



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2015; 29 (2): 91 - 95
http://www.fusabil.org

Trombositten Zengin Fibrin'in Kemik İyileşmesi Üzerine Etkileri*

Havva Nur CAN
Ali Said DURMUŞ

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Cerrahi Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Bu çalışmada, deneysel kemik defektlerinde trombositten zengin fibrin (TZF) uygulamasının kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 12 adet Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanıldı. Tavşanların her iki tibiasının proksimal metafizine yakın mesafede olmak üzere tibial defektler oluşturuldu. Oluşturulan 24 adet defektin on iki adedi boş bırakılarak kontrol grubu olarak değerlendirilirken, kalan defektler TZF ile dolduruldu. Klinik ve radyografik muayeneler operasyondan hemen sonra, 15, 30, 45 ve 60. günlerde gerçekleştirildi. Postoperatif 30. ve 60. günlerde altışar tavşan sakrifiye edilerek histopatolojik muayeneleri gerçekleştirildi.

Radyolojik ve histolojik muayeneler sonucunda TZF kullanılan defektlerdeki kemik iyileşmesinin daha iyi olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, TZF'nin erken dönem kemik iyileşmesini önemli miktarda artırdığı, iyi bir greft materyali olarak rahatlıkla kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kemik, iyileşme, trombositten zengin fibrin.

Effects of Platelet-Rich Fibrin on Bone Healing

This study aimed to investigate the effects of platelet-rich fibrin (PRF) used as bone healing accelerator in experimental bone defects.

In the study, 12 New Zealand rabbits were used. The defects, upper proximal metaphysis of both tibia of each rabbits were created. Twelve of twenty-four defects performed were left empty to serve as the control group and the remaining defects were filled with PRF. Clinical and radiographic examinations, immediately and the 15th, 30th, 45th and 60th days after the operation were performed. Postoperative 30th and 60th days, rabbits were sacrificed and histopathological examinations were performed.

Radiological and histological examinations showed that the bone healing in PRF defects was better than other.

As a result, PRF was observed to considerably improve early bone healing, and it was suggested that it can readily be used as a good graft material.

Key Words: Bone, healing, platelet-rich fibrin.

Giriş

Kemik defektlerinin onarımı ve kemik iyileşmesini hızlandırmak amacıyla kemik greftleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Greftlerin elde edilmesi sırasında gözlenebilen donör bölge morbiditesi, kan kaybı ve greftlerin sınırlı miktarda elde edilmeleri gibi sorunları çözebilmek için çalışmalar devam etmektedir (1-3).

Hemostaz aşamasında önemli görevleri olan fibrin çeşitli büyüme faktörleri salgılamaktadır. Trombositten zengin fibrin (TZF) içinde yoğun olarak bulunan plateletlerin α granülleri; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I), trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü (PDEGF), trombosit kaynaklı anjiyogenezis faktörü (PDAF) ve trombosit faktör 4 (PF-4) gibi birçok büyüme faktörü bulundurur (4-6). TZF matriksi içerisinde aynı zamanda lökositler tarafından salgılanıp inflamasyon kontrolünde görev alan sitokinler de bulunmaktadır. Matriks içindeki sitokinlerin remodeling aşamasında yavaş salınım yaparak uzun dönemde etkili oldukları bildirilmektedir. TZF'nin osteojenik hücrelerin proliferasyonunu artırarak kemik formasyonu ve rejenerasyonu üzerinde güçlü bir stimülatör olabileceği düşünülmektedir (7-11).

TZF kanamanın azaltılmasına, yumuşak ve sert doku iyileşmesinin hızlandırılmasına yardımcı olur. Büyüme faktörleri sayesinde vaskülarizasyonun hızlandırılması,

Geliş Tarihi : 08.04.2015
Kabul Tarihi : 16.04.2015

Yazışma Adresi Correspondence

Ali Said DURMUŞ
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Cerrahi Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

asdurmus@firat.edu.tr

* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Yönetim Birimi tarafından desteklenen (Proje No: 2078) doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.

hastanın kendisinden alındığında allerjik reaksiyonlara sebep olmaması, kısa sürede ve kolayca hazırlanması, hastalık transfer riskinin bulunmaması, içindeki lökosit ve bunlar tarafından salgılanan sitokinler sayesinde enflamasyonun kontrol edilmesi ve enfeksiyonu baskılaması gibi birçok avantajı vardır (7-13).

