

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

**SIÇAN MODELİNDE OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİNDE
HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN MEMBRANININ KIRIK
KAYNAMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ALİ ÇAĞDAŞ YÖRÜKOĞLU**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ.DR. SEMİH AKKAYA**

DENİZLİ - 2012

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

**SIÇAN MODELİNDE OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİNDE
HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN MEMBRANININ KIRIK
KAYNAMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ALİ ÇAĞDAŞ YÖRÜKOĞLU**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. SEMİH AKKAYA**

DENİZLİ – 2012

Yrd. Doç. Dr. Semih AKKAYA danışmanlığında Dr. ALİ ÇAĞDAŞ YÖRÜKOĞLU tarafından yapılan "SIÇAN MODELİNDE OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİNDE, HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN MEMBRANININ KIRIK KAYNAMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ" başlıklı tez çalışması 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. Fahir DEMİRKAN

ÜYE: Prof. Dr. Esat KITER

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Semih AKKAYA

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.30 /04/2012

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

Prof. Dr. Mustafa KILIÇ

TEŐEKKÖR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda almıő olduğum uzmanlık eğitimi boyunca, eğitimimde katkıları bulunan değerli hocalarım; Prof. Dr. A. Fahir Demirkan, Prof. Dr. A.Esat Kiter' e, Yrd. Doç. Dr. Murat Oto' ya ve Yrd. Doç. Dr. Alp Akman'a;

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi ve birikimleri ile katkıda bulunan tez danıőmanım Yrd. Doç. Dr. Semih Akkaya'ya;

Çalışmada bana hem klinik çalışmaları hem de tecrübeleriyle yardımını esirgemeyen hocam Prof. Dr. A.evik Tufan 'a histoloji asistanlarına labaratuvar teknisyeni Erdinç Karataő' a

Deneysel çalışmalarda yardımcımız Barbaros őahin' e

Hayatım boyunca yanımda olup maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anne ve babama ve eőim Dr. Ayėun Yörükoğlu' na;

Uzmanlık eğitimim boyunca içinde bulunmakta gurur duyduğum tüm ortopedi kliniğine teőekkörü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
İNGİLİZCE ÖZET	X
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	1
Kemik doku	1
Kemiğin oluşumu.....	3
Kırık	7
GEREÇ VE YÖNTEM	19
BULGULAR	29
TARTIŞMA	47
SONUÇLAR	59
KAYNAKLAR	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

PAÜHDEK: Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

IL :İnterlökin

PDGF :Platelet Derivated Growth Factor

VEGF :Vasküler Endotelyal Growth Factor,

GAPDH :Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrojenaz

MKH :Mezenkimal Kök Hücre

TGF :Trombosit Growth Factor

CO₂ :Karbodioksit

TNF :Tümör Nekroz Faktör

DMEM : Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

PBS : Phosphate Buffer Saline

ml :Mililitre

mm :Milimetre

g :Gram

mM :milimolar

µl :mikrolitre

µmol :mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Endokondral Kemikleşme	4
Şekil 2 İntramembranöz Kemikleşme	6
Şekil 3 Kırık İyileşmesinin Evreleri	8
Şekil 4 Kırık Sonrası Tamir Mekanizmaları	10
Şekil 5 Kemik Kallus Oluşumu	11
Şekil 6 Kallus Dokusunun Oluşumu Ve Yeniden Şekillenme	12

