

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**PAI – 1 4G/5G GEN POLİMORFİZMİ İLE NON-TRAVMATİK
LUNATUM AVASKÜLER NEKROZU ARASINDAKİ İLİŞKİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. METİN GÖNEN

DANIŞMAN
PROF.DR. FAHİR DEMİRKAN

DENİZLİ – 2016

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**PAI – 1 4G/5G GEN POLİMORFİZMİ İLE NON-TRAVMATİK
LUNATUM AVASKÜLER NEKROZU ARASINDAKİ İLİŞKİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. METİN GÖNEN

DANIŞMAN
PROF.DR. FAHİR DEMİRKAN

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 27/04/2016 tarih ve 2016TIPF008 nolu kararı ile desteklenmiştir.

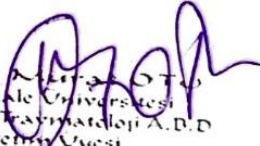
DENİZLİ, MAYIS – 2016

Prof. Dr. Fahir Demirkan danışmanlığında Dr. Metin GÖNEN tarafından yapılan "PAİ - 1 4g/5g Gen Polimorfizmi ile Non-Travmatik Lunatum Avasküler Nekrozu Arasındaki İlişki" başlıklı tez çalışması 24.12.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

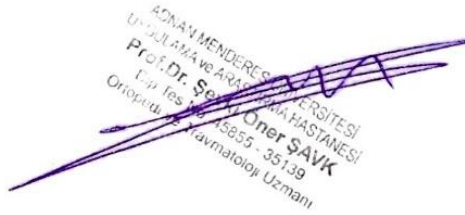
BAŞKAN


Prof. Dr. A. Fahir DEMIRKAN
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ortopedi Öğretim Üyesi
Diploma Tescil No: 49957 Uzman No: 36366

ÜYE

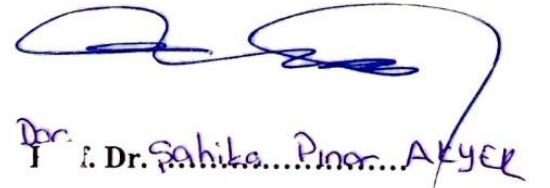

Doc. Dr. Mustafa ÖTO
Pamukkale Üniversitesi
Ortopedi ve Travmatoloji A.B.D.
Öğretim Üyesi
Diploma No: 0501178
Diploma Tescil No: 80007

ÜYE


ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
UNUÇULAMA VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
Prof. Dr. Şenol Öner ŞAVK
Etiler Teş. No: 48855 - 35139
Ortopedi ve Travmatoloji Uzmanı

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

26.09.2016


Dr. Şahika Pınar AKYER

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı 4

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında bilgi ve önerileriyle desteğini esirgemeyen, deneyimlerini hoşgörü ve anlayış içerisinde paylaştan Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Fahir Demirkan'a; tez çalışmam sırasında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Ali Çağdaş Yörükoğlu' na; asistanlığım boyunca bilgi ve deneyimleri ile mesleki alanda ilerlememi sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Esat Kıter, Doç. Dr. Murat Oto, Doç. Dr. Semih Akkaya, Yrd. Doç. Dr. Alp Akman, Yrd. Doç. Dr. Harun Reşit Güngör, Yrd. Doç. Dr. Nusret Ök' e; tez ile ilgili deneysel aşamalarda gerekli olan materyallerin sağlanmasında ve laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı Tıbbi Genetik Anabilim Dalında hocamız Doç. Dr. Emre Tepeli' ye; istatistik analizlerde yardımcı olan Hande Şenol' a; asistanlığım boyunca aynı ortamı paylaştığım, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve her konuda desteklerinden dolayı değerli çalışma arkadaşlarım ve dostlarıma; hayatım boyunca varlıkları ile bana güç veren, attığım her adımda bana destek olan annem, kız kardeşlerim ve bu günlere gelmemde büyük emeği olan rahmetli babama; hayatımı güzelleştiren ve kolaylaştıran en büyük desteğim sevgili eşime ve varlığıyla huzur veren canım kızım Masal'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER ve KISALTMALAR	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	X
ÖZET	XI
İNGİLİZCE ÖZET	XIII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
ANATOMİ.....	3
Lunatum Varyasyonları	5
Biyomekanik	5
Lunatum Histolojisi	6
Lunatum Vasküleritesi	7
Lunatumun' un İnternal Vasküler Ağı	8
LUNATUM AVASKÜLER NEKROZU (KEİNBÖCK HASTALIĞI)	9
Tanım ve Tarihçe	9
Etiyoloji ve Risk Faktörleri	10
Klinik	11

Görüntüleme.....	11
<i>Ulnar Varyans.....</i>	<i>12</i>
<i>Radial İnklinasyon.....</i>	<i>12</i>
Tedavi	13
<i>Radial Kısaltma Osteotomisi:.....</i>	<i>13</i>
<i>Kapitatum Kısaltma Osteotomisi:.....</i>	<i>13</i>
<i>Vasküler Kemik Flepleri</i>	<i>14</i>
<i>Proksimal Sıra Karpektomisi</i>	<i>14</i>
<i>Total El Bilek Artrodezi</i>	<i>15</i>
FİBRİNOLİTİK SİSTEM	16
Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 (PAI-1).....	17
Arteriyel ve Venöz Tromboembolizmde PAI-1' in Rolü	18
Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 (PAI-1) Gen Polimorfizmi	19
SNP (Single Nükleotid Polimorfizm)	20
HASTALAR VE YÖNTEM	22
HASTALAR	22
YÖNTEM.....	23
Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	23
DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi	23
PAI-1 Geni 4G/5G Polimorfizminin Allel Spesifik PCR ile İncelenmesi	24
PAI-1 Geni 4G/5G Polimorfizminin Dizi Analizi Yöntemi ile İncelenmesi	25

İstatistiksel Analiz	29
BULGULAR	30
Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Özellikleri	30
PAI-1 Geni Allel Spesifik PCR Analizi Sonuçları.....	35
PAI-1 Geni Dizi Analizi Sonuçları.....	36
TARTIŞMA.....	41
SONUÇLAR.....	46
KAYNAKLAR.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR

Arg: Arginin

AVN: Avasküler Nekroz

DVT: Derin Ven Trombozu

ECM: Ekstraselüler Matriks

ESWT:Ekstrakorporeal Şok Dalga Tedavisi

kDa: Kilodalton

Met: Metionin

MI: Miyokard İnfartüs

MMP: Matriks Metalloproteinaz

OR: Odds Ratio

PAİ: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PHT: Pulmoner Hipertansiyon

PTE: Pulmoner Tromboembolizm

SDS:Sodyum Dodesil Sülfat

SNP: Single Nükleotid Polimorfizm

STT: Skafotrapeziotrapezoid

TFKK: Triangüler Fibrokaltılaj Kompleks

t-PA: Doku Plazminojen Aktivatörü

ŞEKİLLERDİZİNİ

SAYFA

Şekil 1 Karpal kemikler, volar görünüm, sağ	3
Şekil 2 El bileğinin volar(A) ve dorsal(B) ligamanları	4
Şekil 3 Morfolojik varyasyonlar.....	5
Şekil 4 Lunatumun trabeküler yapısı	6
Şekil 5 El bileği çevresindeki arteryel damar ağı; volar görünüm	7
Şekil 6 Lunatumun interosseoz vasküler varyasyonları	8
Şekil 7 Lunatum vasküler ağını gösteren spaltheoz preparatı.....	8
Şekil 8 Karpal yükseklik ölçümü	11
Şekil 9 Lichtman radyolojik evrelemesi, el bilek AP grafileleri.....	12
Şekil 10 Vasküler pediküllü kemik flepleri için donör sahaları.....	14
Şekil 11 Koagülasyon ve Fibrinolizis Yolağı	16
Şekil 12 4G/4G homozigot genotipin osteonekroz mekanizması	19
Şekil 13 PAI-1 4G5G allel spesifik PCR ürünlerinin %2 agaroz jel görüntüleri.....	35
Şekil 14 PAI-1 geni promotor bölgesine ait hedef dizi, kullanılan primerler (mavi alan) ve polimorfik bölge (sarı alan)	36
Şekil 15 PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmini içeren bölgeye ait PCR ürününün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	36
Şekil 16 PAI-1 geni 5G5G genotipini gösteren dizi analizi sonucu (forward dizi) ...	37
Şekil 17 PAI-1 geni 4G4G genotipini gösteren dizi analizi sonucu (forward dizi) ...	37
Şekil 18 PAI-1 geni 4G5G genotipini gösteren dizi analizi sonucu (forward dizi) ...	37
Şekil 19 Genotip dağılım grafisi	39

TABLOLARDIZINI

SAYFA

Tablo 1 Stahl (1947) radyolojik evreleme	9
Tablo 2 Litchman (1977) evrelemesi	10
Tablo 3 İlgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri.....	24
Tablo 4 Tek bir örnekte 4G alleli için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği	24
Tablo 5 Tek bir örnekte 5G alleli için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği	25
Tablo 6 İlgili gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri.....	25
Tablo 7 Tek bir örnek için hazırlanan polimeraz zincir reaksiyonu karışım içeriği ..	26
Tablo 8 Polimeraz zincir reaksiyonu için Thermal Cycler cihazında uygulanan basamaklar.....	26
Tablo 9 Dizileme reaksiyonunda kullanılan bileşenler	27
Tablo 10 Dizileme reaksiyonu için Thermal Cycler cihazında uygulanan basamaklar	28
Tablo 11 Grupların demografik özellikleri.....	30
Tablo 12 Cerrahi gruplara göre postoperatif klinik sonuçlar.....	31
Tablo 13 Postoperatif kas gücünün cerrahi yöntemlere göre değişimi	32
Tablo 14 Cerrahiden sonra geçen süre ile Mayo skoru arasındaki ilişki.....	32
Tablo 15 Hasta grubu spektrofotometri ölçümleri.....	33
Tablo 16 Kontrol grubu spektrofotometri ölçümleri.....	34
Tablo 17 Hasta ve kontrol grubunun genotip özellikleri.....	38
Tablo 18 Olgu ve kontrol gruplarının genotip dağılımı	39
Tablo 19 Genotip analizi (4G4G+4G5G ile 5G5G arasında).....	40

ÖZET

PAI – 1 4G/5G gen polimorfizmi ile non-travmatik

lunatum avasküler nekrozu arasındaki ilişki

Dr. Metin GÖNEN

Lunatum avasküler nekrozu (Keinböck Hastalığı), lunat kemikte subkondral nekroz, karpal kemiklerde çökme ve el bileği ekleminde dejeneratif artrit ile sonuçlanan bir hastalıktır. 1910 yılında Robert Keinböck tarafından tarif edilmesinden bu yana hastalığın etiyojisi halen aydınlatılmış değildir. Negatif ulnar varyans gibi biyomekanik nedenler, bazı damarsal ve travmatik nedenler suçlanmakla beraber genel kanı; interosseöz kan akımındaki zayıflama olarak ortaya konmuştur. 7. kromozomda (7q21.3-22) bulunan PAI-1 geni; 12,3 kilobazdan oluşur ve 9 ekson ve 8 intron bölgesi içerir. 4G/5G polimorfizmi tek guanin nükleotidinin delesyon veya insersiyon varyasyonudur. 5. Guaninin insersionu veya delesyonuna göre polimorfizm genotipi belirlenir. PAI-1 genine ait üç çeşit genotip bulunmaktadır; 4G4G, 4G5G ve 5G5G. Yüksek PAI-1 aktivitesi her zaman 4G4G genotipte 4G5G ve 5G5G genotipe göre daha fazladır. PAI-1 koagülasyonun düzenlenmesi ve fibrinolitik sistem için kritik rol oynar. Azalmış plazma fibrin yıkımı aktivitesi, yüksek PAI-1 plazma düzeyleri ile ilişkilidir. Literatürde PAI-1 4G/5G polimorfizmi; tekrarlayan gebelik kayıpları, miyokard enfarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, femur başı avasküler nekrozu gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiş ve sorumlu tutulmuştur. Bu çalışmada, non-travmatik lunatum avasküler nekrozuna PAI-1 4G/5G polimorfizminin etkisini belirlemek hedeflendi. Bu amaçla kırkbeş lunatum avasküler nekrozlu hasta ve kontrol grubu olarak benzer demografik özelliklere sahip kırkbeş sağlıklı birey dahil edildi. Hasta ve kontrol gruplarında allel spesifik PCR ve dizi analizi yöntemi ile PAI-1 4G/5G polimorfizminin dağılımını belirlemek amacıyla periferik kan örneklerinden genomik DNA izole edildi. Hasta grubunda, sekiz (17,8%) 4G4G, yirmialtı (57,8%) 4G5G, onbir (24,4%) 5G5G PAI-1 genotip; kontrol grubunda ise beş (11,1%) 4G4G, yirmibir (46,7%) 4G5G ve ondokuz (42,2%) 5G5G PAI-1 genotip tespit edildi. Hasta ve kontrol grupları arasında polimorfizm dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

($p=0,187$). Bununla birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen 4G alleleline sahip olan kişilerde Keimböck hastalığı görülme riski 5G alleleline sahip olan kişilere göre 2,26 kat daha fazla olduğu sonucuna varıldı (OR=2,259; %95CI [0,917 - 5,562]; $p=0,076$). Sonuç olarak; 4G homozigot genotipi hasta grubunda 1,6 kat daha yüksek tespit edildi ancak Keimböck hastalığı ile PAI-1 4G/5G polimorfizmi arasında istatistiksel ilişki saptanmadı. Geniş gruplar ile yapılacak çalışmalar polimorfizm ilişkisi daha net aydınlatılabilir.

Anahtar Kelimeler: PAI-1 4G/5G, Keimböck hastalığı, Polimorfizm, Lunatum, Osteonekroz

SUMMARY

Association between PAI-1 4G/5G polymorphisms and non-traumatic avascular necrosis of lunatum

Dr. Metin GÖNEN

Osteonecrosis of the lunate bone (Kienböck's Disease) is an ischemic injury that results in necrosis of the subchondral bone, collapse of the carpal bones, and degeneration of the wrist. Since described by Robert Kienböck in 1910, the etiology of Kienböck's disease is still unknown. Some biomechanical problems such as negative ulnar variance, vascular and traumatic causes hold responsible although common opinion is reduced blood supply. The PAI-1 gene, located on 7q21.3–22, spans 12.3 kb and contains nine exons and eight introns. The 4G/5G polymorphism is characterized by a single guanosine nucleotide insertion/deletion variation. The fifth guanine (G base) is inserted or deleted in the 4 G sequence in the – 675th base of the transcription initial point upstream. The PAI-1 gene has three genotypes: 4G4G, 4G5G, and 5G5G. Higher plasma PAI-1 activity is always associated with 4G4G carriers than with 4G5G and 5G5G carriers. PAI-1 is a critical factor that regulates coagulation and fibrinolytic systems. Reduced plasma fibrinolytic activity, related with increased levels of PAI-1. PAI-1 4G/5G polymorphism related and responsible for recurrent miscarriage, myocardial infarction, cerebrovascular diseases and femoral head avascular necrosis in literature. In this study, we aimed to detect the role of PAI-1 4G/5G polymorphism in non-traumatic avascular necrosis of lunate. For this purpose include forty-five lunate avascular necrosis patients and forty-five healthy controls with similarities. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples to determine the distributions of PAI-1 4G/5G polymorphism by allele specific PCR and sequencing in patient and control groups. We identified eight (17,8%) 4G4G, twenty-six (57,8%) 4G5G, eleven (24,4%) 5G5G PAI-1 genotype carriers in patients and five (11,1%) 4G4G, twenty-one (46,7%) 4G5G and nineteen (42,2%) 5G5G PAI-1 genotype carriers in healthy subjects. There is no statistically significant difference for distributions of the gene polymorphism

between patients and control groups ($p=0,187$). Furthermore, 4G allele increased risk 2.26 fold than 5G allele in Keinböck's disease with no statistical differences ($OR=2,259$; $95\%CI [0,917 - 5,562]$; $p=0,076$). As a conclusion; it has been identified increased 1,6 fold 4G homozygote genotype in patient group. Although no statistical associations were documented for PAI-1 4G/5G polymorphism in Keinböck's disease, large-scale studies should be designed to clearly identify these associations in our population.

Keywords: PAI-1 4G/5G, Keinböck's disease, Polymorphism, Lunatum, Osteonecrosis

GİRİŞ

Lunatum avasküler nekrozu (Keinböck Hastalığı); ilk olarak 1843 yılında Petse tarafından kadavralarda gösterilmiş olup, 1910 yılında Robert Keinböck tarafından radyolojik özellikleri ile tanımlanan, lunat kemikte subkondral iskemik hasar ve kemiğin kollabe olması sonucu el bileğinde dejenerasyonla sonuçlanan bir durumdur. Yüz yıldan uzun bir süredir varlığı bilinmesine karşın oluş sebebi tam olarak aydınlatılmış değildir(1). Bununla birlikte tanımlanmış çeşitli tedavi yöntemlerine rağmen, yeterli uzun dönem karşılaştırmalı çalışmalar olmaması nedeniyle tanı ve tedavi sürecinde hem hasta hem de hekim açısından ciddi zorluklarla karşılaşmaktadır(2).