Bu çalışmada, tavşanlarda deneysel oluşturulan tibia defektlerinde TZF uygulamasının kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

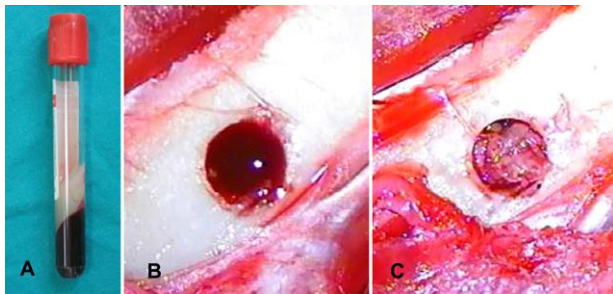
Gereç ve Yöntem

Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanan (Tarih: 09.06.2010, Karar No: 59) bu çalışmada 12 adet 5-6 aylık erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Standart tavşan yemi ile beslenen tavşanlar 30 ve 60 günlük postoperatif takiplerini yapmak üzere rastgele iki eşit gruba ayrıldı.

Operasyon öncesi tavşanlardan 8 mL kan alınıp antikoagülan içermeyen steril cam tüpte 400 g'de 10 dk sanrifüje edilerek altta kırmızı kan hücrelerini içeren tabaka, ortada TZF ve üstte de hücre içermeyen plazma olmak üzere üç tabaka oluşması sağlandı (Şekil 1A). Trombositlerin yoğun olarak bulunduğu TZF tabakası steril bir petri kabına alındı.

Anestezi 5 mg/kg dozunda Xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer, 23.32mg/mL) kas içi enjekte edildikten 10 dakika sonra, 35 mg/kg kas içi Ketamin hydroclorur (Ketalar, Parke-Davis, 50 mg/mL) uygulanarak sağlandı.

Operasyon bölgelerinin tıraşı ve %10'luk povidon iodine ile dezenfeksiyonunun ardından sağ ve sol tibianın proksimal medial yüzleri üzerinde subkutan fascia deri ile aynı hat üzerinde ensize edilerek tibia'ya ulaşıldı. Periost ensize ve ekarte edildikten sonra, 3.5 mm çapında bir drill yardımıyla oluşturulan 24 adet unikortikal kemik defektinin 12'si boş bırakılırken (kontrol grubu) (Şekil 1B), diğer 12'si TZF ile dolduruldu (Şekil 1C). Her bir tavşanda hem kontrol hem de TZF grubunun bulunması sağlandı. Rutin cerrahi kurallara uygun olarak kapatılan operasyon yaraları bir pansuman ile örtülerek tavşanlara günde bir kez 400.000 IU prokain penisilin 5 gün süre ile uygulandı.



Şekil 1. A. Trombositten zengin fibrin (TZF), B. Boş bırakılan kemik defekti (Kontrol), C. TZF uygulanmış kemik defekti.

Radyolojik Muayeneler: Operasyon sonrası ve her 15 günde bir medio-lateral olarak alınan radyografiler modifiye Lane ve Sandhu radyolojik skorlama kriterlerine (14) göre değerlendirildi (Tablo 1).

Tablo 1. Modifiye Lane ve Sandhu radyolojik skorlama kriterleri (14)

Defektteki Yeni Kemik Oluşumu (%)	Skor
Yok	0
25	1
50	2
75	3
100	4

Histopatolojik Muayeneler: Otuz ve 60 günlük izleme süreleri sonunda altışar adet tavşan ötenazi edilip alınan tibiaların makroskopik muayeneleri gerçekleştirildi. Histopatolojik muayeneler için greft bölgelerini içeren kemik örnekleri %10'luk formalin solüsyonuna konularak tespit edildi. Kemik örnekleri dekalsifiye edilip rutin işlemlerden geçirildikten sonra Hematoksilin-eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

İstatistiksel Değerlendirme: SPSS (22.0 versiyonu) kullanıldı. Veriler \pm SEM değeri olarak sunuldu. $P < 0.05$ değeri önemli olarak kabul edildi. Kontrol ve TZF grupları arasındaki karşılaştırmalar non-parametrik Wilcoxon testi ile, 30 ve 60. gündeki kontrol grupları ve TZF gruplarının kendi içerisinde karşılaştırmaları ise non-parametrik Mann-Whitney-U testi ile yapıldı.