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1 Sıçan femurlarına kırık oluşturma ve intramedüller fiksasyon	23
Resim 2 Femurdaki kırık hattına kök hücre sarılma aşaması	24
Resim 3 Sıçan femurlarına kök hücre membranı uygulanması	25
Resim 4 Sıçan femurlarının 2. ve 4. hafta makroskopik görüntüleri	31
Resim 5 Altıncı ve 8. Hafta sıçan femurlarının makroskopik görüntüsü	32
Resim 6 Sıçan femurlarının 2-4-6-8. hafta radyolojik görüntüleri	34
Resim 7 Kök hücrelerin izolasyonu ve çoğaltılması	35
Resim 8 Kök hücrelerin karakteristik özelliklerinin gösterilmesi	37
Resim 9 Kök hücre membranlarının görüntüsü	38
Resim10 Kök hücre membranlarının mikroskopik görüntüsü	39
Resim11 Membranların alizalin red s ile boyanması	40
Resim12 Osteojenik indüklenmiş kök hücre membranlarının histolojik bulgularının RT- PCR ile teyit edilmesi.	41
Resim13 İkinci hafta osteojenik kök hücre membranı kullanılan kırık hattının görüntüsü	43
Resim14 İkinci hafta kontrol grubu kırık hattı ve çevresinde görülen fibrotik dokunun histolojik görüntüsü	44
Resim15 Her üç grup kırık hattının 4. hafta Histolojik Görüntüleri	45

ÖZET

Kök hücreler, bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneği olan, özelleşmemiş, farklılaşabilen, hasarlı dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen, in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile hücrelerin farklılaşmalarını sağlayabilen hücrelerdir. Farklılaşmamış kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (self-renewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır. Akut kemik yaralanmaları iskelete uygulanan kuvvetlerin dokuların direnme gücünü aşmasının bir sonucudur. Kemik dokusunun bütünlüğünün bozulmasına kırık denir. Ortopedik uygulamalarda defektli kırıklar her dönemde hem hastayı hem de cerrahları zorlayan bir etmen olarak karşımıza çıkmaktadır. Parçalı kırıklar ve defektli kırıkların iyileşmesini hızlandırmak hem maliyet hem de işgücü kaybını en aza indirmek amaçlı bu çalışmayı yaptık. Çalışmada 30 adet dişi sıçan femur kırığı ve defekt modeli oluşturuldu. Oluşturulan kırık hattı çevresine kök hücre membranı uygulandı. Uygulanan membranların bir kısmı osteojenik indüklenmiş. Bir kısmı da indüklenmemiş kök hücrelerden oluşmaktaydı. Membranlar kırık hattı çevresine sarıldı. 0.2.4.6.8. haftalarda grafi çekildi. 2. 4.6.8 Haftalarda ratlar sakrifiye edilerek makroskopik ve histolojik incelemeye tabi tutuldu. 2. Haftada osteojenik indüksiyon uygulanan gruptaki histolojik bulgular kontrol ve indüklenmemiş kök hücre grubuna oranla kal dokusunun yani kaynama dokusunun fazlalığı yönündeydi. 4. Hafta sonuçlarımızda ise osteojenik grupta yine kal dokusunun diğerlerine oranla daha fazla osteojenik alanlar içerdiği görüldü. Makroskopik ve radyolojik olarak kemiğin remodele olduğunu görüldü. Sonuç olarak kök hücrelerin özellikle osteojenik indüklenmiş kök hücrelerin kırık kaynamasını artırıcı etki gösterdiklerini çalışmamızda saptadık.

İNGİLİZCE ÖZET

Stem cells are undifferentiated cells which have the ability to divide, renew itself, differentiate, proliferate when transplanted to a damaged tissue, and capability to differentiate in vivo even in the absence of damage. Some major difference between undifferentiated stem cells and other types of cells are having a characteristic to differentiate into a similar cell (self-renewal); ability to differentiate into more than one cell series (multi-lineage differentiation), and restructuring of the tissue properties. As a result of exceeding tissue resistance, acute bone trauma occurs. Damage to bone unity is defined as a fracture. Defective fractures compel both the patient and the surgeon during orthopedic procedures at any time. We have done this study to minimize both the cost and the loss of labor for comminuted fractures and defectives fractures by accelerating the healing period. On this study, we created thirty female rat femoral fracture and defect models. Stem cell membrane was applied around the fracture line. Membranes were partly consisted of osteogenic-induced and partly non-induced stem cells. Membranes were wrapped around the fracture line. Radiography was performed on weeks 0, 2, 4, 6, 8. On weeks rats were sacrificed and macroscopic and histologic examinations were done. Histologic findings from the osteogenic-induced rats had more fusion tissue than control and non-induced group on week 2. In addition, osteogenic-induced group again had more callus tissue and osteogenic areas on week 4. We even observed bone remodeling. In conclusion, we determine that osteogenic-induced stem cells increase bone fusion in this study.