Lunat AVN etiyolojisinde mekanik, vasküler ve travmatik nedenler suçlanmakla beraber genel kanı; interosseöz kan akımındaki zayıflama olarak ortaya konmuştur. Travma dışı etiyolojik nedenlere bakıldığında, bölgesel vasküler ve anatomik nedenler ön planda düşünülmüştür. Kemik içi bölgesel kan dolaşımında meydana gelen aksamanın, lunatum gibi vasküleritesi zayıf kemiklerde osteonekroz ile sonuçlanması ihtimalinin diğer kemiklere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir(3, 4). Lunatumun besleyici damarları eklem olmayan kemik yüzlerinden gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda %7-23 arası lunatumda tek volar arteriyel besleyici damar varlığı tanımlanmıştır. Tek bir besleyici arter ve kısıtlı damar ağı varlığında akut ya da kronik travma etkisiyle osteonekroza yatkınlık oluşabileceği düşünülmektedir.

Travma dışı nedenlerle meydana gelen mikrovasküler tıkanıklığa yol açan çeşitli pıhtılaşma bozuklukları ve bu faktörlerle ilişki gen polimorfizimleri ortaya konulmuş ve bu polimorfizimlerin neden olması muhtemel nutrisyonel aksamanın kemikte osteonekroza neden olduğunu destekleyen çalışmalar mevcut(5).

Polimorfizm DNA diziliminde popülasyonda %1'den daha fazla oranda bulunan baz değişimleri olarak tanımlanır. Tek nükleotid polimorfizimleri SNP (Single nucleotide polymorphism) olarak adlandırılır. SNP'lerin bazı hastalıklarla birlikteliği bu hastalığa olan eğilimi göstermesi açısından önem taşımaktadır.

Kalça eklemünde artroz ile sonuçlanan femur başı avasküler nekrozunun etiyolojisine yönelik yapılan çalışmalar arasında; koagülasyon basamaklarında rol alan pek çok farklı enzim gen düzeyinde incelenmiş ve kimi hastalarda söz konusu

enzimlerin bazılarında polimorfizme rastlanmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda Plazminojen Aktivatör İnhibitörü 1 (PAI-1) 4G/5G gen polimorfizminin femur başı avasküler nekrozu açısından risk unsuru olduğu gösterilmiş (6).

PAI-1; fibrinolizisde görevli esas enzim olan plazmin' in, prekürsörü olan plazminojen' den dönüşümünü inhibe eden enzimdir. Plazminojenin plazmine dönüşümü t-PA ile katalize edilir ve PAI-1 ile inhibe edilir. PAI-1 enziminin hatalı veya eksik çalışması sonucu pıhtıyı eritmekle görevli plazmin üretilemez ve damar içi pıhtılaşma sorunları ile karşılaşma olasılığı artar. 4G homozigotluğu sonucu enzim konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak fibrinolitik aktivite bozulur ve trombotik olaylara yatkınlık artar.

PAI-1 enzimi, daha önce tekrarlayan gebelik kayıpları, miyokard enfarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, femur başı avasküler nekrozu gibi hastalıkların etiyolojik araştırmalarına konu olmuştur.

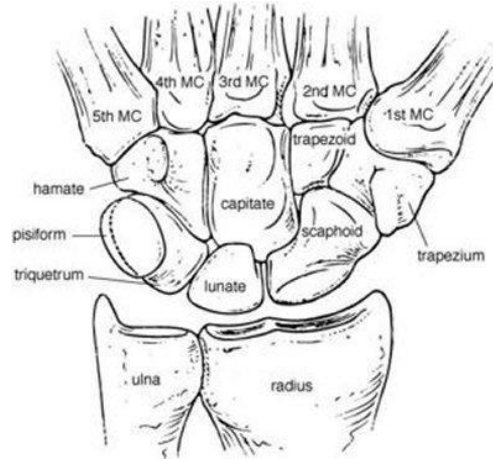
Ancak günümüze kadar ülkemizde ve dünyada lunatum avasküler nekrozu etiyolojisinde yönelik gen düzeyinde yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu araştırma ile non-travmatik lunatum avasküler nekrozu olan hastalarda; PAI-14G/5G genindeki polimorfizmin etiyolojideki rolü aydınlatılmaya çalışılacaktır.

GENEL BİLGİLER

ANATOMİ

Elin proksimal kısmı olan el bileği, el ve önkol bileşkesini oluşturur. Pronator quadratus kasının proksimalinden karpometakarpal ekleme kadar olan kısım, el bileği ekleminin sınırlarıdır. El bileği iskeleti, proksimalde ve distalde dörder adet olmak üzere, iki sıra üzerine dizilmiş sekiz adet karpal kemikten oluşur. Proksimal sırada anatomik pozisyonda dıştan içe doğru os scaphoideum, os lunatum, os triquetrum ve os pisiforme bulunur. Distal sırada ise os trapezium, os trapezoideum, os scapitatum ve os hamatum bulunur. Os pisiforme hariç, hepsinin genellikle altı yüzü vardır. Volar ve dorsalyüzlerine bağlar tutunduğu için pürtüklüdür. Os scaphoideum ve os lunatum dışındakilerinin dorsalyüzleri volar yüzlerine oranla daha geniştir. Proksimal ve distal yüzleri komşu kemiklerle eklem yaptığı için buralarda eklem yüzü bulunur. Genellikle proksimal yüzleri konveks, distal yüzleri ise konkavdır(7).



Şekil 1: Karpal kemikler, volar görünüm, sağ

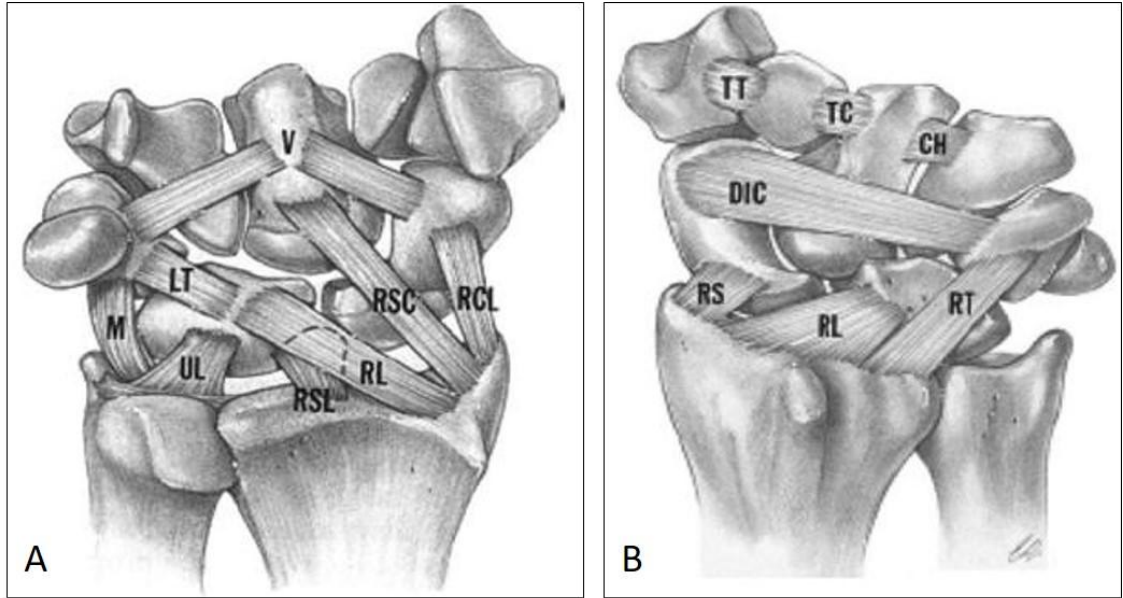
Os Lunatum; el bileği kemikleri arasında proksimal sıranın ortasında bulunan yarım ay şeklinde bir kemiktir. Lunatumun ossifikasyonu 2 - 4 yaş arasında başlar ve ortalama 12 yaş civarında tamamlanır.

Lunatum' un dört eklem yüzü bulunur: Proksimalde radiusun medial kısmı (lunatum fossa) ve triangüler fibrokartilaj kompleks (TFKK), lateralde skafoidin proksimal ucu, medialde ise triquetrum ile eklem yapar. Distal yüzünün büyük bir kısmı lateralde kapitatum ile küçük bir alan ise medialde hamatumun apeksi ile

eklem yapar.Lunatumun anterior (volar) ve posterior (dorsal) yüzlerinde eklem kıkırdağı bulunmaz. İnterosseoz kan akışının sağlandığı damarların giriş çıkışları ve ligamanların yapışma bölgeleri kemiğin bu iki yüzündedir.

El bileği eklemi, ellipsoid tip, sinoviyal bir eklemdir.İç yüzü sinoviyalmembranla döşeli olan eklem kapsülü,yukarıda radius ve ulna'nın distal ucuna, aşağıda ise os pisiforme hariç proksimal sıra karpal kemikleretutunur. Eklemi saranbağlar kapsülle kaynaşmışdurumdadır. Bu yüzden kapsülü diğer yapılardan izoletmek güçtür. Özellikle dorsal ve palmar yüzde uzananradiokarpal bağlarkapsülü kuvvetlendirir. Beslenmesi anteriorinterosseal arter, radial ve ulnar arterlerin anterior veposterior karpal dalları, palmar ve dorsal metakarpalarterler, derin palmar arktan ayrılan reküren dal tarafindansağlanır. Anterior ve posterior interosseal sinirtarafından innerve edilir.

Skafolunat Ligaman:Lunatum ile skafoid arasında volar, dorsal ve interosseoz kısımlarından oluşan güçlü bir bağdır. Volar komponenti 1mm kalınlığında oblik uzanımlı kollajen fiberlerden oluşur ve rotasyonel stablizasyon sağlar. Dorsal komponenti ise yaklaşık 3mm kalınlığında olup transvers uzanımlıdır.Fonksiyonel önemi, el bileği hareketlerinde önemli olan skafoid fleksiyonu ve ekstansiyonunu kolaylaştıran bir menteşegörevi gören gergin dorsal liflerden kaynaklanır.

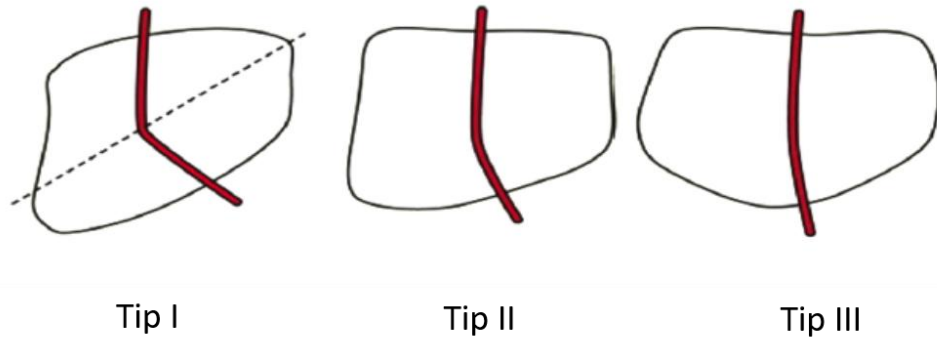


Şekil 2: El bileğinin volar(A) ve dorsal(B) ligamanları

Lunotriquetral Ligaman: Lunatum ile triquetrum arasında uzanan lunotriquetral bağ dorsal interosseal ve volar komponentlerden oluşur. Kısa ve sağlam yapıdadır. Ulnolunat ve kısa radiolunat bağ ile birlikte lunatum stabilizasyonunu sağlar.

Lunatum Varyasyonları

1966 yılında Zapico tarafından üç tip lunatum morfolojisi tanımlanmıştır. Tip 1 lunatum morfolojisinde lunatumun skafoid ve radial eklem yüzleri arasında 135° 'den büyük bir açı bulunur. Bu tip morfoloji daha çok negatif ulnar varyans ile ilişkilendirilmiştir. Tip 2 lunatum daha çok dikdörtgen şeklindedir ve genellikle nötral ulnar varyanslı kişilerde bulunmaktadır. Tip 3 morfoloji ise iki proksimal eklem yüzü olan beşgen şeklindedir. Tipik olarak pozitif ulnar varyanslı kişilerle ilişkilendirilmiştir(8).



Şekil 3: Morfolojik varyasyonlar

Biyomekanik

El bileği eklemine hareket fonksiyonu dışında bir de yük taşıma fonksiyonu mevcuttur. Radius ve TFKK'inin toplam eklem yüzeyi ortalama 342 mm^2 'dir. Bunun yaklaşık %46'sı lunat faset, %43'ü skafoid faset ve %11'ini TFKK oluşturur (9). Önkoldan karpal kemiklere yük aktarımıyla ilgili yapılan biyomekanik çalışmalarda yükün büyük bir kısmı skafoid tarafından (%55) taşınmaktadır. Lunatum; el bileğinden aktarılan yükün ortalama %35'ine maruz kalır. Geri kalan %10'luk kısım TFKK aracılığı ile aktarılmaktadır.

Radiokarpal ve midkarpal eklem hareketleri ile el bileğine ekstensiyon, fleksiyon, ulnar ve radial deviasyon yapılabilmektedir. Ön kolun supinasyon ve

pronasyon hareketi ise proksimal ve distal radioulnar eklemler aracılığı ile meydana getirilir. Ayrıca el bileğinin hareketleri kinematik olarak incelendiğinde, proksimal ve distal karpal sıralarının birbirinden bağımsız ancak bütünleşmiş şekilde hareket ettikleri saptanmıştır. Fleksiyon-ekstansiyon sırasında ortalama 120° hareket açıklığı olup, proksimal ve distal karpal seri aynı ekseninde senkronize hareket eder. Ancak radial deviasyonda proksimal sıra ulnaya doğru, distal sıra ise radiusa doğru hareket eder(10). El bileği hareket dereceleri ölçümü sırasında humerusun rotasyon hareketini ekarte etmek için dirsek ekleminin 90° fleksiyonda olması gerekmektedir. Normal el bileğinin ortalama hareket açıklığı “nötral sıfır metodu” kullanılarak tanımlanmıştır(11). Buna göre:

Ekstansiyon (dorsal fleksiyon): $50^\circ - 80^\circ$

Fleksiyon (palmar fleksiyon): $60^\circ - 85^\circ$

Ulnar deviasyon (adduksiyon): $30^\circ - 45^\circ$

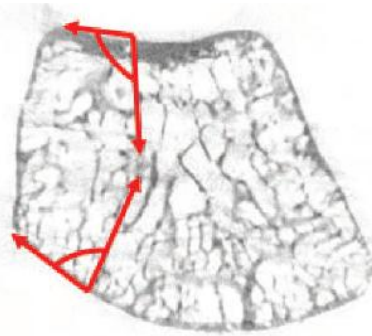
Radial deviasyon (abduksiyon): $15^\circ - 30^\circ$

Pronasyon: $80^\circ - 90^\circ$

Supinasyon: $80^\circ - 90^\circ$ dir.

Lunatum Histoloji

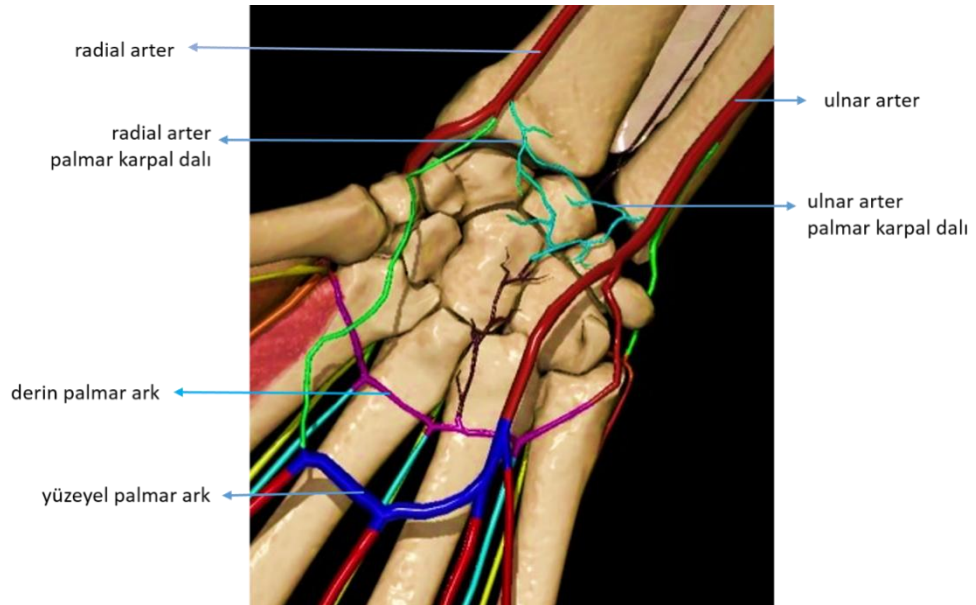
Owers ve ark.'ın 2010 yılında 29 kadavra üzerinde yapmış olduğu histolojik çalışmada; lunatumun trabeküler yapısının proksimal ve distal eklem yüzlerine neredeyse dik uzandığını, subkondral kemik ve trabeküller arasında $72-102^\circ$ açı bulunduğunu ortaya koymuştur(12).