Bulgular

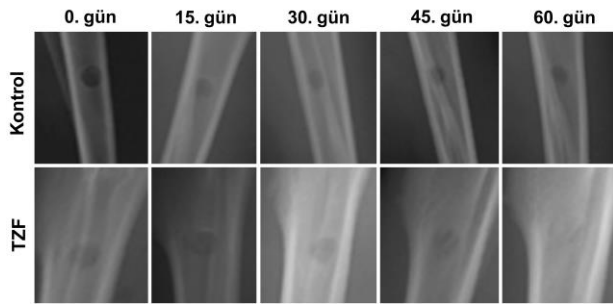
Pihti kıvamında olan TZF'nin bu şeklini koruduğu, defekt bölgesine uygulamasının kolay olduğu, hemostazı sağladığı ve iyi tespit olduğu görüldü.

Radyolojik Bulgular: Operasyondan hemen sonra alınan radyografilerde, defektler kontrol grubunda net olarak, TZF grubunda ise medullar kanaldaki gibi azalan radyolüsent bir kontrastta gözlemlendi. On beşinci günde belirgin değişim görülmezken özellikle TZF uygulanan grupta defekt kenarlarındaki keskin görüntünün azaldığı ve yeni kemik oluşumunun başladığı belirlendi.

Postoperatif 30. günde defektlerdeki yeni kemik oluşumunun kontrol grubunda %25'ten az, TZF grubunda ise yaklaşık %75 olduğu gözlemlendi. Kırk beşinci günde de benzer bulgular gözlenmekle birlikte kemik iyileşmesinin belli oranda artarak devam ettiği gözlemlendi.

Altmışıncı gündeki radyografilerde yeni kemik oluşumunun kontrol grubunda %25-50 arasında olduğu gözlenirken, TZF grubunda beş defekte %100, bir defekte de %75'ten fazla yeni kemik oluşumu ile dolarak radyodens bir kontrastta ulaştığı belirlendi.

Olgulara ait radyografik görüntüler Şekil 2'de, radyolojik değerlendirmeler ise Tablo 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Defekt bölgelerinin radyografik görüntüleri.

Tablo 2. Modifiye Lane ve Sandhu skorlama kriterlerine (14) göre defektlerin radyolojik değerlendirmeleri

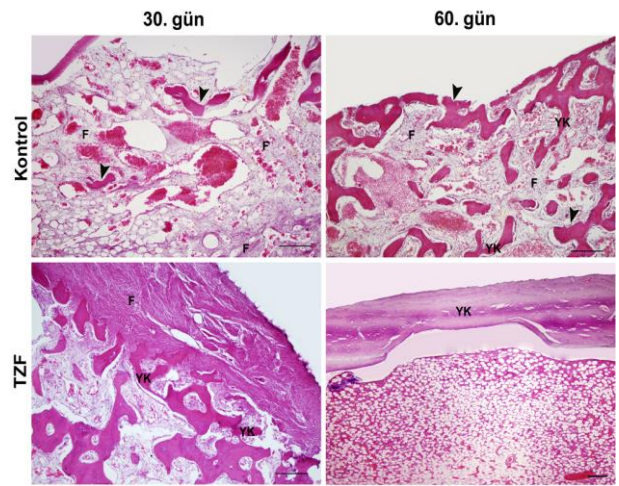
Gün	n	Kontrol	TZF	P
30. gün	6	0.33±0.21	2.67±0.21	<0.05
60. gün	6	1.50±0.22	3.83±0.17	<0.05
P		P<0.05	P<0.01	

Makroskobik Bulgular: Otuzuncu günde kontrol grubunda altı defektten dördünün kapanmadığı, birinde hafif bir küçülme olduğu, diğerinin yarıdan azının kapandığı belirlenirken, TZF grubunda tüm defektlerin yeni kemik oluşumu ile doldurulduğu gözlemlendi.

Altmışıncı günde kontrol grubunda üç defektin kapanmadığı, ikisinde küçülme olduğu, diğerinin yarısından azının kapandığı görülürken, TZF grubundaki tüm defektlerin yeni kemik oluşumu ile doldurulduğu belirlendi.

Histopatolojik Bulgular: Otuzuncu günde, kontrol grubunda kapillar damardan zengin granülasyon dokusu ve çok az kıkırdak doku gelişimi gözlenirken, TZF grubunda defektin kollajenden zengin fibröz kallus ile tamamen doldurulduğu belirlendi. Fibröz dokuda kıkırdak doku oluşumu ve osteoblastik aktivitenin belirgin olduğu, spiküler şeklindeki primer kemik alanlarının birleşerek trabeküler yapıya dönüşmeye başladığı ve kemik iliği oluşumlarının başladığı dikkati çekti.

