faculty.seattlecentral.edu/jwhorley/Bones\\_241.pdf](http://faculty.seattlecentral.edu/jwhorley/Bones_241.pdf)
9. Nave JV, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Master Thesis, September 2015, Drug Delivery Systems for Bone Regeneration, <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/88773/2/36446.pdf>
10. <https://boneandspine.com/cortical-bone-and-cancellous-bone/>
11. <https://slideplayer.com/slide/10414180/> Bone: Structure, Physiology, and Mechanics BME 615 Published by Lindsey Fox
12. Korkusuz F, Tomin E, Yetkinler D.N., Timuçin M, Öztürk A, Korkusuz P, Yapay kemik dokusu Synthetic bone grafts, *TOTBİD Dergisi* 2011;10(2):134-142
13. Tanrıku S, Gönen E, Kırık iyileşmesi, *TOTBİD Dergisi* 2017; 16:455–475 <https://doi.org/10.14292/totbid.dergisi.2017.62>
14. Jang JH, Castano O, Kim HW, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 61, Issue 12, 5 October 2009, Pages 1065-1083, Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.008>

15. Schmitz MR, DeHart MM, Qazi Z, Shuler FD. Orthopaedic Tissues. In: Miller MD, Thompson SR, editors. Miller Review of Orthopaedics, 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. pp.1–83.
16. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/6-3-bone-structure/>
17. Brinker Mark R, O'Connor D. Kemik. In: Miller M (Ed) Miller'in Ortopedi Kitabı. Çeviri editörleri Yetkin H, Yazıcı M, Ankara, Adya, 1-44, 2006.
18. <http://library.open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>
19. Bala Y, Seeman E. Calcif. Tissue Int. (2015).
20. Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 3 (Supplement 3), S131-S139. doi: 10.2215/cjn.04151206
21. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, & Mirams M, (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. Int J Biochem Cell Biol, 40(1), 46-62. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.009
22. Mackie EJ, Tatarczuch L & Mirams M, (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. J Endocrinol, 211(2), 109-121. doi: 10.1530/joe-11-0048
23. <http://library.open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-4-bone-formation-and-development/>
24. Kılıçoğlu SS, Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 55(2):143-150, 2002.
25. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury 2011;42(6):551-5.
26. Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F, Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia, Clin. Orthopaed. Relat.Res. 469 (2011) 3118–3126.
27. Wanga Y, Newmana MR, Benoit DSW, University of Rochester, USA, Development of controlled drug delivery systems for bone fracture-targeted therapeutic delivery: A review, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 127 (2018) 223–236 <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.023>
28. [https://www2.aofoundation.org/wps/portal/surgerymobile?contentUrl=/srg/popup/further\\_reading/PFxM2/12\\_33\\_biol\\_fx\\_heal.jsp](https://www2.aofoundation.org/wps/portal/surgerymobile?contentUrl=/srg/popup/further_reading/PFxM2/12_33_biol_fx_heal.jsp)

29. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17(3):513–20.
30. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 2008;15:100–14.
31. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(2):179–86.
32. Us Ali Kemal. Kırıklar hakkında genel bilgiler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü Ders Notları, Ankara, 2005.
33. Gartner Leslie P, Hiatt James L. Cartilage and bone. *Color Textbook of Histology*. Saunders, Saint Louis, 114–130, 1997.
34. Miller Mark D. Bone. In: Miller M (Ed) *Review of Orthopaedics*. Saunders, Philadelphia. 1–22, 1996.
35. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, et al., (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (12): 5992.
36. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML, 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913.
37. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, et al., 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661.
38. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML et al., Ghrelin, *Molecular Metabolism* 4 (2015) 437-460 <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.005>
39. Wren AM, Small CJ, Ward HL, et al., (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141, 4325-4328.
40. Deng F, Ling J, Ma J, Liu C, Zhang W. Stimulation of intramembranous bone repair in rats by ghrelin. *Exp Physiol.* 2008 Jul; 93(7): 872-9. DOI: 10.1113/expphysiol.2007.041962.
41. Delhanty PJD, van der Eerden BCJ, van der Velde M, et al., (2006) Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol* 188:37–47.