Şekil 4:Lunatumun trabeküler yapısı

Lunatum Vasküleritesi

El bileği ve el dolaşımını radial arter ve ulnar arter sağlar. Radial arter önkol volerde m. brakioradialis ve m. fleksör karpi radialis tendonları arasında el bileğine girer. El bileğinin dorsaline dönerken m. abductor pollicis longus tendonu ve m. extensor pollicis brevis tendonlarının derininden geçer. Radial arter daha sonra birinci dorsal interosseöz kasın başları arasından geçerek elin palmar yüzeyine ilerler. İnterkarpal eklemler seviyesinde ekstensör tendonların derininden ulnar tarafa doğru transver bir dal vererek ulnar arterden gelen transver dal ile birleşip dorsal ark' ı oluşturur. Dorsal radiokarpal arktan çıkan dal, os lunatumun dorsal beslenmesinin büyük bir kısmından sorumludur. Ulnar arter volerde ulnar sinirin medialinde, m. flexor digitorum superficialis ile m. flexor carpi ulnaris kasları arasında, fleksör retinakulumun yüzeyinde ilerler. Radiokarpal ve interkarpal eklem seviyelerinde dallanarak radial arterden gelen dala birleşip derin ve yüzeysel palmar arkları oluşturur. Os lunatum volar beslenmesi; a. radialis, a. ulnaris, a. interosseus anterior volar dalı ve derin palmar arkın rekürren dalı tarafından sağlanır(3).



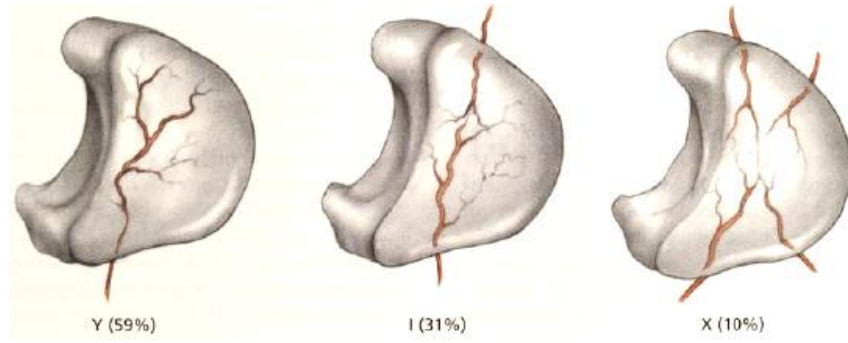
Şekil 5: El bileği çevresindeki arteriyel damar ağı; volar görünüm

Sözü geçen bu arklardan ayrılan arterioller volardan radiolunat, radioskafolunat ligaman (testut bağı) ve dorsalden dorsal radiokarpal ligaman üzerinden ilerler. Os

lunatum etrafında volar ve dorsal kapsüler pleksus oluşturarak lunatumun palmar ve dorsal boynuzlarından kemiği penetre ederek girerler.

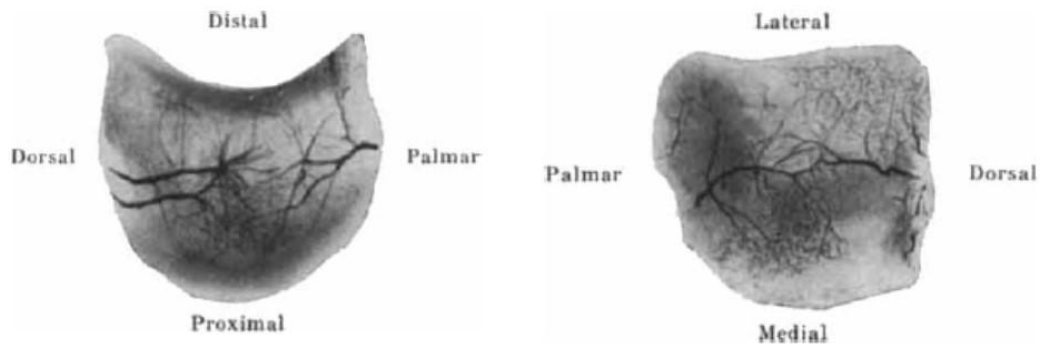
Lunatum'un İnternal Vasküler Ağı

Gelberman ve ark.' in 1980 yılında lunatum' un interosseöz damar yapısına yönelik yapmış olduğu çalışmada 35 kadavradan alınan lunatamlar değerlendirilmiş ve "Y", "I", "X" paterni olam üzere üç temel damar yapısı saptanmış(3).



Şekil 6: Lunatumun interosseöz vasküler varyasyonları

Yapılan çalışmada en sık saptanan Y paterninde os lunatuma volardan veya dorsalden iki adet, karşı lunat kutbundan bir adet damar girişi bulunmuş ve %59 oranında saptanmış. %31 "I paterni", %10 oranında "X paterni" olduğu belirlenmiş(3).



Şekil 7: Lunatum vasküler ağını gösteren spaltheoz preparatı

LUNATUM AVASKÜLER NEKROZU (KEİNBÖCK HASTALIĞI)

Tanım ve Tarihçe

Kienböck hastalığı (Lunatomalazi) lunatumun avasküler nekrozu ile seyreden, elbilek ekleminde ilerleyici ağrı ve fonksiyon kaybına neden olan osteonekroz tablosudur.

İlk olarak Peste (1843) tarafından kadavra diseksiyonlarında yükseklik kaybı olan lunatımlar tanımlanmış. 1910 yılında Avustralyalı radyolog Robert Kienböck lunat kemikteki bu rahatsızlığı lunatomalazi olarak tanımlamış ve radyolojik özellikleri ile ortaya koymuş ve lunatum avasküler nekrozu kendi adıyla anılagelmiştir(13). Hulten (1928)23 Kienböck hastasında yaptığı çalışmada %78 oranında negatif ulnar varyans saptamış ve bunugeneral nüfusla karşılaştırdığında sadece %23 oranında gözlemlendiğini tespit etmiştir. Bu bulgudan yola çıkarak distal radio-ulnar ekleminde ulnanın kısa olmasından dolayı, radio-lunat eklem üzerinden daha fazla yük aktarıldığını, lunatumun kapitatum ve radius arasında olması gerekenden daha fazla yüke maruz kaldığını, sonuçta tekrarlayan mikrokırık gelişimine bağlı olarak Kienböck hastalığı oluşma riskinin arttığını bildirmiştir(14).

Keinböck hastalığı oldukça nadir görülen bir rahatsızlıktır. Çeşitli prevalans ve insidans çalışmalarında toplumda %0,05 – 0,1 oranında görülür(15).

Hastalığı evrelendirmek, prognozunu belirlemek ve tedavi seçeneklerini düzenlemek için çeşitli kalsifikasyonlar geliştirilmiştir. Stahl (1947) ilk kez hastalığın evrelendirilmesi (Tablo 1), Decoulx (1953) ilk klasifikasyon, Lichtman (1977) ise tedaviye yönelik evrelendirmesini belirtmiştir (Tablo 2)(16).

Tablo 1: Stahl (1947) radyolojik evreleme

Evre I	Normal Radyografi
Evre II	Lunatumda Artmış Radyodensite ve Yükseklik Kaybı
Evre IIIa	Lunatumda Çökme, Sakfoid Rotasyonu Yok
Evre IIIb	Lunatumda Çökme, Sakfoid Rotasyonu Var
Evre IV	Perilunat Dejenerasyon

Tablo 2: Litchman (1977) evrelemesi

	Tanı	Tedavi
Evre I	Xray Normal, MR Bulguları Pozitif	İmmobilizasyon, NSAİ
Evre II	Lunat Skleroz	Ulnar Negatif Hastalarda Radial Kısaltma Osteotomisi, Ulnar Nötral Hastalarda Radial Kama Osteotomi Veya STT Füzyon, Distal Radius Kor Dekompresyon, Revaskülarizasyon Prosedürleri
Evre IIIA	Lunat Çökme, Skafoid Rotasyonu Yok	Evre II ile Aynı
Evre IIIB	Lunat Çökme, Skafoid Rotasyonu Var	Proksimal Sıra Karpektomisi veya STT Füzyon
Evre IV	İnterkarpal Eklem Dejenerasyonu	El Bilek Artrodezi, Proksimal Sıra Karpektomisi, Sınırlı İnterkarpal Füzyon

Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Keinböck hastalığının etiyolojisine yönelik yapılan pek çok araştırmaya rağmen günümüzde halen kesinlik kazanmamış pek çok ayrıntı mevcut. Hastalığın oryata çıkmasını kolaylaştıran bazı nedenler öne sürülmüş ancak hiçbiri kesinlik kazanmamıştır. Zapico (1966)'nın tanımladığı lunatum morfolojileri ve distal radius anatomisinin lunatum ile olan ilişkisi gibi nedenler etiyolojide suçlanmıştır(17). İnterosseöz vasküler anastomozların yetersiz olması (%7) Keinböck hastalığı için kolaylaştırıcı bir faktör olarak kabul edilmiştir(3). Bununla birlikte etiyolojik nedenler arasında en çok suçlanan etmen negatif ulnar varyanstır. Ulna minus varlığında radiustan lunatuma aktarılan yük miktarındaki belirgin artışın, lunatumda basınç artışına yol açması ve kemik içi beslenmenin zaman içerisinde bozulması teorisine dayanan bir görüş mevcuttur(18, 19). El bileğinin anatomik varyasyonları dışında mekanik faktörler de lunatum avasküler nekrozu etiyolojisinde suçlanmaktadır. Tekrarlayan mikrotravmalar ve perilunat kırıklı çıkıklar gibi makrotravmalar sonucu lunatumda avasküler nekroz gelişebileceğine yönelik ortak bir görüş mevcuttur.

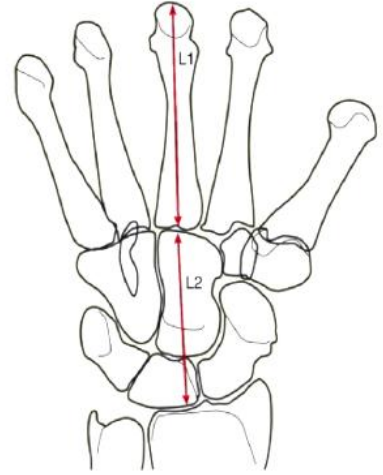
Klinik

Lunatum avasküler nekroz el bilek ağrısı, şişlik, hareket açıklığında azalma ve günlük aktiviteler gerçekleştirilmede güçlük yakınması ile kliniğe başvurlar. En sık görüldüğü yaş grubu 20 - 40 yaş arasındır. Çeşitli insidans çalışmalarında erkek/kadın oranı 2-3/1'dir. Genellikle tek taraflıdır ve travma öyküsü yoktur. Daha çok ağır iş işçilerinde tekrarlayan mikrotravmaların bir etkisi olarak ortaya çıktığı düşünülse de etiyolojik anlamda tam olarak ortaya konmamıştır. Bilateral görülme sıklığı %2'den azdır. Sıklıkla erişkin dönemin bir hastalığı olarak karşımıza çıksa da çocukluk ve ergen çağında da ortaya çıkabilir ve genellikle daha iyi prognozlu seyrederek.

Ağrı genellikle el bileği dorsalinde, başlangıçta aralıklı olarak ortaya çıkar. Giderek artan ağrı sıklığı özellikle el bileği ekstensiyonunu kısıtlayıcı bir nitelik kazanır. Zamanla elin kavrama gücünde de kayıp ortaya çıkar. İlerleyen evrelerde fragmente olan lunatuma ait parçalar dorsal veya volar kapsülden dışarı çıkarak bir veya birkaç fleksör veya ekstensör tendonun rüptüre olmasına neden olabilir. Bu durum genellikle Litchman evre IIIb veya IV'de ortaya çıkar(20).

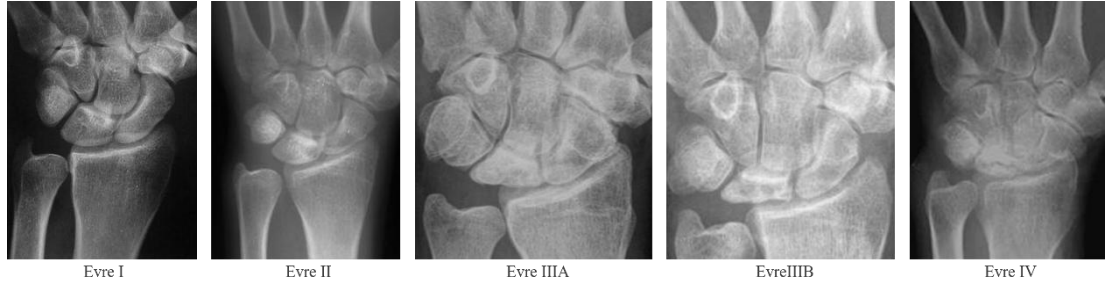
Görüntüleme

Hastalığın tanısında direkt grafi ve manyetik rezonans görüntülemesinden faydalanılır. Erken evrede radyoloji tamamen normaldir ancak çekilen el bilek MR'ında T1 ağırlıklı kesitlerde lunatumda sinyal kaybı, T2' de ise hiperintens görünüm elde edilir. Direkt grafilere, lunatumdaki skleroz ve çökme gibi değişikliklerden başka; radial inklinasyon açısı, ulnar varyans, karpal yükseklik ve interkarpal artroz da değerlendirilebilir. Karpal yükseklik ölçümü; lunatum prokismal kenarından kapitatum distal kenarına kadar olan karpal mesafenin 3. metakarp uzunluğuna oranı olarak hesaplanır ve bize lunatumdaki çökme varlığı hakkında objektif veriler sunar. Bu oranın normal değeri $0,54 \pm 0,03$ 'dir.



Şekil 8: Karpal yükseklik ölçümü

Lichtman'ın radyolojik bulgulara göre tanımlamış olduğu sınıflandırma yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo b). Birinci evrede direkt grafiler



Şekil 9: Lichtman radyolojik evrelemesi, el bilek AP grafileri

normaldir fakat MRG'de difüz sinyal intensite değişiklikleri bulunur. İkinci evrede direkt grafilerde lunatumda difüz skleroz mevcuttur. Üçüncü evre ikiye ayrılır: Evre IIIA'da lunatumda çökme vardır (genellikle hastalığın ilk tanımlandığı dönemdir). Evre IIIB'de lunatumdaki çökmeye kapitatumun proksimale yer değiştirmesi ve sakafolunat açının 60° 'nin üzerine çıkması ile karpal yükseklik azalması eşlik eder. Evre IV'de lunatumdaki çökmeye radiokarpal ve midkarpal artroz eşlik eder.

Ulnar Varyans: Direkt grafi ile elde edilecek bir diğer bulgu ulnar varyanstır. Yapılan bazı çalışmalarda negatif ulnar varyans ile Kienbock hastalığı arasında korelasyon bulunmuştur (19, 21). Ulnar varyans ölçümü önkol nötral rotasyonda çekilen PA grafi ile değerlendirilir. Bunun için omuz 90° abduksiyonda dirsek 90° fleksiyonda avuç içi kasete bakacak şekilde pozisyon verilerek alınan görüntü değerlendirilir. Önkolda rotasyon açısı 0° olmalıdır. Çünkü supinasyonda ulnar varyans azalır, pronasyonda ise artar (22). Çekilen grafide distal radius lunat fossa tabanından çekilen transvers çizgi ile ulnar baştan çekilen ikinci transvers çizgi arasındaki mesafe ölçülerek ulnar varyans hesaplanır. Ulnanın radiusa göre daha distalde olduğu ölçümlerde pozitif, daha proksimalde kaldığı ölçümlerde negatif varyanstan söz edilir (18). Normal değeri ortalama 0,9mm'dir.

Radial İnklinasyon: Radial stiloid tipinden, radius distal eklem yüzü ulnar köşeyi birleştiren çizgi ile radiusun uzun aksına dik geçen çizgi arasında kalan açı ölçülerek hesaplanır. Ortalama 24° (19° - 29°)'dir. Radial inklinasyon açısının azalması, lunatuma binen yükü artırır (23).

Tedavi

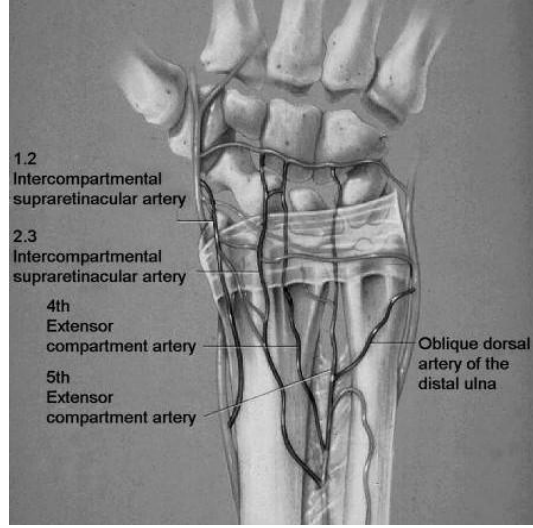
Keinböck hastalığının tedavisinde konservatif tedaviden el bilek artrodezine uzanan çok sayıda tedavi yöntemi tanımlanmıştır. Tedavinin planlanmasında hastalığın evresi, hastanın yaşı ve beklentisi önemlidir. Erken evrelerde konservatif tedavi ile hastalığın gerileyebileceği, ileri evrelerde ise el bileğinde artroz ile sonuçlanabilecek şekilde ilerleyebileceği bilinmektedir. Ekstrakorporeal şok dalga tedavisi (ESWT)'nin Keinböck hastalarının el bileğindeki ağrı ve fonksiyona pozitif etkisi bulunduğu ve cerrahi tedaviyi geciktirebileceği düşünülmektedir(24).

Cerrahi tedaviler arasında lunatuma aktarılan yükü azaltmaya yönelik uygulanan önkol veya kapitatum osteotomileri ile revaskülerizasyona yönelik çeşitli vasküler kemik flebi uygulamaları tanımlanmıştır. Kısmi karpal kemik artrodezleri veya el bilek artrodezi ve proksimal sıra karpektomisi, izole lunatum eksizyonu ve interpozisyon artroplastisi gibi cerrahi yöntemler de lunatum avasküler nekrozu tedavisinde uygulanabilecek yöntemler arasındadır. Postoperatif süreçte ağrının önüne geçmek ve rehabilitasyonu kolaylaştırmak amacıyla seçilen cerrahi prosedürleri uygularken beraberinde posterior interosseöz sinir dorsal dalına nöroktemi uygulanarak el bilek denervasyonu gerçekleştirilebilir.