GENEL BİLGİLER

KEMİK DOKU

Kemik dokusu canlıda dengeyi sağlayan, iyi kanlanma ve innervasyona sahip, ekstraselüler matriksin mineralleşme süreci sonunda kalsiyum ve fosfat tuzlarıyla satüre olduğu dayanıklı bir destek dokudur (1, 2, 3). Organik ve inorganik bileşiklerin oluşturduğu matriks içine yerleşmiş hücrelerden oluşan yoğun kompozit bir yapıya sahiptir. Mineral dengesinin düzenleyicisi ve kan hücrelerinin olduğu dokudur (4, 5).

Kemik matriks adı verilen hücreler arası madde kalsifiye olmuştur. Matriks, kuru ağırlığının kabaca %40'ı oranında organik, %60 oranında da inorganik bileşenlerden meydana gelir. Ekstrasellüler matriksin ana yapısal bileşeni kollajen, diğer kısım ise proteoglikanlar, kollojen dışı matriks proteinleri, büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. İnorganik bileşenlerinin büyük çoğunluğunu kalsiyum hidroksiapatit ve osteokalsiyum fosfat oluşturur. Hidroksiapatit kristalleri kollajen lif segmentlerine sıkıca bağlıdır (6). Bu bağlanmayla kemikte yırtılma yani kristal ve kollajenin yerlerinden ayrılması engellenir. Böylece kemik yapısı gerilme ve sıkışmaya direnç kazanır (1, 7).

Kemik Dokunun Hücresel Biyolojisi

Kemiğin temel hücresel elemanları osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler, osteoprogenitor hücreler, kemik iliği hücreleri ve kemiğin büyüme ile gelişimini düzenleyen immün sistem hücrelerinden oluşur.

- a) Osteoprogenitör hücreler: Doğrudan kemik yapımında rol almayan bu hücreler aslında mezenkim kaynaklı hücrelerin bir alt grubu kök hücrelerdir ve uygun medyatörlerin varlığında (interlökinler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü) aktive olurlar ve osteoblastlara farklılaşırlar. Erişkin dönemde kemiğin internal reorganizasyonu, kırık iyileşmesi veya farklı tipteki yaralanma durumunda aktive olarak, osteoblast veya osteoklast gibi diğer tip kemik hücrelerine de dönüşebilirler (4, 6, 8).