42. Amini P, Cahill F, Wadden D, et al., (2013). Beneficial association of serum ghrelin and peptide YY with bone mineral density in the Newfoundland population. *BMC Endocr Disord*, 13(1), 35. doi: 10.1186/1472-6823-13-35
43. Choi HJ, Ki KH, Yang JY, et al., (2013) Chronic Central Administration of Ghrelin Increases Bone Mass Through a Mechanism Independent of Appetite Regulation *Plos One* 8, e65505.
44. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, et al., Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* 2005 May; 20(5): 790-8. Epub 2004 Dec 27.
45. Costa JL, Naot D, Lin JM, et al. Ghrelin is an osteoblast mitogen and increases osteoclastic bone resorption in vitro. *Int J Pept.* 2011;2011:605193. doi:10.1155/2011/605193
46. Van der Velde M, van der Eerden BC, Sun Y, et al., An age-dependent interaction with leptin unmasks ghrelin's bone-protective effects. *Endocrinology* 153: 3593–3602, 2012.
47. Caminos JE, Gualillo O, Lago F, et al., (2005) The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology* 146:1285–1292.
48. Callaghan B, Furness JB, Department of Anatomy and Neuroscience, University of Melbourne, Australia, Novel and Conventional Receptors for Ghrelin, Desacyl-Ghrelin, and Pharmacologically Related Compounds, <http://dx.doi.org/10.1124/pr.113.008433> *Pharmacological Reviews Pharmacol Rev* 66:984-1001, October 2014
49. Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, et al., (2004) Genomic Structure and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Ghrelin Gene *Endocrinology* 145, 4144-4153
50. Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, et al., (2001) Organization of the Mouse Ghrelin Gene and Promoter: Occurrence of a Short Noncoding First Exon *Endocrinology* 142, 3697-3700
51. Kojima M and Kangawa K (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85: 495–522. doi: 10.1152/physrev.00012.2004
52. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 2002;77:433-44.

53. Çelikbağ B, Akgöl G, Aydın S, Kamanlı A, Osteoporozlu Hastaların Serum ve Tükürüklerinde Ghrelin ve Obestatin Düzeyleri ve Stronsiyum Ranelatın Etkisi, DOI: 10.5152/tftrd.2014.24865 Türk Fiz Tıp Rehab Derg 2014;60:7-11
54. İlhan T, Erdost H, Ghrelin, Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med. 28 (2009), 1: 67-74
55. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL, 2008. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetitestimulating peptide hormone. Cell 132:387-396.
56. Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M, Structure, regulation and function of ghrelin, J. Biochem. 2012;151(2):119–128 doi:10.1093/jb/mvr134
57. Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM, and Schwartz TW (2004) Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. J Biol Chem 279:53806–53817.
58. Alexander SPH, Mathie A, and Peters JA (2011) Guide to receptors and channels (GRAC), 5th edition. Br J Pharmacol 164 (Suppl 1):S1–S324.
59. Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, et al., (2009) Ghrelin O-Acyltransferase (Goat) Has a Preference for N-Hexanoyl-Coa over N-Octanoyl-Coa as an Acyl Donor Biochem Biophys Res Commun 386, 153-158.
60. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T et al: Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immuno reactivity levels in humans. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2001; 86: 4753- 4758.
61. Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al., a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology 141: 4255–4261, 2000.
62. Yabuki A, Ojima T, Kojima M, et al., Characterization and species differences in gastric ghrelin cells from mice, rats and hamsters. J Anat 205: 239–246, 2004.
63. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, and Kangawa K (2000) Purification and Characterization of Rat Des-Gln14-Ghrelin, a Second Endogenous Ligand for the Growth Hormone Secretagogue Receptor J Biol Chem 275, 21995-22000