Radial Kısaltma Osteotomisi: Negatif ulnar varyanslı hastalarda mekanik olarak lunatum üzerindeki yükün azaltılmasına yönelik uygulanan bir yöntemdir. Eklem seviyesinin eşitlenmesi hedeflenir. Evre II, IIIA ve IIIB'de uygulanabilecek bir yöntemdir. Yapılan çalışmalarda 4mm'den daha fazla yapılan kısaltmaların ulnar taraf el bilek ağrısına yol açabileceği bildirilmiştir(25). Lunatuma aktarılan yükün azaltılması amacıyla uygulanan bir başka osteotomi yöntemi radial kapalı kama osteotomisidir. Radial inklinasyon açısı azaltılarak lunatum üzerindeki tepe basıncının düşürülmesi hedeflenir. Iwasaki ve ark. (2002)'in evre IIIB ve IV olan yirmi Keinböck hastası ile yaptığı çalışmada radial kısaltma osteotomisi ile radius kapalı kama osteotomisi sonuçları karşılaştırılmış, her iki grupta da hem radyolojik hem klinik anlamda birbirine benzer; iyi ve mükemmel sonuçlar elde edilmiştir(26).

Kapitatum Kısaltma Osteotomisi: Ulnar varyansın nötral ya da pozitif olduğu durumlarda vasküler kemik flebiyle birlikte veya tek başına uygulanabilen bir yöntem olup lunatuma binen yükü belirgin olarak azalttığı biyomekanik çalışmalarla ortaya konmuştur(27).

Vasküler Kemik Flepleri: Amaç lunatumun tekrar kanlanmasını sağlanmasıdır. Bunun için uygulanan çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Vasküler pisiform kemik transferi, iliyakkanattan serbest vasküler kemik transferleri, pronator quadratus vasküler pediküllü kemik flepleri ve metakarpal arterlerin direkt implantasyonu ve distal radiustan 4+5 ekstansör kompartmantal arter pediküllü kemik flepleri sayılabilir. Bu yöntemler tek başlarına ya da



Şekil 10: Vasküler pediküllü kemik flepleri için donör sahaları

skafotrapeziotrapezoid (STT), skafokapitat (SC) artrodez gibi tekniklerle beraber uygulanabilir. Vasküler kemik transferleri ile birlikte evre IIIA ve IIIB’de eksternal fiksator uygulamaları iyileşme sırasında lunatum üzerindeki mekanik stresi azaltarak iyileşme sürecinde yardımcı olabilir.

Proksimal Sıra Karpektomisi: Erken evrelerde hastalığın ilerleyici doğasını durdurmak ya da yavaşlatmak amacıyla pek çok cerrahi metod tarif edilse de, ilerlemiş kollapslarda asıl amaç ağrının kontrolüdür. İleri evre Keinböck hastalarında uygulanabilecek bir alternatif olarak 1944 yılında Stamm tarafından tanımlanan bu yöntemde normal skafoid ve trikuetrum hastalıklı lunatum ile beraber çıkarılarak, kapitatum ve radiusun lunat çukuru arasında yeni bir eklem oluşturulmaktadır(28).

Eklem aralığındaki kısılma sonucu gelişen tendon laksitesi sonucu postoperatif dönemde kavrama gücünde kayıp olsa da zaman içerisinde eski gücüne kavuşmaktadır. Uzun dönem takiplerinde radiokapitat artroz gelişimi ve elin kavrama gücünde azalma gibi sorunlar bildirilmiştir(29).

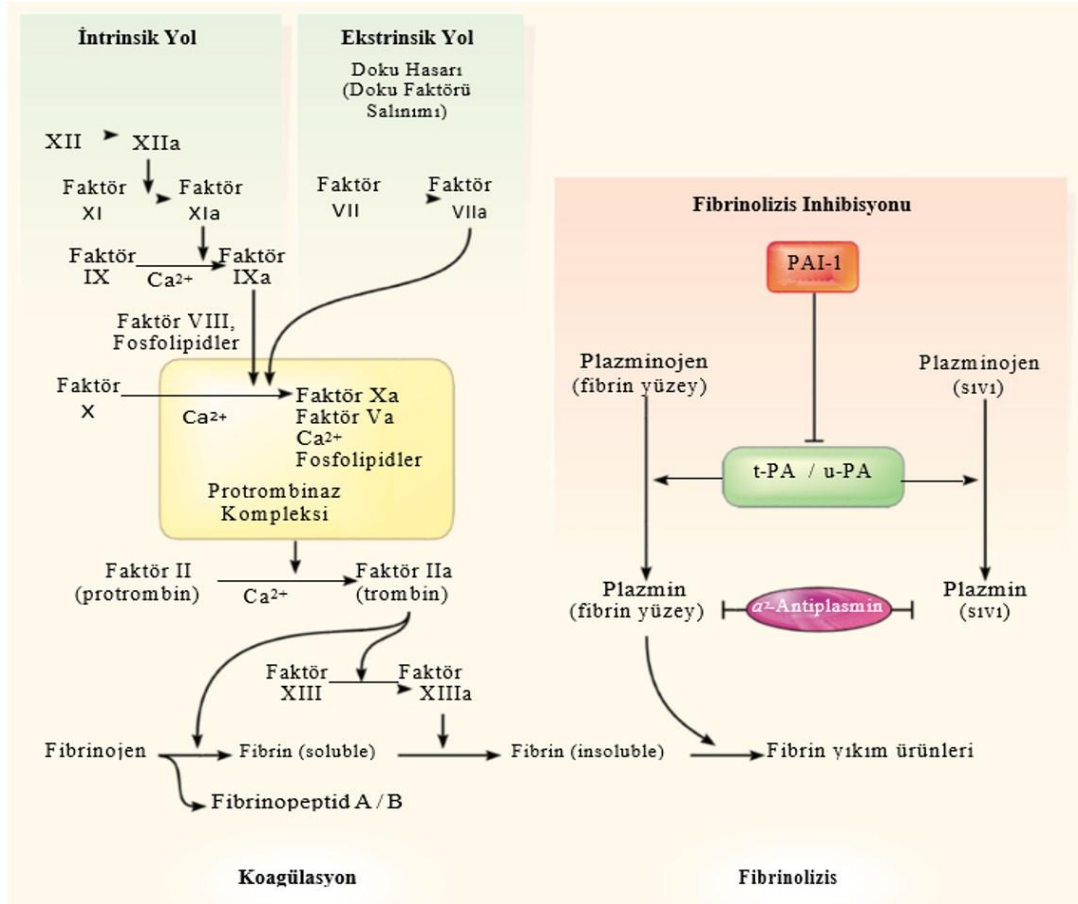
Proksimal sıra karpektomisinin uzun dönem sonuçlarına yönelik yapılan retrospektif bir çalışmada; 1967 ve 1992 yılları arasında cerrahi uygulanan 61 hasta değerlendirilmiştir. Operasyondan değerlendirilmeye kadar geçen ortalama takip süresi 19.8 yıl olarak kaydedilmiştir. Çalışmaya dahil olan hastaların %74' ünün ağrı ve eski işine dönememe sebepleriyle sonuçlardan memnun olmadığı, 12 hastanın ise bu süre zarfında el bilek artrodez cerrahisi geçirdiği kaydedilmiştir. Ancak uzun dönem takiplerde elin kavrama gücü ve el bileği hareket açıklığının stabil kaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte; cerrahi sırasında posterior interosseöz sinir eksizyonu uygulanmış hastaların postoperatif uzun dönem sonuçlarında daha yüksek memnuniyet elde edildiği sonucuna varılmış(30). Benzer çalışmalarda da elin kavrama gücünün hastanın eski işine geri dönebilecek kadar korunduğu gözlenmiştir.

Total El Bilek Artrodezi: İleri evre hastalarda total el bilek artrodezi özellikle ağır işlerde çalışan hastalar için seçilebilecek bir yöntem.

Kienböck hastalığının etiyoloji ve patofizyolojisi ve hastalığın sürecini modifiye etme yeteneğimiz hala tartışmalıdır. Hastalığın ne zaman ve nasıl duracağını bilmemekteyiz. Doğal hikaye her zaman progresif kollaps ve artrit olmamaktadır. Tedavi edilsin ya da edilmesin, hastalık çoğu zaman düşük Lichtman evrelerinden birinde durabilmektedir. Bununla birlikte hiç bir aktif tedavinin Kienböck hastalığının tedavisinde birbirine üstünlüğü olmadığı düşünülmektedir(31).

FİBRİROLİTİK SİSTEM

Fibrinoliz, pıhtılaşma sonucu oluşan fibrinin enzimatik olarak parçalanmasını sağlayan bir proteoliz olayıdır. Damar çeperindeki fibrinolitik sistem sürekli olarak yine damar endotelinde etkinlik gösteren pıhtılaşma mekanizmasının tersine çalışır ve hemeostazı dengeler. Kan fibrinolitik sistemi; inaktif bir enzim olan plazminojenin plazmine dönüşümü ve fibrinin çözünebilir fibrin parçalanma ürünlerine dönüşümünü



Şekil 11: Koagülasyon ve Fibrinolizis Yolu

sağlayan aktif bir sistemdir. Fibrin; önce kısa zincirli fibrinopeptidlere, sonra da küçük peptidlere ve aminoasitlere kadar yıkılır. Bu olaydan asıl sorumlu enzim, damar endotelinden salınan plazmin (fibrinolizin) enzimidir. Plazmin, normal durumda plazmada plazminojen (profibrinolizin) olarak bulunur. Vücutta plazminojenin aktif hale dönüştürülmesini sağlayan iki endojen plazminojen aktivatörü vardır; bunlar dokü plazminojen aktivatörü (tissue plasminogen activator, t-PA) ve ürokinaz'dır. Plazmada ve doküdeki t-PA'nın plazminojen üzerindeki etkisi,

α 2- plazmin ve plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI-1 ve PAI-2) tarafından kontrol edilmektedir(32).

En önemli plazminojen aktifleştirici ajan t-PA'dır. t-PA vasküler endotel hücreleri tarafından sentezlenip kan dolaşımına salınır ve fibrinolizisin başlamasında önemli rol almaktadır. Plazmin; fibrin, fibrinojen, faktör V ve faktör VIII' i parçalar. Doku plazminojen aktivatörü üzerindeki bölgeler fibrine bağlanmada, fibrine özgü plazminojenin aktifleştirilmesinde rol oynar. Fibrin varlığında t-PA' nın plazminojen etkinleştirici özelliği belirgin bir şekilde artar. Dolaşımdaki t-PA PAI-1 tarafından inhibe edilmektedir(33).

Dolaşımda doku plazminojen aktivatörü (t-PA) 'nün büyük bir kısmı plazmada PAI-1, antiplazmin ve C1-inhibitör gibi inhibitörlerle kompleks halinde dir. PAI-1 plazminojenden plazmin oluşumunu inhibe ederek koagülasyon ve fibrinolitik sistem dengesinde önemli rol oynar. Fibrinolitik sistemde PAI-1 inaktivasyonu artmış plazmin oluşumuna ve kanama eğilimine, yüksek PAI-1 düzeyleri ise tromboz riskine neden olur. Artmış plazmin fibrinolitik etki ile birlikte doku matriks metalloproteinaz (MMP) aktivasyonuna yol açar. Aktif MMP de ekstraselüler matriks (ECM) yıkımına neden olur. En az dört tane PA inhibitörü bulunmaktadır. Her ne kadar in vitro olarak pek çok PA inhibitörü gösterilmişse de en önemli intravasküler PA inhibitörü PAI-1'dir(34).

Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 (PAI-1)

PAI-1 ilk olarak 1983 yılında, trombosit ve endotel hücrelerinden sentezlenen, u-PA ve t-PA üzerinden inhibitör etki gösteren bir glikoprotein olarak tanımlanmıştır. PAI-1 fibrinolizisin güçlü bir inhibitörüdür. Serin proteinaz inhibitör (serpin) ailesindedir ve diğer proteaz inhibitörleri gibi kanda bulunmaktadır. PAI-1 diğer serpin inhibitörleri gibi hedef proteaza geri dönüşümsüz bağlanarak intihar inhibitörü gibi davranır ve sodyum dodesilsülfat (SDS) bölgesi ile kararlı bağ oluşturur. PAI-1 plazmada ortalama 20 ng/mL (0.5nM) gibi çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır ve yarı ömrü yaklaşık 6-7 dakikadır(35). 7. kromozomda (7q21.3-q22) kodlanmış olup 12,2 kb yer kaplayan 9 ekson, 8 intron içermektedir. 379 aminoasitten oluşan tek zincirli globüler glikoprotein

yapısındadır(36). Moleküler ağırlığı 45-kDa'dır ve reaktif peptit zinciri Arg345 – Met 346 bölgesinde lokalizedir. Bu bölge PAI-1'in asıl fizyolojik bölgesidir.

PAI-1'in asıl kaynağı trombositler ve endotel hücreleri olsa da monosit, makrofaj, plazma, fibrosarkom hücreleri ve hepatositlerden de sentezlendiği gösterilmiştir. PAI-1 trombositlerde polanır. Sentezden sonra hızlıca salınır ve salındıktan kısa bir süre sonra inhibitör aktivitesini kaybederler. PAI-1'e bağlanan plazma ve periselülmatriks komponenti olan vitronektin; PAI-1'in aktif durumunu korumasını sağlar. PAI-1 plazma düzeyi değişkenlik göstermekle birlikte yaşla beraber artmakta ve diurnal ritimdesalınmaktadır. Sabah en fazla ve akşam en düşük düzeydesaptır. t-PA ile ters diurnal ritim gösterir.

Önceki bölümde anlatıldığı gibi PAI-1; fibrinolitik sistemdeki denge üzerine etki eden ana düzenleyici faktör olarak görev almaktadır. Bu nedenle bu protein ve sentezinden sorumlu gen üzerine pek çok farklı alanda çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Çeşitli çalışmalarda artmış plazma PAI-1 düzeyleri tromboembolik hastalıklarda, obezitede, sepsiste, koroner kalp hastalıklarında ve miyokard infarktüsünde ilişkili bulunmuştur. PAI-1 ateroskleroz ve inflamasyonda önemli rol oynamaktadır. Adiposit hücre kültürü çalışmalarında artmış inflamatuvar belirteçlerin PAI-1 mRNA sentezini uyardıkları gösterilmiştir(37).

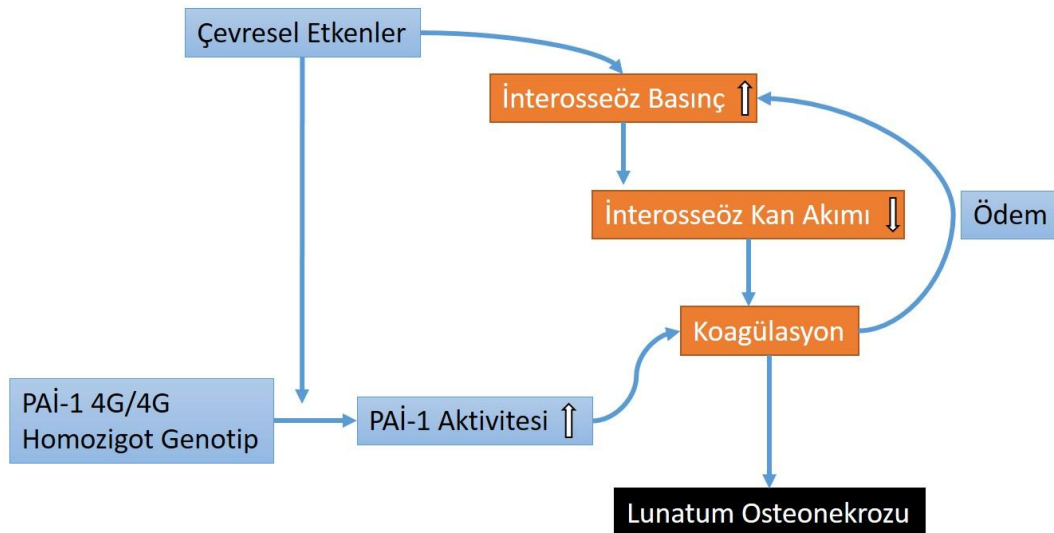
Arteriyel ve Venöz Tromboembolizmde PAI-1' in Rolü

Yapılan çalışmalarda DVT ve PTE' li hastalarda PAI-1 aktivitesini yüksek saptamışlardır(38). DVT' li hastaların üçte birinden fazlası artmış PAI-1 seviyelerine sahiptir. Kalça artroplastisi sonrası DVT gelişen hastalarda yapılan çalışmada PAI-1 seviyeleri, gelişmeyenlere göre belirgin yüksek bulunmuştur(39). Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon (PHT)' lü hastalarda fibrinolitik sistem defektiftir. Normal koşullarda pulmoner arter duvarında PAI-1 mevcuttur ancak santral pulmoner arterden alınan trombüste ve trombüs altında uzanan endotelial tabakada artmış PAI-1 düzeylerine rastlanılmıştır(40). Bu gözlemlere dayanarak akut trombüs oluşumu ve sürekliliğinin PAI-1' in lokal etkisine bağlı olarak gerçekleştiği söylenebilir. Teorik olarak PAI-1' e dirençli fibrinolitik ajanların kullanılması PTE' de trombolitik tedavinin etkinliğinin artmasına katkıda bulunur.