Altmışıncı günde, kontrol grubunda kapillar damarlardan zengin fibröz kallus içerisinde zayıf kıkırdak ve spiküler şekilde primer kemik doku oluşumları belirlendi. TZF grubunda defektlerin kompakt kemikten daha ince primer ve sekonder kemik oluşumları ile tam olarak kapandığı, havers kanallarının belirgin şekilde yapılandığı gözlemlendi. Fibröz ve kıkırdak doku oluşumlarına rastlanmazken, kemik iliği tarafında osteoblastik aktivitenin devam ettiği saptandı. Histopatolojik görüntüler Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Defekt bölgelerinin 30 ve 60. günlerdeki histopatolojik görüntüleri. F: Fibröz doku, Ok başları: Kıkırdak doku, YK: Yeni kemik, H-E Bar=200µ.

Tartışma

Hormonlar ve büyüme faktörlerinin kemik gelişiminde, özellikle proliferasyon, diferansiyasyon, kemotaksis ve morfogenez gibi hücresel olayların düzenlenmesinde önemli rolleri bulunmaktadır (15).

Yapısında birçok büyüme faktörü bulunan TZF'nin yara iyileşmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (4-6,8). Platelet aktivasyonundan yaklaşık 10 dakika sonra, α granüllerindeki büyüme faktörlerinin salgılandığı, yaklaşık 1 saat içinde de, %95'inin yara bölgesine iletilerek iyileşme sürecinin başladığı bildirilmektedir (7-11). Bu faktörlerden PDGF'nin yara bölgesindeki hücre proliferasyonu, vaskülarizasyon ve yeniden yapılanmayı hızlandırdığı bildirilmektedir (16-18). Choukroun ve ark. (4) TZF'nin yumuşak ve sert dokularda hemostaz ve yara iyileşmesinde önemli avantajları olduğunu belirtmişlerdir. TZF'nin yapısındaki interlökinlerin defekt ve çevresinde yangıyı baskılamasının yara iyileşmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (5, 6).

Plazma ve fibrin yapıştırıcılara göre daha doğal ve etkili olduğu belirtilen TZF'nin osteogenezi uyarma yeteneğinin araştırılabileceği ve kaynak oluşturacağı düşünülerek bu çalışmanın yapılması planlanmıştır.

TZF elde edilecek kanın 10 dk 400 g'de, düşük hızda santrifüjü ile oluşan ve doğal fibrin ağına çok benzeyen fibrin ağı içindeki yoğun olarak bulunan trombositlerin ortama aktardığı sitokinlerin yara bölgesinde sürekli olarak doku uyarımını sağladığı ve yara iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir (7-11).

Bu çalışmada, TZF hazırlanırken alınan 8 mL kan 400 g'de 10 dk santrifüje edilerek trombositten zengin fibrin hazırlandı. Düşük hızda gerçekleştirilen santrifüj işlemi ile elde edilen TZF'nin doğal fibrin ağına benzemesi amaçlandı.

Histopatolojik değerlendirmelerde kemikleşmenin 1.-2. haftalarda başladığı, 6.-8. haftalarda defektlerin reorganize olarak dolduğu bildirilmektedir (2, 3, 11). Yapılan bu çalışmada TZF'nin kemik iyileşmesindeki etkinliğinin histopatolojik olarak araştırılması amacı ile dönemler 30 ve 60. günler olarak belirlenmiştir.

Kemik defektlerindeki iyileşmenin büyük oranda defektin büyüklüğüne bağlı olduğu, greftin osteojenik potansiyelinin tam olarak değerlendirilmesi için defektin, spontan iyileşmeye engel olacak kadar büyük olmasının önemi belirtilmiştir (19, 20). Bu özelliklere sahip deneysel kemik defekti kritik boyut defekti (KBD) olarak adlandırılmış ve osteojenik materyallerin değerlendirilmesinde standart bir model olarak Hollinger ve Kleinschmidt (20) tarafından önerilmiştir. KBD, türlere ve ilgili bölgeye göre farklı olmak üzere hayat boyunca spontan olarak iyileşemeyecek en küçük intraosseöz yara olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte pek çok çalışmada sürenin sınırlı olması ve deneylerin hayvanın tüm hayatı boyunca sürdürülmemesinden dolayı hayvan araştırmalarında KBD'nin deneme süresi boyunca iyileşemeyen defektleri ifade ettiği bildirilmiştir (19-21).