64. Wierup N, Yang S, McEvilly RJ, Mulder H, Sundler F. (2004) Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem.* 52 (3): 301-310.
65. Mitchell SE, Nogueiras R, Rance K, et al., (2006) Circulating hormones and hypothalamic energy balance: regulatory gene expression in the Lou/C and Wistar rats. *J Endocrinol.* 190 (3): 571-579.
66. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, et al., 2002. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87:2988-2991.
67. Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, et al., Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 13: 2748–2752, 2002.
68. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, et al., Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142: 788–794, 2001.
69. Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, et al., Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* 67: 1768–1776, 2002.
70. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, et al., 2004 Expression of ghrelin and its functional receptor, the type Ia growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:400–409.
71. Groschl M, Topf HG, Bohlender J, et al., (2005) Identification of ghrelin in human saliva: production by the salivary glands and potential role in proliferation of oral keratinocytes. *Clin Chem.* 51: 997-1006.
72. Aydin S, Ozercan IH, Geckil H, Dagli F, Aydin S, Kumru S, Kilic N, Sahin I, Ozercan MR. Ghrelin is present in teeth. *J Biochem Mol Biol.* 2007 May 31; 40(3): 368-72.
73. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M: The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86: 881- 887.
74. Arnaldi G, Mancini T, Kola B, et al., (2003) Cyclical Cushing's syndrome in a patient with a bronchial neuroendocrine tumor (typical carcinoid) expressing ghrelin and growth hormone secretagogue receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (12): 5834-5840.

75. Ghe C, Cassoni P, Catapano F, et al., (2002). The antiproliferative effect of synthetic peptidyl GH secretagogues in human CALU-1 lung carcinoma cells. *Endocrinology* 143, 484–491.
76. Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, et al., (2003) Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res.* 9 (2): 774-778.
77. Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, et al., (2004) Sleep Enhances Nocturnal Plasma Ghrelin Levels in Healthy Subjects *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, 963-967.
78. Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, et al., (2004) Alterations in the Dynamics of Circulating Ghrelin, Adiponectin, and Leptin in Human Obesity *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 10434-10439
79. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, et al., (2002) Plasma Ghrelin Levels in Lean and Obese Humans and the Effect of Glucose on Ghrelin Secretion *J Clin Endocrinol Metab* 87, 240-244
80. Sato T, Oishi K, Ida T, Kojima M, Molecular Genetics, Institute of Life Science, Kurume University, Japan, Physiological Functions and Pathology of Ghrelin, *American Journal of Life Sciences, Biology and Medicine of Peptide and Steroid Hormones*. Vol. 3, No. 3-2, 2015, pp. 8-16. doi: 10.11648/j.ajls.s. 2015030302.13
81. Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, et al., 2001. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 73, 54-61.
82. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, et al., Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Dec; 85(12): 4908-11.
83. Broglio F, Van Koetsveld P, Benso A, et al., 2002. Ghrelin Secretion is Inhibited by Either Somatostatin or Cortistatin in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(10), 4829-4832.
84. Giustina A, Mazziotti G&Canalis E, (2008). Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev*, 29(5), 535-559. doi: 10.1210/er.2007-0036
85. Wit JM & Camacho-Hubner C. (2011). Endocrine regulation of longitudinal bone growth. *Endocr Dev*, 21, 30-41. doi: 10.1159/000328119
86. Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G, Ghrelin, another factor affecting bone metabolism *Med Sci Monit*, 2010; 16(7): RA147-162.

87. Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, et al., 2004, Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* 146:355–364.
88. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, et al., 2002, Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *Journal of Cell Biology* 159:1029–1037.
89. Sibilgia V, Cocchi D, Pagani F, et al., 1999, Hexarelin a growth hormone -releasing peptide counteracts bone loss in gonadectomized male rats. *Growth Hormone IGF Research* 9:219–227.
90. Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS, 2003 ,AGA technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 124:795–841.
91. Maccarinelli G, Sibilgia V, Torsello A, et al., Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol.* 2005 Jan; 184(1): 249-56.
92. Ma C, Fukuda T, Ochi H et al., (2015) Genetic Determination of the Cellular Basis of the Ghrelin-dependent Bone Remodeling *Mol Metab* 4, 175-85
93. Shah M, Kola B, Bataveljic A, Arnett TR, Viollet B, Saxon L, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass. *Bone.* 2010; 47:309–19.
94. Napoli N, Pedone C, Pozzilli P, et al. Effect of ghrelin on bone mass density: the InChianti study. *Bone.* 2011; 49:257–63.
95. Pradhan G, Samson SL, Sun Y, 2013, USA, Ghrelin: much more than a hunger hormone, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013 November ; 16(6): 619–624. doi:10.1097/MCO.
96. Kim SW, Her SJ, Park SJ, et al., (2005) Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 37:359-369.
97. Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, Wilson PJ & Fraser WD. (2011). Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol*, 11, 12. doi: 10.1186/1472-6793-11-12
98. Misra M, Miller KK, Stewart V, Hunter E, Kuo K, Herzog DB & Klibanski A. (2005). Ghrelin and bone metabolism in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(9), 5082-5087. doi: 10.1210/jc.2005-0512