Artmış plazma PAI-1 seviyeleri unstable anjina, myokard infarktüsü(MI) ve reenfarktüs gibi akut koroner sendromların sıklığının artmasıyla ilişkili bulunmuştur(41, 42). Plazma PAI-1 seviyelerinin pik yaptığı sabah saatleri, akut MI ve nonoklüzifiskemik koroner olaylarındaki sıklıkla görüldüğü bir zamandır(43). Anvari ve arkadaşları 4G/5G alleli, artmış plazma PAI-1 seviyeleri ile şiddetli koroner arter hastalığı ve ani kardiyak ölüm gelişimi arasında pozitif ilişki bulmuştur(44).

Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 (PAI-1) Gen Polimorfizmi

PAI-1 gen polimorfizmi ile plazma PAI-1 düzeyi arasında yakın ilişki vardır. 4G/5G gen polimorfizmi PAI-1 geninin promoter bölgesindeki -675. baz çiftindeki tek bir nükleotiddeki insersiyon/delesyon sonucunda ortaya çıkan sık görülen bir polimorfizmdir(45). 4 ya da 5 guanin nükleotidi oluşumu polimorfizme neden olmaktadır. Hem 4G hem de 5G bölgesi transkripsiyon aktivasyonu için bağlayıcı bölgeye sahiptir. 5G alleli ayrıca reseptör için bağlayıcı bir bölgeye sahiptir. 5G alleli PAI-1'in daha az transkripsiyonu ve daha az PAI-1 aktivitesine neden olmaktadır. 4G alleli için homozigot olan kişilerde plazma PAI-1 düzeyinin 5G için homozigot olan bireylere göre % 25 oranında daha fazla olduğu gösterilmiştir (Şekil 12). Yapılan klinik çalışmalarda 4G/4G genotipinin myokard infarktüsü (MI) için % 20 oranında bir risk artışına neden olabileceği gösterilmiştir(46, 47).



Şekil 12: 4G/4G homozigot genotipin osteonekroz mekanizması

Asono ve ark.tarafındanPAI-1 plazma antijen düzeylerinin 4G/5G genotipi ile ilişkisini gösteren bir çalışmada; 5G/5G genotipinde plazma PAI-1 antijen düzeyi ortalama 18 ng/mL iken, bu değer; 4G/5G genotipi hastalarda ortalama 24 ng/mL,4G/4G genotipinde ise ortalama 38.5 ng/mL tespit edilmiş ve sonuçta genotipte 4G allellinin artan plazma PAI-1 seviyeleri ile anlamlı ilişkisi saptanmıştır(48).

PAI-1 4G/5G polimorfizminin femur başı avasküler nekrozu etiyojisindeki rolünü belirlemek için yapılan çalışmalardan derlenen bir meta-analizde 419 hasta ve 969 kontrol grubu dahil edilmiş. Yapılan analizlere göre 4G/4G polimorfizimli bireylerin femur başı avasküler nekrozu açısından risk altında olabileceği gösterilmiştir(6).

SNP (Single Nükleotid Polimorfizm)

İnsan genomunda, vücudun her hücresinde 3 milyar baz çifti bulunmaktadır ve genom her hangi iki insan arasında %99.5 oranında benzerlik göstermektedir. Genellikle hastalıklara yol açan, nükleotid sekansındaki nadir değişiklikler (varyantlar) mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Mutasyonlar aileden kalıtılabilir (germline mutasyonlar) ya da kanserlerde olduğu gibi bireyin hayatı boyunca sonradan kazanılabilir (somatik mutasyonlar). Polimorfizm ise populasyonda %1 veya daha sıklıkla gözlenen DNA varyasyonları ya da yaygın varyantlar olarak tanımlanmaktadır(49). SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmleri), genom dizisi içerisinde bazlardan (Adenin: A, Timin: T, Guanin: G, Sitozin: C) birisinin değişmesiyle meydana gelen DNA dizi farklılıklarıdır(50)ve yaklaşık her 1000 baz çiftinde bir görülmektedir. Polimorfizmler, mutasyonlardan toplumda daha yüksek sıklıkta varyant allel olarak bulunmaları nedeniyle ayrılırlar ve hastalık nedeni değil hastalığa yatkınlık nedeni olabilirler(51). İnsan DNA varyasyonlarının %90'undan sorumludur ve insan evrimi, ilaç yanıtında değişiklik ve hastalık duyarlılığında önemli rol oynamakta olup hastalıklara yatkınlık araştırmalarında genetik belirteç olarak kullanılmaktadır.

SNP'ler kodlayan bölge, intergenik bölgeler ve kodlamayan bölgelerde görülebilir. Genomun çok küçük bir kısmı gen kodladığı için, SNP'lerin büyük bir kısmı gen kodlamayan bölgelerde bulunur(52). SNP'ler genellikle protein kodlayan

genlerin komşu bölgelerinde bulunmakta olup promotör aktivitesini, pre-mRNA stabilitesini, proteinin substratı ya da inhibitörüne bağlanma kapasitesini de değiştirebilmektedir(53). Kodlayan bölgede bulunanlara fonksiyonel SNP'ler denir. Fonksiyonel SNP'ler ya aminoasit dizisinde ya da düzenleyici dizilerin fonksiyonlarında değişikliğe yol açarak gen fonksiyonlarını etkileyebilmektedir(52). SNP taramaları yapılarak hastalığa neden olma ihtimali olan varyant alleller tespit edilip daha sonra bireylerin DNA örneklerinde spesifik alleller incelenerek hastalığa yatkınlıkları belirlenebilmektedir(52).

HASTALAR VE YÖNTEM

HASTALAR

Bu çalışmaya, Ocak 2012 ile Haziran 2016 arasında Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji kliniğine başvuran lunatum avasküler nekrozu hastaları ve hasta grubuna uygun demografik özelliklere sahip kontrol grubu dahil edildi. Çalışmaya katılan hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerden yazılı aydınlatılmış onam alındı(*Etik Kurul Dosya No:60116787-020/65235*).

Hastane kayıt sisteminin 1 Ocak 2012–1 Haziran 2016 tarihleri arasındanması ile kliniğimizde Keinböck hastalığı tanısı ile opere edilmiş hastalar listelendi. Direkt grafi ve MR görüntüleme lunatumda avasküler nekrozu bulunan hastalar çalışmaya dahil edildi. Özgeçmişinde perilunat kırıklı çıkık gibi el bilek travma öyküsü bulunan hastalar çalışmadan dışlandı. Dijital kayıt sistemi üzerinden hasta bilgilerine ulaşılarak iletişime geçildi. Hastaneye çağırılan hastalara, yapılacak çalışma ve genetik analiz konusunda detaylı bilgilendirme yapıldı. Hasta grubundaki bireylerin yaş aralığında olan el bilek yakınması olmayan ve el bilek grafilerinde Keinböck hastalığına dair bulgu bulunmayan hastalar kontrol grubuna dahil edildi. Hasta grubu için Keinböck hastalığı tanısı almış, yaşları 18-49 arası 27 erkek, 18 kadın toplam 45 hasta; kontrol grubu için ise herhangi el bilek şikayeti olmayan yaşları 19-49 arası değişen 22 erkek, 23 kadın toplam 45 birey çalışmaya dahil edildi. Hem hasta hem de kontrol grubundaki hastalardan aydınlatılmış onam alınarak 1 adet K3 EDTA'lı tüpe (VACUETTE®) toplam 2ml periferik kan örneği alındı. Kan örnekleri hasta ve kontrol grupları için ayrı ayrı kodlanarak DNA izolasyonu yapılncaya kadar -20°C' de saklandı.

Çalışmaya dahil edilen hasta grubundaki bireyler kontrole geldiklerinde Mayo el bilek skorlaması ile postoperatif kas gücü, ağrı ve el bileği hareket aralığı değerlendirilmesi yapılarak sonuçlar kaydedildi.

YÖNTEM

Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonları ticari kit (Quickgene DNA Whole Blood Kit S, Fujifilm) kullanılarak otomatize nükleik asit izolasyon cihazında (Fujifilm Nucleic Acid Isolation System, Quickgene-810, Fujifilm) gerçekleştirildi. DNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar sırayla uygulandı.

1. EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden 200 µl periferik kan örneği alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı.

2. 200 µl kan örneklerine, 250 µl lizis tamponu (Lyzis Buffer; LDB) ve 30 µl Proteaz (EDB) eklenerek, maksimum hızda 10-15 sn vortekslendi (pulse-vorteks). Örnekler 56 °C'de 2 dk inkübe edildi.

3. İnkübasyon sonrası örneklere 250 µl >%99 etanol eklenerek maksimum hızda 10-15 sn vortekslendi (pulse vorteks). Kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.

4. Otomatize genomik materyal izolasyon cihazının kartuşuna filtreli tüpler yerleştirilerek lizatlar bu tüplere aktarıldı ve "DNA WHOLE BLOOD" modu seçilerek süzme işlemi yapıldı.

5. Filtreli tüplere 750 µl kitle sağlanan Wash Buffer ilave edildi ve tekrar süzme işlemi yapıldı. Bu işlem 2 kez daha tekrarlandı.

6. Kartuş, DNA izolasyonunda kullanılmak üzere cihaza önceden yerleştirilen ependorfların üzerine aktarıldı.

7. Filtreli tüplere 200 µl elüsyon bufferı eklenerek süzme işlemi başlatıldı. Böylece filtrede bulunan DNA'ların ependorflara aktarılması sağlandı.

8. Filtreli tüpler atılıp, DNA içeren süzüntü ependorf tüpü içinde saklandı.

DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi

Hasta ve kontrol gruplarından alınan periferik kanlardan izole edilen DNAörneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri spektrofotometrik

yöntemle(Nanodrop 2000c, Thermo Scientific) belirlenerek Tablo 15 ve 16’da gösterildi. Ölçümü yapılan DNA örnekleri çalışma yapılıncaya kadar + 4°C’de buzdolabında saklandı.

PAI-1 Geni 4G/5G Polimorfizminin Allel Spesifik PCR ile İncelenmesi

PAI-1 geni 4G/5G baz çiftini (bç) içeren gen bölgesi Tablo 3’de gösterilen primerler kullanılarak PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile çoğaltıldı.

Tablo 3: İlgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri

İnseriyon 5G Alleli İçin Kullanılan Primer	GTC TGG ACA CGT GGG GG
Delesyon 4G Alleli İçin Kullanılan Primer	GTC TGG ACA CGT GGG GA
Upstream Primer	AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT
Downstream Primer	TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G

Hasta ve kontrol gruplarındaki her bireyde hedef bölgeyi çoğaltmak amacıyla toplam hacim 50 µl olacak şekilde hem 4G hem de 5G alleli için reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR için kullanılan reaksiyon karışımı 4G ve 5G için sırasıyla Tablo 4 ve Tablo5’de gösterilmiştir. Bu karışımdaki içerikler örnek sayısı ile çarpılarak PCR için gerekli miktar hazırlandı.

Tablo 4: Tek bir örnekte 4G alleli için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği

Bileşen Adı	Miktarı
Mastermiks	25 µl
Upstream Primer	3 µl
Downstream Primer	3 µl
Delesyon 4G Allel Primer	3 µl
Su	11 µl
DNA	5 µl
Toplam	50 µl

Tablo 5: Tek bir örnekte 5G alleli için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği

Bileşen Adı	Miktarı
Mastermiks	25 µl
Upstream Primer	3 µl
Downstream Primer	3 µl
İnsersiyon 5G Allel Primer	3 µl
Su	11 µl
DNA	5 µl
Toplam	50 µl

Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra örnekler Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek 94⁰ C'de 60 saniye, 54⁰ C'de 30 saniye ve 72⁰ C'de 40 saniye 35 döngü şeklinde reaksiyon koşulları uygulandı. Elde edilen PCR ürünleri %3,5'lük agoroz jel elektroforezinde değerlendirildi. Buna göre PCR sonucu 4G primeri ile 139 bç bant verip 5G primeri ile 139 bç bant vermeyen örnekler homozigot 4G genotipli, 5G primeri ile PCR sonucu 139 bç bant verip 4G primeri ile PCR sonucu 139 bç bant vermeyen örnekler homozigot 5G genotipli, her ikisinde de 139 bç bant verenler ise heterozigot 4G5G genotipli olarak belirlendi.

PAI-1 Geni 4G/5G Polimorfizminin Dizi Analizi Yöntemi ile İncelenmesi

Çalışmamıza dahil olan 45 hasta ve 45 kontrolde allel spesifik PCR ile belirlediğimiz genotipler dizi analizi yöntemi ile doğrulandı ve PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR'de kullanılan primerler Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6: İlgili gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri

Forward Primer	AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT
Reverse Primer	TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G

PAI-1 geninin çoğaltılacak bölümü için toplam hacim 50 µl olacak şekilde PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Tek bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım

içeriği Tablo 7’de gösterilmektedir. Bu karışımdaki içerikler örnek sayısı ile çarpılarak PCR için gerekli miktar hazırlanmıştır.

Tablo 7: Tek bir örnek için hazırlanan polimeraz zincir reaksiyonu karışım içeriği

Bileşen Adı	Miktarı
Mastermiks	25 µl
Forward Primer	3 µl
Reverse Primer	3 µl
Su	14 µl
DNA	5 µl
Toplam	50 µl

PCR reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra örnekler Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek Tablo 8’de gösterilen basamaklar izlendi.

Tablo 8: Polimeraz zincir reaksiyonu için Thermal Cycler cihazında uygulanan basamaklar

İşlem	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	10dk	1
DNA Denatürasyon	95°C	15sn	35
Primer Bağlanma	60°C	45sn	35
Primer Uzatma	72°C	45sn	35
Son Uzatma	72°C	10dk	1

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen spesifik ürünler %2’lik agaroz jel elektroforeziyle kontrol edildikten sonra, bir sonraki aşamada yapılacak olan dizileme reaksiyonunu inhibe edebilecek PCR artıklarının uzaklaştırılması amacıyla ticari kit (Cycle Pure Kit, Omega Biotek) kullanılarak PCR ürünü saflaştırıldı. Bu protokolda sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. PCR ürünü üzerine 500 µl CP Buffer eklenerek vortekslendi.
2. Homojenizasyon sağlandıktan sonra örnekler HiBind DNA mini kolonlara aktarılıp ≥ 13.000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi.

3. Toplama tüplerindeki sıvı atıldıktan sonra kolonlara 700 µl DNA Wash Buffer eklenip ≥ 13.000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu basamak 2 defa uygulandı.

4. Toplama tüplerindeki sıvı atıldıktan sonra, rezidüel etanolü uzaklaştırmak için kolonlar bir kez ≥ 13.000 xg'de 2 dakika boş olarak santrifüj edildi.

5. Temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarılan kolonlara 50 µl Elüsyon Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilip ≥ 13.000 xg'de 1 dakika santrifüj uygulandıktan sonra kolonlar atılarak saflaştırma işlemi tamamlandı.

PCR ürünlerinin saflaştırma işlemleri tamamlandıktan ve ürünler %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra hedeflenen bölgenin dizilenmesi amacıyla dizi analizi reaksiyonu kuruldu. Hedef dizi 256 baz çifti uzunluğunda olan örneklerden hem reverse (geri) hem de forward (ileri) primerler ile iki ayrı sekans reaksiyonu kuruldu. Dizileme reaksiyonunda ürün başına kullanılan bileşenler ve reaksiyon koşulları Tablo 9 ve 10'da gösterilmektedir.

Tablo 9: Dizileme reaksiyonunda kullanılan bileşenler

Bileşen Adı	Miktarı
DTCS Quick Start Master Mixs	8 µl
Primer (Forward/ Reverse)	2 µl
Su	8 µl
Saflaştırılmış PCR ürünü	5 µl
Toplam	20 µl

Yukarıdaki tabloya göre örnek sayısı kadar reaksiyon karışımı hazırlandı. Dizileme reaksiyon karışımı saflaştırılmış PCR ürünlerine eklenmeden önce, PCR ürünlerine 96°C'de 1 dakika predenatürasyon uygulandı ve daha sonra tüplere 15'er µl karışım eklenip reaksiyona sokuldu.

Tablo 10: Dizileme reaksiyonu için Thermal Cycler cihazında uygulanan basamaklar

İşlem	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	96°C	2dk	1
DNA Denatürasyon	96°C	30sn	25
Primer Bağlanma	50°C	15sn	25
Primer Uzatma	60°C	4dk	25

Dizileme reaksiyonundan sonra örneklere 5'er µl stop solüsyonu (2 µl Sodyum Asetat + 2 µl Sodyum EDTA + 1 µl Glikojen) eklendi, pipetaj sonrası etanol çöktürme işlemine geçildi. Etanol çöktürme işlemi aşağıda belirtilen basamaklar sırasıyla uygulandı:

1. Örnekler üzerine, -20°C'de bekleyen %96'lık etanol solüsyonundan 70 µl eklenip pipetaj ve vorteksleme yapıldıktan sonra, 30 dk -20°C'de bekletildi ve 14.000 rpm'de, 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi.
2. Santrifüj işleminden sonra dipteki çökelti hareket ettirilmeyecek şekilde üstte kalan etanol dikkatlice alınıp atıldı ve -20°C'de bekleyen %70'lik etanol solüsyonundan 170 µl eklenip 14.000 rpm'de, 6°C'de 7 dakika santrifüj edildi.
3. Dipteki çökeltiyi hareket ettirmeyecek şekilde üstte kalan etanol dikkatlice alınıp atıldı ve örnekler önceden 40°C'ye ayarlanmış dry block'ta 40 dakika kurumaya bırakıldı.