- b) Osteoblastlar:** Bu hücreler kemik yapımından esas sorumlu hücrelerdir. Osteoblastlar mezenkimal kök hücre ve perisitlerden köken alan hücrelerdir. Kemik yüzeyinde ve birbirleriyle sıkı bağlantılı şekilde yerleşirler. Organik matriksin sentezi ve mineralizasyonu gibi kemiğin metabolik işlevlerinden sorumlulardır. Aktif kemik oluşumunun olduğu bütün bölgeleri kaplarlar. Osteoblastlar kemik matriksindeki kollajen ve kollajen dışı protein sentezini, ekstrasellüler matriks fibrillerinin düzenini ve osteoid materyalin mineralizasyonunu sağlarlar. Bu mineralizasyonu alkalenfosfataz enzimi sayesinde içerdikleri adenozintrifosfatın ortama saldığı Ca^{+} iyonu ile sağlarlar. Salgıladığı büyüme faktörleri kemik yapımını belirgin şekilde hızlandırır ve farklılaşma sağlar. Osteoblastların aktif yaşam süreleri 1 ila 10 haftadır. Bir kısmı kemik yüzeyini döşeyen hücelere dönüşürken, bir kısmı da osteositlere dönüşmektedir (5, 9).
- c) Osteositler:** Matür kemik dokusundaki hücrelerin %90'ını oluştururlar. Yoğun kemik sentezi yapan osteoblastlar zamanla kendilerini lameller arasında hapsederek osteositlere dönüşürler. Osteositler minimal kemik matriksi sentezleyip salgırlar. Matriksin kalsiyum ve fosfor dengesini düzenler. Kalsitonin tarafından aktive olurken parathormon tarafından inhibe olurlar. Farklılaşma sırasında oluşan osteositler yavaş yavaş matriks üretme yeteneklerini kaybederler ve boyut olarak küçülürler. Çevrelerindeki matriksi rezorbe ederek osteositik lakünleri oluştururlar. Her bir lakünde bir osteosit bulunur. Kemiğin sert yapısı içinde yerleşmiş osteositler lakünler sayesinde diğer osteositlerle ve de vücut sıvılarıyla iletişim halindedir. Gelişmiş sitoplazmik uzantılarıyla osteositler gerekli iyon ve metabolitlerin transferini sağlarlar (10, 11).
- d) Osteoklast:** Osteoklastlar, kemik rezorbsiyonundan sorumlu hücrelerdir ve kemik rezorbsiyonun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış ve Howship lakunası adı verilen yüzeyel çukurların içine yerleşmiş, çok çekirdekli, asidofilik dev hücrelerdir. Osteoklastlar kemik yüzeyine yapışarak

rezorbsiyonu başlatırlar ve karbonik anhidraz sayesinde asit sekresyonu yaparak pH'ı 7'den 4'e düşürürler. Asit ortam yaratarak mineral fazı rezorbe ederler. Kollajen ve organik matriksi ise proteolitik enzimler (kollajenaz, metalloproteaz vb.) ile rezorbe ederler (12, 13).

Kemiğin Oluşumu

Kemik, osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu veya daha önce var olan kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin çöküşü ile oluşur. Bu her iki çeşit kemikleşme şeklinde de ilk olarak ortaya çıkan kemik dokusu primer kemik dokusudur.

Kemik Yapımı (Osteogenesis)

Kemik üretimi embriyonik gelişimde, kemik büyümesinde, remodelasyon, yumuşak doku travması sonucu gelişen myozitis ossifikans ve heterotopik ossifikasyonda, kırık iyileşmesinde, neoplazi veya infeksiyonlara yanıt olarak oluşturulur. Kemik greftlemesi, distraksiyon, demineralize kemik matriksi ve büyüme faktörleri, egzersiz gibi uyaranlar kemik yapımını stimüle ederler. Farklılaşmamış mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşır ve ekstrasellüler matriks sentezlemeye başlar. Matriks mineralize olarak osteoblastları çevreler ve osteoblastların osteositlere dönüşümünü sağlar. Osteoklastlar ortaya çıkar ve rezorbsiyon ile remodelasyon oluşur. İmmatür kemik yerini matür lameller kemiğe bırakır (4, 14, 15).