99. Weiss LA, Langenberg C & Barrett-Connor E. (2006). Ghrelin and Bone: Is There an Association in Older Adults?: The Rancho Bernardo Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(5), 752- 757. doi: 10.1359/jbmr.060209
100. Sun Y, Ahmed S, Smith RG, 2003, Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and Cellular Biology* 23:7973–7981.
101. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG, 2004, Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *PNAS* 101:4679–4684.
102. Gomez, R, Lago, F, Gomez-Reino, JJ, et al., (2009). Expression and modulation of ghrelin O-acyltransferase in cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 60(6), 1704-1709. doi: 10.1002/art.24522
103. Kul, S. (2014). Uygun istatistiksel test seçim kılavuzu/guideline for suitable statistical test selection. *Plevra Bülteni*, 8 (2), 26-29.
104. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 1991;9:383-90.
105. Wang DH, Hu YS, Du JJ, Hu YY, Zhong WD, Qin WJ. Ghrelin stimulates proliferation of human osteoblastic TE85 cells via NO/cGMP signaling pathway. *Endocrine*. 2009 Feb; 35(1): 112-7. doi: 10.1007/s12020-008-9117-3.
106. Lee JH, Kim HJ, Yun JH. Three-dimensional microstructure of human alveolar trabecular bone: a micro-computed tomography study. *J Periodontal Implant Sci*. 2017 Feb;47(1):20-29.
107. Rocabado JMR, Kaku1 M, Nozaki K, Ida T, Kitami1 M, Aoyagi1 Y, et al. A multi-factorial analysis of bone morphology and fracture strength of rat femur in response to ovariectomy. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* (2018) 13:318 <https://doi.org/10.1186/s13018-018-1018-4>
108. Rahn, BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Fackelman GE, editor. *Bone in Clinical Orthopedics*. Stuttgart, NY. Thieme; 2002. pp.287–326.
109. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(355 Suppl):S7–21.
110. Ito K, Perren SM. *AO Principles of Fracture Management*. Second expanded edition Vol. 1. Switzerland, George Thieme Verlag, 2007

111. Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, et al., (2007). Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 18, 986–994.
112. Zhang W, Zhao L & Mulholland MW (2007). Ghrelin stimulates myocyte development. *Cell Physiol Biochem* 20, 659–664.
113. Chanoine JP (2005). Ghrelin in growth and development. *Horm Res* 63, 129-138.



# ÖZGEÇMİŞ

## I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Tamer ERENER  
Doğum yeri ve tarihi : Antakya-28.07.1988  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Bekar  
Askerlik durumu : Yaptı.  
İletişim adresi ve telefonu : Cevizlidere Mah. 1243. Sk. No:5/8 Çankaya-  
Ankara  
Yabancı dili : İngilizce

## II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2006 - 2012 Ufuk Üniverstesi Tıp Fakültesi  
2002 – 2006 Ankara Halide Edip Lisesi  
1996 – 2002 Ankara Polatlı / Diyarbakır İlköğretim Ortaokul

## III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2014 – 2019 Asistan doktor

## IV- Mesleki Deneyimi

2014 – 2019 Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji  
Asistan Doktor

## V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

## VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları: (Ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap/kitap bölümü vb.)

Total kalça artroplastisinde vidalı ve vidasız asetabuler kapların karşılaştırılması  
World J Orthop 2017 September 18; 8(9): 705-709

## VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar  
Ödüller  
Projeleri  
Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

### **VIII- Diğer Bilgiler**

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

-Temel Bilimler ve Araştırma Okulu TOTBİD

-27. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi

-14.Temel Ortopedik Travma Eğitim Toplantısı

-14.Temel Artroplastik Kursu

-AO Temel Travma Kursu

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri

### **EKLER**

Etik kurul onayı belgesi

Toplantı no : 0051

553 nolu karar

Projenin adı ; Ghrelinin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi

Tarih:15.02.2019