Etanol çöktürme işleminden sonra kurutulan örneklere 40 µl örnek yükleme solüsyonu (formamid) eklenip, yoğun pipetaj yapıldıktan sonra örnekler Sample Plate'e yüklendi ve üzerlerine buharlaşmalarını engellemek amacıyla mineral yağı eklendi. Buffer Plate'e tampon solüsyonu eklendikten sonra ürün büyüklüğüne göre uygun okuma programı seçilip dizi analizi işlemi gerçekleştirildi (Beckman Coulter CEQ 8000 Genetics Analysis System).

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, medyan (en küçük – en büyük değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak gösterildi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare analizi kullanıldı ve allellerin risk durumu incelemesi için lojistik regresyon analizi yöntemi kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya Keimböck hastalığı bulunan 45 hasta ve kontrol grubu olarak Lunatum avasküler nekrozu lehine klinik ve radyolojik bulgusu olmayan 45 birey dahil edilmiştir.

Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Özellikleri

Grupların demografik özellikleri aşağıdaki Tablo 11’ de özetlenmiştir.

Tablo 11: Grupların demografik özellikleri

	Hasta	Kontrol	p değeri
Yaş			
Ortalama ±Std. Sapma	31,64 ± 7,9	33,35 ± 7,4	0,293
Medyan (min - maks)	31 (18 - 49)	34 (19-49)	
Cinsiyet			
Erkek (%)	27 (%60)	22 (48,9)	0.290
Kadın (%)	18 (%40)	23 (51,1)	

Tablo 10’deki veriler değerlendirildiğinde hasta grubunun yaşları, en küçüğü 18, en büyüğü 49, ortalaması ise 31,64 ± 7,9; kontrol grubunun yaşları, en küçüğü 19, en büyüğü 49, ortalaması ise 33,35 ± 7,4 idi. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş farkı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.293). Hasta grubu 27 erkek (%60), 18 kadından (%40); kontrol grubu 22 erkek (%48,9), 23 kadından (%51,1) oluşmaktaydı. Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.290).

Kliniğimizde Lunatum avasküler nekrozuna yönelik cerrahi uygulanmış yaşları 18 ile 50 arasındaki 27’ si erkek 18’ i kadın, 45 hastadan; 35’ ine proksimal sıra karpektomisi(PSK), 10’ una vasküler kemik flebi(VKF) uygulandı. Hastalar en az 8 en fazla 48 ay, ortalama 32 ay postoperatif takip edildi. 31 hastanın sağ el bileği 14 hastanın sol el bileği opere edildi.

Hastalar postoperatif kontrollerinde Mayo el bilek skorlaması ile değerlendirildi. (Tablo12)

Tablo 12: Cerrahi gruplara göre postoperatif klinik sonuçlar

Mayo Skorlaması	Cerrahi Türü	Ortalama \pm std sapma	Medyan (min - maks)	p
Ağrı	PSK	20,86 \pm 3,32	20 (15 - 25)	0,819
	VKF	20,5 \pm 3,69	20 (15 - 25)	
Memnuniyet	PSK	22,57 \pm 2,81	25 (15 - 25)	0,904
	VKF	22,5 \pm 2,64	22,5 (20 - 25)	
Eklem Hareket Açıklığı	PSK	17 \pm 4,06	15 (15 - 25)	0,638
	VKF	16 \pm 3,16	15 (15 - 25)	
Kas Gücü	PSK	22,14 \pm 4,58	25 (15 - 25)	0,946
	VKF	22 \pm 4,83	25 (15 - 25)	
Toplam Skor	PSK	82,57 \pm 9,1	80 (70 - 100)	0,657
	VKF	81 \pm 9,37	77,5 (70 - 100)	
Süre (ay)	PSK	30,66 \pm 12,13	30 (8 - 48)	0,492
	VKF	33,5 \pm 9,36	30,5 (18 - 48)	

Hastaların klinik değerlendirmesinde ağrı ve memnuniyet açısından her iki grupta da benzer sonuçlar elde edilmiş olup istatistiksel olarak fark bulunmadı. Gruplar arası değerlendirmede ağrı için p değeri 0,819 iken, memnuniyet için p değeri 0,904 olarak saptandı. Cerrahi uygulanan tarafta eklem hareket açıklığı(EHA) değerlendirmesinde 25 puan üzerinden ortalama 16,7 puan olarak; hastaların postoperatif dönemde normal el bileği eklem hareket açıklığının %66,8' i kadar hareket aralığına sahip olduğu belirlendi. EHA değerlendirmesine ayrı ayrı bakıldığında uygulanan cerrahi yöntemler arasında belirgin bir fark izlenmedi (p=0638). Benzer şekilde her iki cerrahinin postoperatif kısa ve orta dönem kas gücü sonuçları açısından birbirlerine üstünlüğü saptanmadı (p=0,946). (Tablo 13)

Tablo 13: Postoperatif kas gücünün cerrahi yöntemlere göre değişimi

	Skor	PSK	VKF	Toplam	p
Kas Gücü	15	10 28,6%	3 30,0%	13 28,9%	0,946
	25	25 71,4%	7 70,0%	32 71,1%	
Toplam		35	10	45	

El bilek skoru PSK uygulanan hastalarda ortalama 82,57(\pm 9,1) iken VKF uygulananlarda bu değer 81(\pm 9,37) olarak belirlendi. Uygulanan farklı cerrahiyöntemlerinpostoperatif klinik sonuçları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,657$).

Cerrahiden sonra geçen süre ile Mayo skorundaki değişim Tablo 14’ de özetlendi. Ağrı, memnuniyet, kas gücü ve toplam skor ile cerrahi sonrası geçen süre arasında istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlara ulaşılamadı. Fakathastaların el bilek hareket arkının; postoperatif süreçte zamanla daha iyiye gittiği konusunda istatistiksel açıdan anlamlıdeğerler elde edildi ($p < 0,05$).

Tablo 14: Cerrahiden sonra geçen süre ile Mayo skoru arasındaki ilişki

	Ağrı	Memnuniyet	Hareket Arkı	Kas Gücü	Toplam Skor	Süre (ay)	
Ağrı	r	1,00	0,57	-0,03	0,11	0,53	-0,22
	p		0,00	0,86	0,47	0,00	0,14
Memnuniyet	r		1,00	0,21	0,03	0,59	0,04
	p			0,18	0,87	0,00	0,81
Hareket Arkı	r			0,30	0,60	0,31	
	p			0,05	0,00	0,04	
Kas Gücü	r				0,72	0,24	
	p				0,00	0,11	
Toplam Skor	r					0,20	
	p					0,19	

Tablo 15: Hasta grubu spektrofotometri ölçümleri

Hasta No	Konsantrasyon(ng/μl)	A ⁰ 260/280	Hasta No	Konsantrasyon(ng/μl)	A ⁰ 260/280
H1	16,2	2,04	H24	20,3	1,92
H2	17,4	2,09	H25	28,5	1,91
H3	24,3	1,88	H26	17,8	1,89
H4	18,9	2,06	H27	15,6	1,93
H5	26,6	1,98	H28	22,0	2,11
H6	44,9	1,97	H29	21,1	1,82
H7	34,1	2,04	H30	21,0	1,85
H8	27,5	2,03	H31	23,9	1,82
H9	25,1	2,00	H32	26,4	2,00
H10	27,9	1,99	H33	30,1	1,97
H11	11,7	1,94	H34	27,4	1,87
H12	31,5	1,88	H35	75,0	2,00
H13	36,8	1,81	H36	30,2	1,98
H14	27,1	1,8	H37	13,3	2,01
H15	21,1	1,87	H38	14,3	1,99
H16	32,6	1,84	H39	16,4	2,02
H17	23,0	1,84	H40	22,4	2,00
H18	21,0	1,88	H41	32,6	1,84
H19	26,7	1,83	H42	23,0	1,84
H20	14,5	1,81	H43	20,1	1,83
H21	13,4	1,96	H44	30,2	1,98
H22	15,6	1,82	H45	16,8	2,08
H23	15,2	1,82			

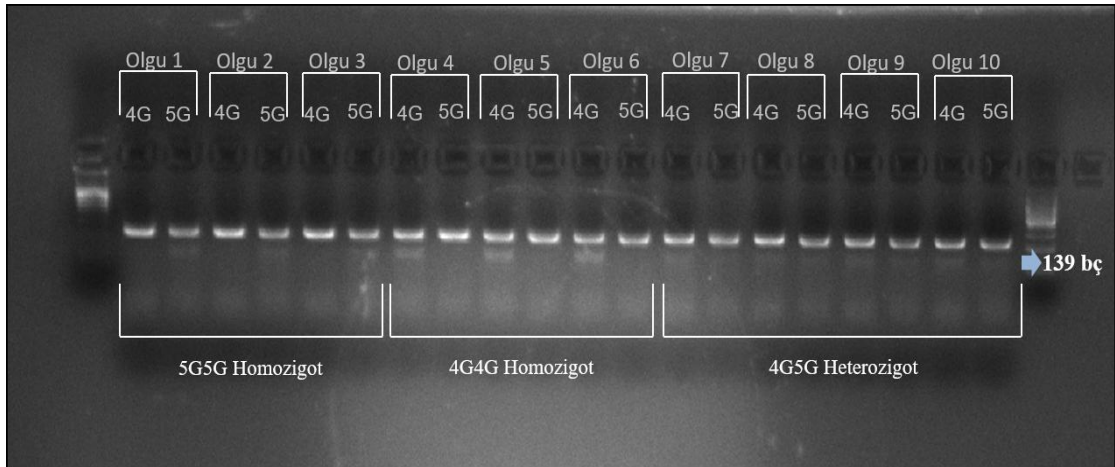
Tablo 16: Kontrol grubu spektrofotometri ölçümleri

Kontrol No	Konsantrasyon (ng/µl)	A ⁰ 260/280	Kontrol No	Konsantrasyon (ng/µl)	A ⁰ 260/280
K1	20,1	2,08	K24	27,8	2,1
K2	28,0	1,98	K25	20,9	1,96
K3	22,8	2,02	K26	15,7	2,08
K4	22,2	1,98	K27	14,9	1,95
K5	21,3	1,89	K28	27,3	2,03
K6	35,2	1,97	K29	25,8	2,08
K7	20,5	1,88	K30	13,2	2,00
K8	16,4	2,03	K31	31,5	1,86
K9	25,6	2,02	K32	21,1	2,01
K10	30,3	2,00	K33	14,1	2,08
K11	15,5	1,98	K34	22,9	1,92
K12	31,7	1,88	K35	34,5	2,00
K13	25,4	1,91	K36	29,4	1,98
K14	18,8	1,99	K37	13,9	2,08
K15	21,9	2,06	K38	15,4	1,93
K16	36,2	1,90	K39	58,4	1,94
K17	23,9	1,88	K40	22,8	1,91
K18	37,7	1,87	K41	35,4	2,02
K19	27,4	1,93	K42	23,8	1,89
K20	15,2	2,03	K43	27,1	1,94
K21	12,8	1,96	K44	36,2	1,97
K22	22,5	2,02	K45	21,4	2,01
K23	12,6	2,09			

PAI-1 Geni Allel Spesifik PCR Analizi Sonuçları

Hem hasta hem kontrol grubundaki olgularda uygulanan allel spesifik PCR sonucunda; 5G primeri ile 139 bç bant verip 4G primeri ile 139 bç bant vermeyen örnekler 5G5G homozigot genotipli, 4G primeri ile PCR sonucu 139 bç bant verip 5G primeri ile PCR sonucu 139 bç bant vermeyen örnekler 4G4G homozigot genotipli, her ikisinde de 139 bç bant verenler ise 4G5G heterozigot genotipli olarak değerlendirildi.

Buna göre Şekil 13' te gösterildiği gibi olgu 1, 2, 3' te 5G5G homozigot genotipi, olgu 4, 5, 6' da 4G4G homozigot genotipi, olgu 7, 8, 9 ve 10' da ise 4G5G heterozigot genotipi belirlenmiştir.



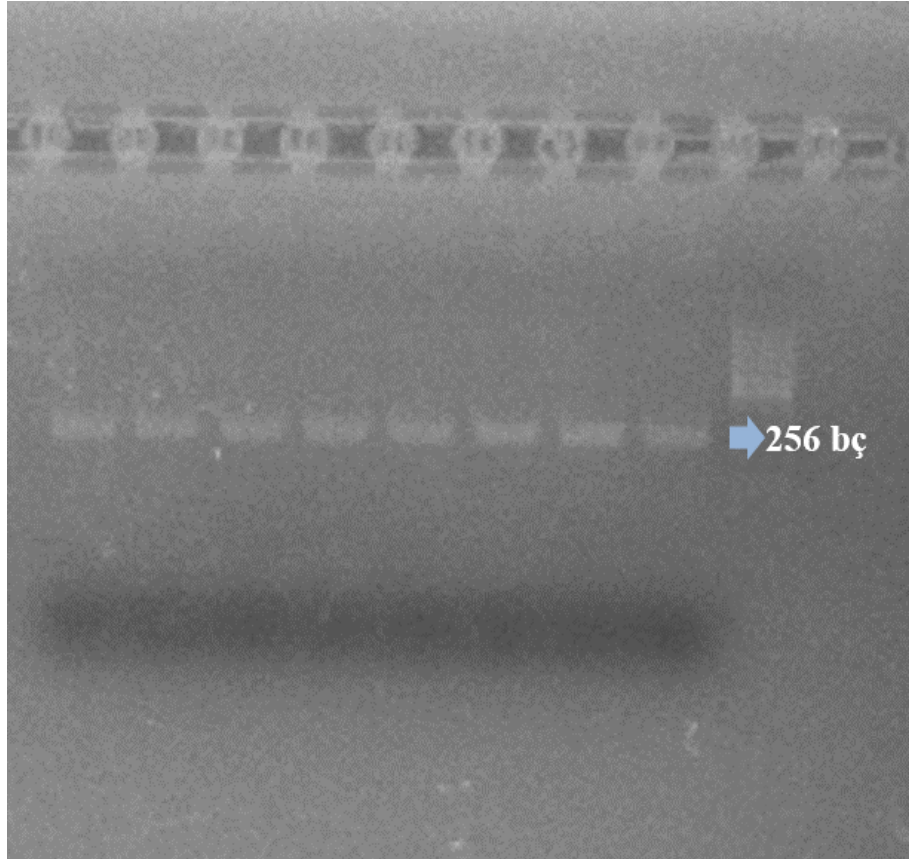
Şekil 13: PAI-1 4G5G allel spesifik PCR ürünlerinin %2 agaroz jel görüntüleri

PAI-1 Geni Dizi Analizi Sonuçları

PAI-1 geni 4G/5G polimorfizminin yer aldığı bölgeye özgün primerler kullanılarak hedef dizi çoğaltılmış olup yapılan PCR sonucunda 256 baz çifti büyüklüğünde spesifik reaksiyon ürünü elde edilmiştir. (Şekil14, 15)

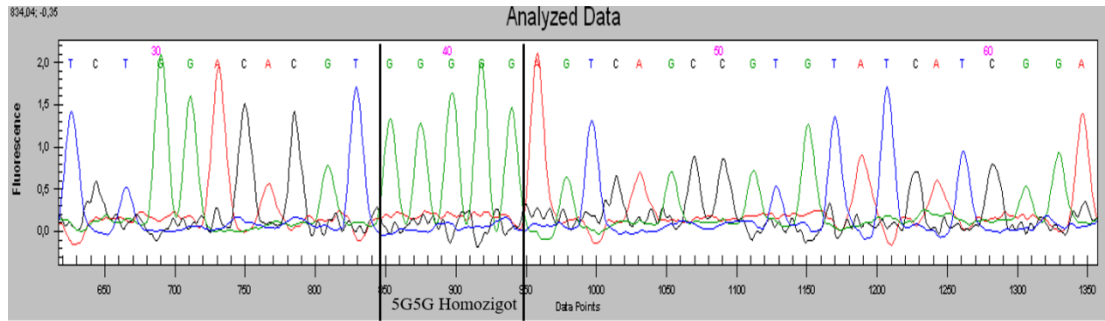
```
TGAATTGACACTCTGTTTCTATCCCTTTTCCCCTTGTGTCTGTGTCTGGAGGAAGAGGAT
AAAGGACAAGCTGCCCCAAGTCCTAGCGGGCAGCTCGAAGAAGTGAACCTTACACGTTGG
TCTCCTGTTTCTTACC AAGCTTTTACCATGGTAACCCCTGGT CCCGTTTCAGCCACCACC
ACCCACCCAGCACACCTCCAACCTCAGCCAGACAAGGTTGTTGACACAAGAGAGCCCTC
AGGGGCACAGAGAGAGTCTGGACACGT GGGGAGTCAGCCGTGTATCATCGGAGGCGGCCG
GGCACATGGCAGGGATGAGGGAAAGACCAAGAGTCTCTGTTGGGCCCAAGTCCTAGACA
GACAAAAC CTAGACAATCACGTGGCTGGCTGCA TGCCCTGTGGCTGTTGGGCTGGGCCCA
GGAGGAGGGAGGGGCGCTCTTTCCTGGAGGTGGTCCAGAGCACCGGGTGGACAGCCCTGG
GGGAAAACCTCCACGTTTTGATGGAGGTTATCTTTGATAACTCCACAGTGACCTGGTTCG
```

Şekil 14:PAI-1 geni promotor bölgesine ait hedef dizi, kullanılan primerler (mavi alan) ve polimorfik bölge (sarı alan)

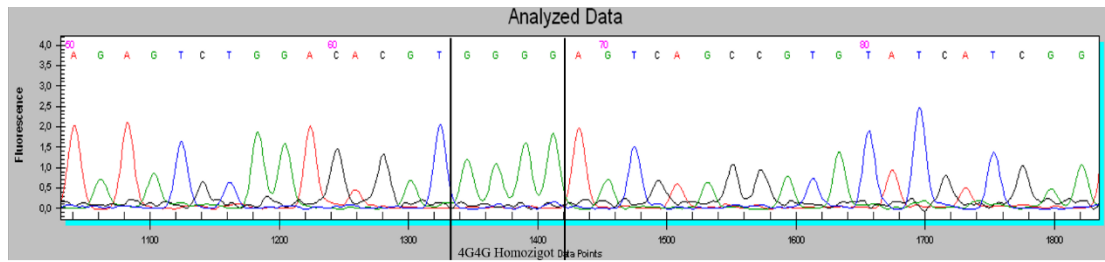


Şekil 15: PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmini içeren bölgeye ait PCR ürününün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

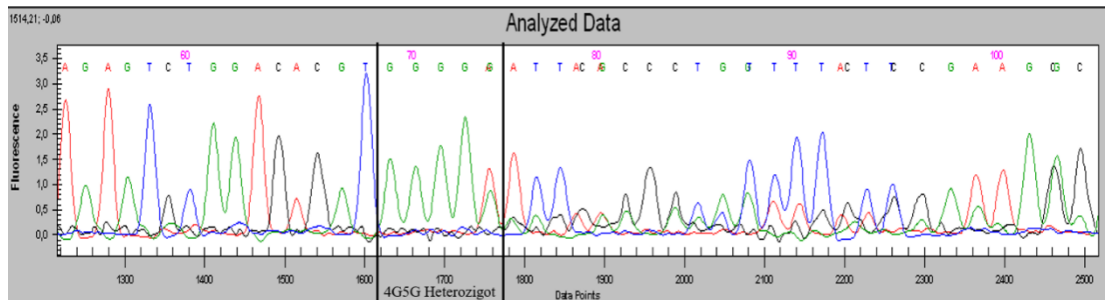
PCR ürünlerine saflaştırma protokolü uygulandıktan sonra okuma programı seçilerek dizi analizi işlemi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucuna göre 5G5G genotipi saptanan bir hastanın sonucu Şekil 16’da, 4G4G genotipi saptanan hastanın sonucu Şekil 17’de ve 4G5G genotipi saptanan hastanın sonucu Şekil 18’de gösterilmiştir.