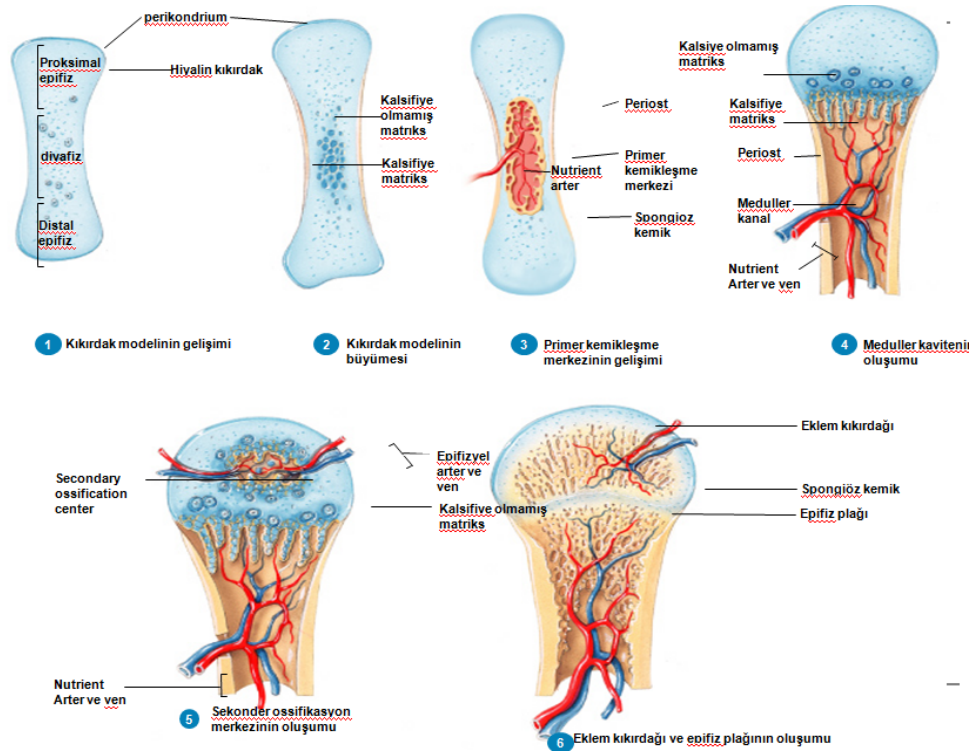
İskelet sisteminde kemik yapımı 2 farklı şekilde olur:

1. Endokondral kemik yapımı
2. İntramembranöz kemik yapımı.

1. Endokondral kemik yapımı

Endokondral kemikleşme, önce farklılaşmamış hücrelerin bir araya gelip kondrositlere dönüşmesi ve onların farklılaşması ve kıkırdak matriksi sentezlemesiyle başlar. Hyalin veya hyalin benzeri kıkırdak oluşumu sırasında diafiz çevresinde periost çevrelemesi oluşur. Bazı bölgelerde kıkırdak matriks mineralize

olur, kondrositler genişler. Damarlar kıkırdağı invaze eder ve kan yoluyla gelen hücreler kıkırdağın merkezini rezorbe ederek medüller boşluğu meydana getirirler. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşür ve mineralize kıkırdak üzerinde osteoid matriksi oluşturur. Osteoklastlar bu kalsifiye kıkırdak ve immatür kemiği resorbe eder. Enkondral kemikleşme iki aşamadan meydana gelir. İlk aşama kemik modelindeki kondrositlerin hipertrofisi ve harabiyetidir. Kalsifiye kıkırdak matriksi septaların birbirinden ayırdığı genişlemiş alanlar olan lakunalardır. İkinci aşamada, osteoprogenitör hücreler ve kan kapillerlerinden oluşan osteojenik tomurcuk, dejenere olmuş kıkırdak hücrelerinden geriye kalan bu alanlara girer. Osteoprogenitör hücreler, kıkırdağımsı septumun üstünü kemik matriksi ile kaplayan osteoblastlara dönüşür (4, 16).