Tavşanlarda yapılan çalışmalarda 0.5-8 mm gibi çok çeşitli defekt büyüklükleri uygulandığı bildirilmekle beraber diyafiz genişliğini aşan defektlerde özellikle 4 mm ve daha geniş olanlarda kırık oluştuğu bildirilmiştir (20). Tavşanlardaki tibia diyafiz genişliği dikkate alınarak 3.5 mm'lik bir defektin bu çalışma için uygun olacağı ve 2

aylık erken dönem kemik iyileşmesi için KBD olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmada, TZF uygulanan kemik defektlerindeki kallus oluşumunun zamanla artması ve radyografik muayenelerde kemik defektlerinin büyük oranda yeni oluşan kemik dokusu ile doldurulmasının gözlenmesi TZF'nin kemik iyileşmesini stimüle edici özelliğini göstermektedir.

Kemik iyileşmesinin incelenmesinde hücresel düzeydeki değişimlerin izlenebilmesi için histolojik kontrollerin de yapılması gereklidir (11, 21). Bu çalışmanın histopatolojik incelemelerinde kontrol grubunda 30. günde sadece granülasyon dokusu izlenmesi ve 60. günde fibröz kallus içinde çok az kemik izine rastlanması ve defektlerin hiç birinin tam olarak kapanmaması Hollinger ve Kleinschmidt (20)'in bildirdikleri ile uyumlu olup, yeni kemik oluşumunu artırmak için kemik grefti uygulamasının gerekliliğini göstermiştir. Otuz ve 60. günlerde TZF grubundaki yeni kemik oluşumunun kontrol grubuna göre daha iyi olması TZF'nin kemik doku oluşumu üzerine olumlu etkisini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen radyografik ve histopatolojik bulgular ekstremitelerde kemiklerindeki defektlerde TZF'nin iyi bir greft materyali olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Teşekkür

Histopatolojik muayenelerinin gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Doç.Dr. Ali Osman ÇERİBAŞI'na teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Durmuş AS, Akpolat N, Ünsaldı E. Effect of dl-alpha-tocopherol acetate on the fracture healing of experimental radial diaphysis fracture in dogs. FÜ Sağlık Bilimleri Dergisi 2008; 22: 141-145.
2. Durmuş AS, Eröksüz H. Subkondral defektlerde otojen spongiyöz kemik grefti ve koral implant uygulamalarının karşılaştırılması: Köpek diz eklemine deneysel çalışma. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları Dergisi 2008; 6: 72-77.
3. Durmuş AS, Ünsaldı E. Köpeklerde deneysel maddi kayıplı femur kırıklarında otojen fibular kemik grefti kullanımı. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları Dergisi 2004; 2: 144-150.
4. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: e56-60.
5. Shah M, Deshpande N, Bharwani A, et al. Effectiveness of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: A systematic review and meta-analysis. Journal of Indian Society of Periodontology 2014; 18: 698-704.
6. Shah M, Patel J, Dave D, Shah S. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin with demineralized freeze-dried bone allograft in periodontal infrabony defects: A randomized controlled clinical study. Journal of Indian Society of Periodontology 2015; 19: 56-60.
7. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 45-50.
8. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 51-55.
9. Dohan SL, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 56-60.
10. Dohan, DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 37-44.
11. Yılmaz D. Domuzlarda Oluşturulan Kemik Defektlerinde Trombositten Zengin Fibrin İle Trikalسيوم Fosfatın Yara

- İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara: GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, 2009.
12. Dohan DM, Rasmusson L, Albrektsson. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology* 2009; 27: 158-167.
 13. Kobayashi M, Kawase T, Horimizu M, et al. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals* 2012; 40: 323-329.
 14. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987; 18: 213-225.
 15. Ozaki A. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats. Interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 2000; 5: 64-70.
 16. Mathur A, Bains VK, Gupta V, Jhingran R, Singh GP. Evaluation of intrabony defects treated with platelet-rich fibrin or autogenous bone graft: A comparative analysis. *Eur J Dent* 2015; 9: 100-108.
 17. Panda S, Jayakumar ND, Sankari M, Varghese SS, Kumar DS. Platelet rich fibrin and xenograft in treatment of intrabony defect. *Contemp Clin Dent* 2014; 5: 550-554.
 18. Saravanakumar B, Julius A, Sarumathi T, Aarthinisha V, Manisundar N. Therapeutic effects and concepts in the use of platelet-rich fibrin (PRF) on alveolar bone repair - A literature review. *Middle East Journal of Scientific Research* 2014; 19: 669-673.
 19. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1294.
 20. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990; 1: 60-68.
 21. Kim SG, Chung CH, Kim YK. Use of particulate dentinplaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 86-94.