Şekil 16: PAI-1 geni 5G5G genotipini gösteren dizi analizi sonucu (forward dizi)



Şekil 17: PAI-1 geni 4G4G genotipini gösteren dizi analizi sonucu (forward dizi)



Şekil 18: PAI-1 geni 4G5G genotipini gösteren dizi analizi sonucu (forward dizi)

Tablo 17: Hasta ve kontrol grubunun genotip özellikleri

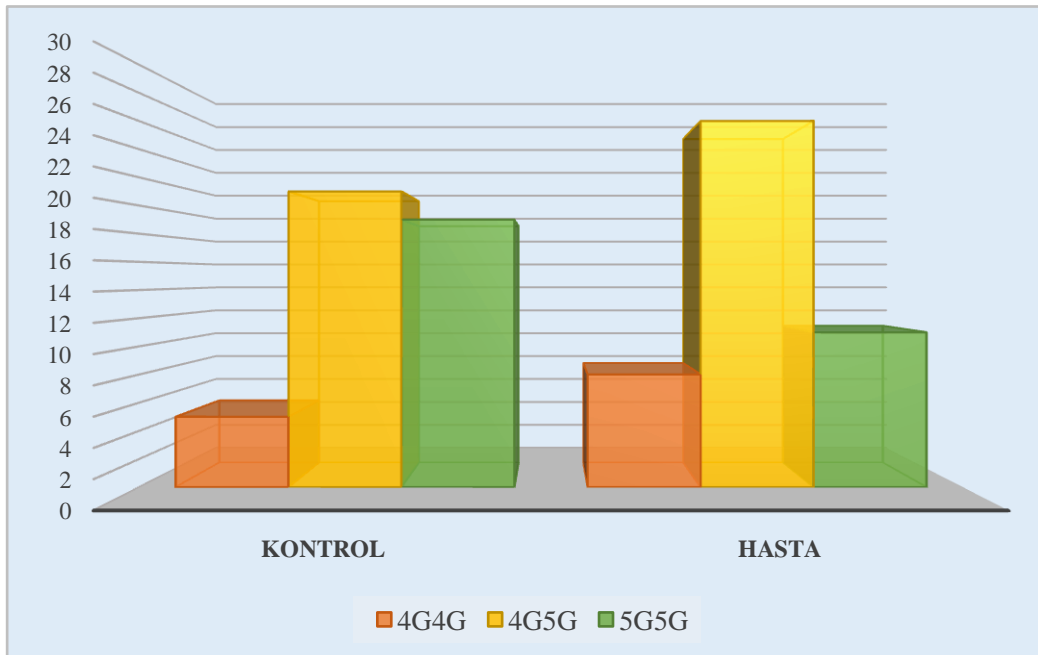
Hasta	Genotip	Hasta	Genotip	Kontrol	Genotip	Kontrol	Genotip
H1	4G4G	H24	4G5G	K1	5G5G	K24	4G5G
H2	5G5G	H25	4G4G	K2	5G5G	K25	5G5G
H3	4G5G	H26	4G5G	K3	4G5G	K26	4G5G
H4	4G4G	H27	4G5G	K4	4G4G	K27	5G5G
H5	4G5G	H28	4G4G	K5	5G5G	K28	4G5G
H6	5G5G	H29	4G5G	K6	5G5G	K29	4G5G
H7	5G5G	H30	4G5G	K7	5G5G	K30	4G5G
H8	4G5G	H31	4G5G	K8	4G5G	K31	4G5G
H9	4G4G	H32	4G4G	K9	4G5G	K32	5G5G
H10	4G5G	H33	4G5G	K10	4G4G	K33	4G5G
H11	4G5G	H34	4G5G	K11	4G5G	K34	5G5G
H12	4G5G	H35	5G5G	K12	4G5G	K35	5G5G
H13	4G4G	H36	4G5G	K13	4G5G	K36	4G5G
H14	5G5G	H37	4G5G	K14	5G5G	K37	4G4G
H15	4G5G	H38	4G5G	K15	5G5G	K38	4G5G
H16	4G5G	H39	5G5G	K16	4G5G	K39	5G5G
H17	5G5G	H40	4G5G	K17	5G5G	K40	4G5G
H18	4G5G	H41	4G4G	K18	4G5G	K41	5G5G
H19	4G5G	H42	5G5G	K19	4G5G	K42	5G5G
H20	4G5G	H43	4G5G	K20	4G4G	K43	4G5G
H21	4G5G	H44	5G5G	K21	4G5G	K44	5G5G
H22	5G5G	H45	4G5G	K22	5G5G	K45	4G4G
H23	5G5G			K23	5G5G		

Hasta ve kontrol grupları PAI-1 4G/5G polimorfizmi sonuçları Tablo17’ de gösterildi ve gruplar arası genotip dağılımı Tablo 18ve Şekil 13’ de özetlendi. Hastaların 17,8%’ i 4G4G, 57,8%’ i 4G5G, 24,4%’ i ise 5G5G genotipe sahipti. Kontrol grubunda bu oranlar sırası ile 4G4G, 4G5G, 5G5G için; 11,1%, 46,7%, 42,2% olarak belirlendi. Çalışma grubuna genel olarak bakıldığında 4G5G heterozigot genotipin tüm bireylerin %52,2’ sini oluşturduğu görüldü.

Yapılan analizde; genotip dağılımı ile lüna osteonekrozu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,187). Ancak kontrol grubunda, hasta grubuna oranla 1,7 kat daha yüksek 5G5G genotipi tespit edildi. Ayrıca 4G homozigot genotip hasta grubunda 1,6 kat daha yüksekti.

Tablo 18: Olgu ve kontrol gruplarının genotip dağılımı

Genotip	Hasta	Kontrol	Total	p
4G4G	8(17,8%)	5(11,1%)	13(14,4%)	
4G5G	26(57,8%)	21(46,7%)	47(52,2%)	0,187
5G5G	11(24,4%)	19(42,2%)	30(33,3%)	
Total	45	45	90(100%)	



Şekil 19: Genotip dağılım grafisi

Genotip dağılımı aynı zamanda allel bazında da incelendi. İstatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen 4G alleleline sahip olan kişilerde (4G4G / 4G5G)Keinböck hastalığı görülme riski 5G alleleline sahip olan kişilere (4G5G / 5G5G) göre 2,26 kat daha fazla olduğu sonucuna varıldı (OR=2,259; %95CI [0,917 - 5,562]; p=0,076).

Hasta ve kontrol grubu genotip dağılımı bakımından ayrıca 4G4G+4G5G ile 5G5G arasında değerlendirildi (Tablo 19). İstatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç elde edilmedi (p=0,074).

Tablo 19: Genotip analizi (4G4G+4G5G ile 5G5G arasında)

Polimorfizm	Hasta	Kontrol	Toplam	p
4G4G + 4G5G	34	26	60	0,074
	75,6%	57,8%	66,7%	
5G5G	11	19	30	
	24,4%	42,2%	33,3%	

TARTIŞMA

Lunatum avasküler nekrozu ilerleyici bir durum olup el bileğinde zaman içinde dejeneratif artrite yol açarak iş gücü kaybı ile sonuçlanan bir rahatsızlıktır. Geçmişten günümüze hastalığa yönelik birçok etiyolojik çalışma yapılmış ve çeşitli medikal ve cerrahi tedaviler tanımlanmıştır. Cerrahi tedavinin amacı erken evrelerde hastalığın ilerleyici doğasını durdurmak veya yavaşlatmak, ileri evrelerde el bileği artritinin neden olduğu azalmış eklem hareket açıklığını tekrar sağlamak ve mevcut ağrıları geçirerek ekstremiteye tekrar fonksiyon kazandırmaktır. Bunu sağlamak için uygun hastalara kısaltma osteotomileri, vaskülerize kemik flebi uygulama, proksimal sıra karpektomisi, total el bileği artrodezi gibi teknikler uygulanabilir.

Mekanik olarak lunatumun üzerindeki yükün azaltılması, çökme ve hastalığın ilerlemesinin engellenmesi amacıyla eklem yüzeylerini dengeleyici yöntemler tercih edilebilir. Eklem yüzeylerinin dengelenmesi için nötral ya da +1 mm ulnar varyans oluşturulmaya çalışılır. Negatif ulnar varyansın düzeltilmesi işlemi ulnanın uzatılması ya da radiusun kısaltılması yoluyla yapılır. Eklem yüzeylerinin dengelenmesi için en sık uygulanan yöntem radial kısaltmadır ve Litchman evre II, IIIA ve IIIB'de kullanılabilir. Bu tekniğin avantajları eklem dışı, uygulanması kolay ve etkili bir yöntem olmasıdır. Nakamura ve ark.(54) yaptıkları çalışmada Kienböck hastalığının tüm aşamalarında radial kısaltma yönteminin kullanılabilmesini ancak 4 mm üzerindeki kısaltmalarda ulnar taraf el bilek ağrılarının ortaya çıkabileceğini bildirmişlerdir. Trumble ve ark.(55) yaptıkları çalışmada 2 mm radial kısaltma yapıldığında büyük oranda lunatum üzerindeki yükün azaldığını 4 mm üzerindeki kısaltmaların ise dekompresyon etkisinin kalmadığını bildirmişlerdir. Evre IIIB'de radial kısaltma tekniğinin uygulanımı tartışmalıdır. Condit ve ark.(56) çalışmalarında bir grup hastada sonuçların tatminkar olmadığını bildirmişlerse de, diğer birçok çalışmada bu evrede de iyi sonuçlar elde edilmiştir(26, 57, 58).

Proksimal sıra karpektomisi genellikle Litchman evre IIIB ve IV'de tercih edilen bir yöntemdir. En önemli dezavantajı tendonların uzamasına bağlı olarak gelişen kavrama gücü kaybıdır ancak yapılan çalışmalarda uzun dönem takiplerde kavrama gücünün zamanla arttığı gösterilmiştir. Tüm bu belirtilen sorunlara rağmen,

ameliyat sonrası el bilek hareket genişliğinde artma ve yeterli kavrama gücü sağlayan sonuçları ile yüz güldürücü bir yöntemdir. Buluç ve ark.(59) Litchman evre III Keinböck tanısıyla PSK uygulanan ve 18 aydan uzun süre takibi olan 24 hastanın postoperatif klinik değerlendirmesinde Mayo skorunu ortalama 67,3 olarak belirlemiştir. Başka bir çalışmada Mir H. Ali ve ark.(30) PSK uygulanan 61 hastanın ortalama 19,8 yıllık takip ile değerlendirmeye alarak Mayo el bilek skorunu ortalama 61,8 olarak kaydetmiştir. Bizim çalışmamızda PSK ve VKF uygulanmış, postoperatif ortalama 2,6 yıl takipli 45 Keinböck hastasının klinik değerlendirmesinde Mayo skoru ortalama 82,2 olarak bulundu ve uygulanan iki cerrahi yöntem arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı. Postoperatif memnuniyetteki bu artışın; değerlendirme süresinin kısalığı ve postoperatif etkin el bileği rehabilitasyonu ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Avasküler nekroz etiyojisine yönelik yapılan bazı çalışmalarda femur başı osteonekrozu olan hastalar sigara kullanımı açısından değerlendirilmiş ve aktif sigara içicilerinde femur başı osteonekrozu için artmış risk saptanmıştır(60, 61). Ancak biz çalışmamızda lunatum osteonekrozu için sigara kullanımının riski arttırmadığı sonucuna ulaştık (p=0,389).

Günümüze kadar PAI-1 4G/5G polimorfizmi çeşitli hastalıkların etiyojisinde tartışılmış ve bazılarında sorumlu tutulmuş olmasına rağmen Keinböck hastalığı açısından daha önce araştırılmamıştır. Literatürdeki pek çok çalışma Keinböck hastalığının multifaktöryel bir hastalık olduğunu öne sürmekte ve tekrarlayan mikrotravmalar, perilunat kırıklı çıkıklar, negatif ulnar varyans, pıhtılaşma bozuklukları, azalmış arteriyel akım, artmış venöz basınç gibi risk faktörlerinin neden olduğu düşünülmektedir. Tüm bu faktörler sonucunda artmış kemik içi basıncın neden olduğu ilerleyici osteonekroz gelişmektedir. Bununla birlikte intravasküler koagülasyon nedeniyle kemik kan desteğinin kesintiye uğraması avasküler nekroz patogenezinde öne sürülen bir diğer etmen olarak kabul görmektedir. Çalışmamızda literatürde ilk kez lunat kemik avasküler nekrozlu olgularda PAI-1 4G/5G polimorfizmi değerlendirilmiştir ve lunat kemik avasküler nekrozun etiyojik riskine yönelik yaptığımız bu çalışmanın literatürde örneği olmaması tartışmayı kısıtlamaktadır. Ancak femur başı osteonekrozu ile benzer patolojik temeller

göstermesi nedeniyle çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular femur başı osteonekroz çalışmaları ile karşılaştırılmıştır.

Femur başı avasküler nekroza yönelik yapılan çalışmalarda hastalarda yüksek prevalansta koagülasyon bozuklukları rapor edilmiş ve PAI-1 4G/5G polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir(62, 63).Glueck ve ark. 2001 yılında; 95 femur başı osteonekrozlu hasta, 234 sağlıklı kontrol ile yaptığı çalışmada PAI-1 4G homozigot genotipini femur başı avasküler nekrozlu hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulmuştur. Olgu grubunda 95 hastanın 36' sı 4G4G, 44'ü 4G5G, 15'i ise 5G5G genotipinde iken 234 kişilik sağlıklı kontrol grubunda bu dağılım 4G4G için 47, 4G5G için 103, 5G5G için ise 84 olarak belirlenmiştir (p=0,001). Bu çalışmada hasta ve kontrol grubundaki bu genotip dağılımının istatistiksel incelemesinde PAI-1 geninin femur başı avasküler nekrozlu hastalarda 4G homozigot yönüne kaydığı sonucuna ulaşılmıştır(62). Benzer şekilde Ferrari ve ark.(64) kortikosteroid tedavisi uygulanan 26 renal transplantlı femoral osteonekroz hastası ve 326 sağlıklı birey ile yaptığı çalışmada kontrol grubunda; 67(%20.6) 4G4G, 166(%50.9) 4G5G ve 93(%28.5) 5G5G olarak kaydetmiş. Hasta grubunda ise bu oranları 16(%24.5) 4G4G, 8(%51.1) 4G5G ve2(%24.4) 5G5G olarak tespit etmiş ve karşılaştırmalı analizinde kontrol grubunda hasta grubuna oranla daha az 4G alleli olduğunu tespit etmiş (p<0,001). Her iki çalışmada da bizim çalışmamızda olduğu gibi; çalışmaya dahil edilen bireylerin yaş, cinsiyet ve beden kitle indeksi (BKİ) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir risk tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda genotip dağılımı ile lunat osteonekrozu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0,187).Kontrol grubunda, hasta grubuna oranla 1,7 kat daha yüksek 5G5G genotipi tespit edilmiştir. Ayrıca 4G homozigot genotip hasta grubunda 1,6 kat daha yüksektir. Bu nedenle her ne kadar istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilemese de;PAI-1 4G4G polimorfizminin Keinböck hastalığı açısından genetik risk oluşturabileceğini düşündürmektedir. Toplum genelinde bu polimorfizmlerin dağılımını belirlemek amacıyla farklı bölgelerde ve daha geniş olgu grupları ile yapılacak çok merkezli çalışmalar yararlı olacaktır.

Femur başı avasküler nekrozu ile PAI-1 4G/5G polimorfizmi arasındaki ilişkiyi aydınlatmak üzere yapılan çalışmalardan derlenen bir meta-analizde beş farklı

merkezden alınan sonuçlar derlenmiş ve analiz edilmiş. Çalışmaya, femur başı osteonekrozlu 419 hasta ve 969 sağlıklı kontroldahil edilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmış. Hasta grubunda 4G4G (%41,2)+4G5G (%42,9) genotipli hastaların 5G5G (%15,7) genotipli hastalardan anlamlı oranda fazla olduğu gözlenmiş ve 4G alleli taşıyan bireylerin 5G homozigot bireylere göre femur başı osteonekrozu açısından daha fazla risk taşıdığı sonucuna ulaşılmış ($p=0,001$). Ancak allel bazında yapılan 4G - 5G analizinde ($p=0,109$) anlamlı üstünlük saptanamamış(6). Bizim çalışmamızda; 4G alleleline ve 5G alleleline sahip bireyler karşılaştırıldığında istatistiksel bir anlam elde edilmemesine rağmen 4G alleleline sahip (homozigot veya heterozigot) bireylerin 5G homozigot bireylere göre; Lunatum avasküler nekrozu açısından 2,26 kat daha yüksek riske sahip olduğu tespit edildi (OR=2,259; %95CI [0,917 - 5,562]; $p=0,076$). Bununla birlikte yapılan 4G4G+4G5G / 5G5G karşılaştırma analizinde istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç bulunmadı ($p=0,074$)

PAI-1 proteini; doku tipi plazminojen aktivatörünü (t-PA) bağlayarak etkisini inhibe eden ve bu yolla fibrin yıkımını azaltan etkili bir inhibitördür. Bu protein insan genomunun -675. baz çifti lokusunda PAI-1 gen bölgesinden sentezlenir ve bu bölgedeki 4G/5G polimorfizmine bağlı olarak fibrinolitik sistem üzerine değişik oranlarda etki eder. Gendeki bu polimorfizm; derin ven trombozu, koroner arter hastalıkları, astım, tekrarlayan gebelik kayıpları, preeklampsi gibi rahatsızlıklara yol açabildiği gibi lunatum, femur başı gibi damar desteği kısıtlı kemiklerde osteonekroza da neden olabilir(65-67). Fakat fibrinolitik sistem üzerine etki ederek koagülasyona neden olan tek faktör PAI değildir. Faktör V Leiden mutasyonu, homosisteinemi, metilentetrahidrofolat redüktaz eksikliği, Faktör C - S eksikliği veya antikardiyolipin antikor yüksekliği gibi durumlar da benzer mekanizmalarla bu tür hastalıklara neden olabilmektedir. Günümüzdeki bilgiler ışığında uygun antikoagülasyon tedavileri ile bu tür hastalıkların ilerlemesi yavaşlatabilmekte veya engellenebilmektedir(68, 69). Bu nedenle osteonekroz etiyolojisini ve patognomisini aydınlatmaya yönelik yapılacak benzer çalışmaların, avasküler nekroz tedavi protokollerine anlamlı katkıları olabileceği düşünülmektedir.

Buvaka – kontrol çalışmasına; Denizli ili ve çevresindeki hasta ve sağlıklı bireyler dahil edildi. Keinböck hastalığının genel insidansının düşük olması ve

çalışmaya genel popülasyonun dahil edilememesi;çalışmayı kısıtlayan nedenler arasındadır.

Çalışma sonuçlarımıza göre PAI-1 4G/5G polimorfizmi ile lunatum avasküler nekrozu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilmemesine rağmen; 5G homozigot genotipin sağlıklı grubunda, 4G homozigot bireylerin ise hastagrubunda yoğunlaşmış olduğu, 4G5G genotipi ise her iki grupta en fazla genotip şekli olduğu görüldü. Hasta sayısındaki kısıtlılık çalışmayı sınırlayan bir nedendir. Bu sebeple olgu ve kontrol grubunun geniş tutulduğu çok merkezli yeni çalışmalarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya çıkabilir.

SONUÇLAR

- Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,293$; $p=0,290$).
- 45 non-travmatik Keinböck hastasına uygulanan PSK ve VKF cerrahilerinin postoperatif kısa dönem (ortalama 32 ay) klinik sonuçları Mayo el bilek skorlaması ile değerlendirildi ve sonuç skoru PSK için ortalama 82,5; VKF için ortalama 81 olarak belirlendi. Her iki cerrahi açısından postoperatif klinik değerlendirmede istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,657$).
- Genotip dağılımı ile lunat osteonekrozu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0,187$). Ancak kontrol grubunda, hasta grubuna oranla 1,7 kat daha yüksek 5G5G genotipi tespit edildi. Ayrıca 4G homozigot genotip hasta grubunda 1,6 kat daha yüksekti. Bu farklılık PAI-1 ile yapılan diğer araştırmalarla beraber düşünüldüğünde; PAI-1 4G/5G polimorfizminin Keinböck hastalığı ile ilişkili olabileceği konusunda halen akılda soru işaretleri bırakmaktadır.
- PAI-1 4G/5G polimorfizminin Lunatum osteonekrozuna etkisini araştırdığımız analizlerde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmese de 4G alleleline sahip bireylerin 2,26 kat daha yüksek riske sahip olduğu tespit edildi [OR=2,259; %95CI (0,917 - 5,562); $p=0,076$].
- Tüm veriler göz önüne alındığında ve literatürdeki ilişkili diğer araştırmalar incelendiğinde PAI-1 4G/5G polimorfizmi ile osteonekrozlar arasında anlamlı bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.
- Gelecekte; daha geniş araştırma grupları ile yapılacak çok merkezli çalışmalarla, bu polimorfizmin toplum bazındaki dağılımı ve Keinböck hastalığı arasındaki ilişkisi konusunda daha fazla fikir sahibi olabiliriz.

KAYNAKLAR

1. Özcanlı H, Yeter AB. Kienböck hastalığı. TOTBİD Dergisi. 2010;9(1):35-40.
2. Fontaine C. Kienböck's disease. Chirurgie de la main. 2015;34(1):4-17.
3. Gelberman RH, Bauman TD, Menon J, Akeson WH. The vascularity of the lunate bone and Kienböck's disease. The Journal of hand surgery. 1980;5(3):272-8.
4. Freedman DM, Botte MJ, Gelberman RH. Vascularity of the Carpus. Clinical orthopaedics and related research. 2001;383:47-59.
5. Zeng Z, Wang B, Pan H. Relation between osteonecrosis of the femoral head and PAI-1 4G/5G gene polymorphism: a meta-analysis. International journal of clinical and experimental medicine. 2015;8(11):20337.
6. Liang X-N, Xie L. Association between PAI-1 4G/5G Polymorphisms and osteonecrosis of femoral head: A Meta-analysis. Thrombosis research. 2013;132(2):158-63.
7. Arıncı K, Elhan A. Anatomi, Cilt 1, Ankara : Öncü Basımevi 2006.
8. JMA Z. Malacia del semilunar. Universidad de Valladolid. 1966(Doctoral thesis).
9. Linscheid RL. Kinematic considerations of the wrist. Clinical orthopaedics and related research. 1986;202:27-39.
10. Volz RG, Lieb M, Benjamin J. Biomechanics of the wrist. Clin Orthop Relat Res. 1980(149):112-7.
11. McRae. Klinik ortopedik muayene. Ankara: Günes Kitabevi. 2004:77-93.

- 12.Owers K, Scougall P, Dabirrahmani D, Wernecke G, Jhamb A, Walsh W. Lunate trabecular structure: a cadaveric radiograph study of risk factors for Kienböck's disease. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*. 2010;35(2):120-4.
- 13.Wagner JP, Chung KC. A historical report on Robert Kienböck (1871–1953) and Kienböck's disease. *The Journal of hand surgery*. 2005;30(6):1117-21.
- 14.Luo J, Diao E. Kienbock's disease: an approach to treatment. *Hand Clin*. 2006;22(4):465-73; abstract vi.
- 15.van Leeuwen WF, Janssen SJ, Ter Meulen DP, Ring D. What Is the Radiographic Prevalence of Incidental Kienbock Disease? *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474(3):808-13.
- 16.Alexander AH, Lichtman DM. Kienbock's disease. *Orthop Clin North Am*. 1986;17(3):461-72.
- 17.Thienpont E, Mulier T, Rega F, De Smet L. Radiographic analysis of anatomical risk factors for Kienbock's disease. *Acta orthopaedica belgica*. 2004;70(5):406-9.
- 18.van Leeuwen WF, Oflazoglu K, Menendez ME, Ring D. Negative Ulnar Variance and Kienbock Disease. *J Hand Surg Am*. 2016;41(2):214-8.
- 19.Gelberman RH, Salamon PB, Jurist JM, Posch JL. Ulnar variance in Kienbock's disease. *J Bone Joint Surg Am*. 1975;57(5):674-6.
- 20.Niwa T, Uchiyama S, Yamazaki H, Kasashima T, Tsuchikane A, Kato H. Closed tendon rupture as a result of Kienbock disease. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2010;44(1):59-63.
- 21.Bonzar M, Firrell JC, Hainer M, Mah ET, McCabe SJ. Kienbock disease and negative ulnar variance. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(8):1154-7.

22. Palmer AK, Werner FW. Biomechanics of the distal radioulnar joint. *Clinical orthopaedics and related research*. 1984;187:26-35.
23. Jafari D, Shariatzadeh H, Mazhar FN, Ghahremani MH, Jalili A. Radial inclination and palmar tilt as risk factors for Kienbock's disease. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2012;41(11):E145-6.
24. D'Agostino C, Romeo P, Amelio E, Sansone V. Effectiveness of ESWT in the treatment of Kienböck's disease. *Ultrasound in medicine & biology*. 2011;37(9):1452-6.
25. Nakamura R, Horii E, Imaeda T. Excessive radial shortening in Kienböck's disease. *The Journal of Hand Surgery: British & European Volume*. 1990;15(1):46-8.
26. Iwasaki N, Minami A, Oizumi N, Suenaga N, Kato H, Minami M. Radial osteotomy for late-stage Kienböck's disease. *Bone & Joint Journal*. 2002;84(5):673-7.
27. Moritomo H, Murase T, Yoshikawa H. Operative technique of a new decompression procedure for Kienböck disease: partial capitate shortening. *Techniques in hand & upper extremity surgery*. 2004;8(2):110-5.
28. Lichtman DM, Degnan GG. Staging and its use in the determination of treatment modalities for Kienbock's disease. *Hand Clin*. 1993;9(3):409-16.
29. Chim H, Moran SL. Long-term outcomes of proximal row carpectomy: a systematic review of the literature. *J Wrist Surg*. 2012;1(2):141-8.
30. Ali MH, Rizzo M, Shin AY, Moran SL. Long-term outcomes of proximal row carpectomy: a minimum of 15-year follow-up. *Hand (N Y)*. 2012;7(1):72-8.

31. Innes L, Strauch RJ. Systematic review of the treatment of Kienböck's disease in its early and late stages. *The Journal of hand surgery*. 2010;35(5):713-7. e4.
32. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen Activator Inhibitor,; *Blood*; 1987. 381- 7 p.
33. Irigoyen JP. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 1999;56(1-2):104-32.
34. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2000;342(24):1792-801.
35. Samad F. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(1):37.
36. Strandberg L, Lawrence D. The organization of the human-plasminogen-activator-inhibitor-1 gene. *European Journal of Biochemistry*. 1988;176(3):609-16.
37. Crandall DL, Quinet EM. Synthesis and secretion of plasminogen activator inhibitor-1 by human preadipocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(9):3222-7.
38. Taberner MD, Estelles A, Vicente V, Alberca I, Aznar J. Incidence of increased plasminogen activator inhibitor in patients with deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism. *Thromb Res*. 1989;56(4):565-70.
39. Paramo JA, Alfaro M, Rocha E. Postoperative changes in the plasmatic levels of tissue-type plasminogen activator and its fast-acting inhibitor--relationship to deep vein thrombosis and influence of prophylaxis. 1985.

- 40.Lang IM, Moser KM, Schleef RR. Elevated expression of urokinase-like plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 during the vascular remodeling associated with pulmonary thromboembolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18(5):808-15.
- 41.Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *Circulation*. 1996;94(9):2057-63.
- 42.Thögersen AM, Jansson J-H, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women Evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*. 1998;98(21):2241-7.
- 43.Huber K, Rosc D, Resch I, Schuster E, Glogar D, Kaindl F, et al. Circadian fluctuations of plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma of patients with unstable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis*. 1988;60(3):372-6.
- 44.Anvari A, Schuster E, Gottsauner-Wolf M, Wojta J, Huber K. PAI-I 4G/5G polymorphism and sudden cardiac death in patients with coronary artery disease. *Thrombosis research*. 2001;103(2):103-7.
- 45.Dawson S, Wiman B. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(15):10739-45.
- 46.Eriksson P, Kallin B. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(6):1851-5.

47. Ter Bogt N, Hoekstra T. The 4G-allele of the PAI-1 gene is not consistently associated with a higher prevalence of coronary stenosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004;2(9):1668-70.
48. Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Ueshima K, Hirata T, et al. Relationship between postrenal transplant osteonecrosis of the femoral head and gene polymorphisms related to the coagulation and fibrinolytic systems in Japanese subjects. *Transplantation*. 2004;77(2):220-5.
49. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC medical genomics*. 2015;8(1):1.
50. Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, Mohan G, Chaturvedi S, Singh K. Decreased expression of heat shock proteins may lead to compromised wound healing in type 2 diabetes mellitus patients. *Journal of diabetes and its complications*. 2015;29(4):578-88.
51. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Tunçbilek E. *Thompson & Thompson tıbbi genetik: Güneş Kitabevi*; 2005.
52. Zhang K, Calabrese P, Nordborg M, Sun F. Haplotype block structure and its applications to association studies: power and study designs. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;71(6):1386-94.
53. Thada S, Valluri V, Gaddam S. Influence of Toll-Like Receptor Gene Polymorphisms to Tuberculosis Susceptibility in Humans. *Scandinavian journal of immunology*. 2013;78(3):221-9.
54. Nakamura R, Imaeda T, Miura T. Radial shortening for Kienböck’s disease: factors affecting the operative result. *Journal of Hand Surgery (British and European Volume)*. 1990;15(1):40-5.

55. Trumble T, Glisson RR, Seaber AV, Urbaniak JR. A biomechanical comparison of the methods for treating Kienböck's disease. *The Journal of hand surgery*. 1986;11(1):88-93.
56. Condit DP, Idler RS, Fischer TJ, Hastings H. Preoperative factors and outcome after lunate decompression for Kienböck's disease. *The Journal of hand surgery*. 1993;18(4):691-6.
57. Altay T, Kaya A, Karapinar L, Ozturk H, Kayali C. Is radial shortening useful for Lichtman stage 3B Kienböck's disease? *International orthopaedics*. 2008;32(6):747-52.
58. Salmon J, Stanley J, Trail I. Kienböck's disease. *Bone & Joint Journal*. 2000;82(6):820-3.
59. Buluc L, Gündeş H, Baran T, Selek Ö. Proximal row carpectomy for Lichtman stage III Kienböck's disease. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*. 2014;49(6):641-7.
60. Hirota Y, Hirohata T, Fukuda K, Mori M, Yanagawa H, Ohno Y, et al. Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *American journal of epidemiology*. 1993;137(5):530-8.
61. Matsuo K, Hirohata T, Sugioka Y, IKEDA M, FUKUDA A. Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clinical orthopaedics and related research*. 1988;234:115-23.
62. Glueck CJ, Freiberg R, Tracy T, Stroop D, Wang P. Thrombophilia and Hypofibrinolysis; Pathophysiologies of Osteonecrosis. *Clinical orthopaedics and related research*. 1997;334:43-56.

- 63.Zalavras C. Potential aetiological factors concerning the development of osteonecrosis of the femoral head. *European journal of clinical investigation*. 2000;30(3):215-21.
- 64.Ferrari P, Schroeder V, Anderson S, Kocovic L, Vogt B, Schiesser D, et al. Association of plasminogen activator inhibitor-1 genotype with avascular osteonecrosis in steroid-treated renal allograft recipients¹. *Transplantation*. 2002;74(8):1147-52.
- 65.Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1991;11(1):183-90.
- 66.Shang X-f, Su H, Chang W-w, Wang C-c, Han Q, Xu Z-w. Association between MTHFR C677T polymorphism and osteonecrosis of the femoral head: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2012;39(6):7089-94.
- 67.Zhao L, Bracken MB, DeWan AT, Chen S. Association between the SERPINE1 (PAI-1) 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism (rs1799889) and pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Molecular human reproduction*. 2013;19(3):136-43.
- 68.Glueck CJ, Freiberg RA, Sieve L, Wang P. Enoxaparin prevents progression of stages I and II osteonecrosis of the hip. *Clinical orthopaedics and related research*. 2005;435:164-70.
- 69.Peled E, Davis M, Axelman E, Norman D, Nadir Y. Heapanase role in the treatment of avascular necrosis of femur head. *Thrombosis research*. 2013;131(1):94-8.