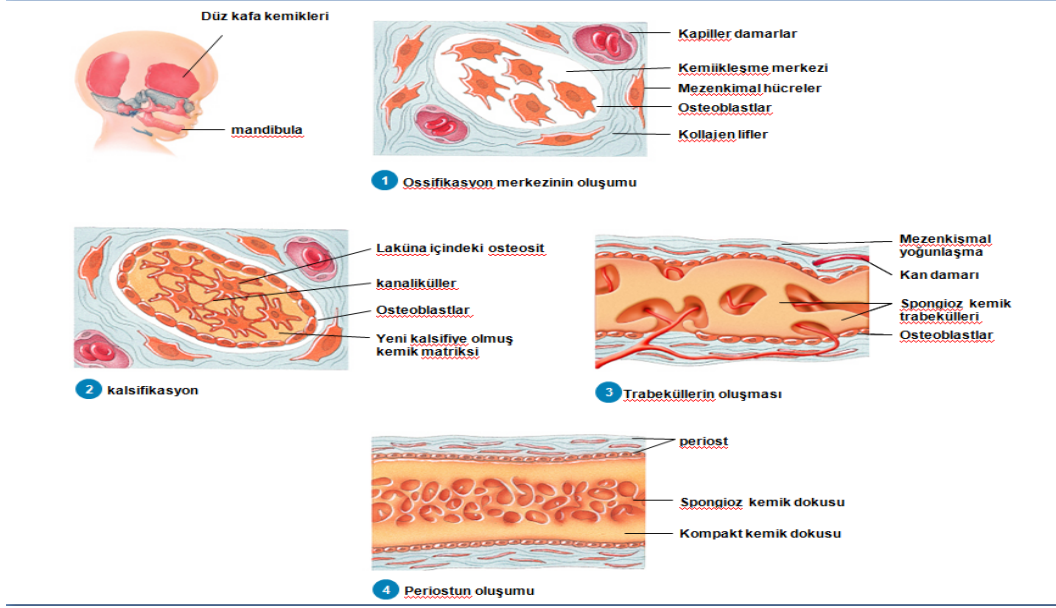
Şekil 1: Endokondral kemikleşme (17)

Kalsifikasyon, proteoglikanlar ve yüksek oranda kalsiyum bağlayan glikoproteinler tarafından uyarılan, kalsiyum tuzlarının kollajen fibriller üzerinde

birikmesidir. Osteoblastların sitoplazmalarındaki veziküllerde kalsiyum tuzlarının birikmesi ve hücreden salınmasıyla hızlanır. Kalsifikasyonun, Ca tuzlarının kollajen fibriller üzerine çökmesi ile başladığı bilinmektedir. Bunu proteoglikanlar ve Ca bağlamada yüksek afinitesi olan glikoproteinler (osteonektin) başlatır. İntrastoplazmik veziküller içinde Ca tuzlarının çökmesi belki de osteoblastların yardımı ile hızlandırılıp yoğunlaştırılır ve gerektiğinde ekstraselüler aralığa salgılanması sağlanır (1).

2. İntramembranöz Kemik yapımı

Membranöz bir kılıf oluşturan mezenkimde meydana geldiği için intramembranöz kemikleşme adını alır. Doğumdan sonra, kemik defektlerinin rejenerasyonu ve kırık tamirinde reaktif olur. Mezenkimal hücreler yoğunlaşır ve damarlanması çok artar. Mezenkimal doku yoğunlaşmaları içinde ossifikasyonun başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Hücreler, kan damarları, fibroblastlar ve osteoprogenitör hücreleri içeren gevşek yapıli organik matriksi sentezler. Yeni kemik matriksi oluşur. Kalsifikasyon süreci takip eder. Matriks adacıklarının yüzeyini osteoblastlar kaplar ve hızla yeni kemik matriksi üretirler. Osteoblastlar, uzun sitoplazmik uzantılara sahip osteositlere dönüşür. Osteoid matriks mineralize olarak matür kemik halini alır. Kemikler endokondral kemikleşmeyle uzama gösterirken, intramembranöz kemikleşmeyle kalınlık kazanırlar (18,19).



Şekil 2: İntramembranöz kemikleşme (17)

Kemikte Modelasyon ve Remodelasyon

Kemik şeklinin oluşması modelasyon, kemiklerin şekillerinin değişmeden yıkılıp yapılmasına remodelasyon denir. Onarım döneminin sonunda immatür kemiğin yerine lameller kemiğin alması ve kallusun resorpsiyonu ile remodeling dönemi başlar. Modelasyon; iskelet büyümesinde ve kırık onarımı sonrasında görülür, remodelasyon hayat boyu devam eden bir süreçtir. Yeniden şekillenme döneminde wolf kanununa göre stres altındaki kemikte elektrikselsel olaylar sonucunda kırık kallusunun remodelizasyonu meydana gelir (5, 9).

Kallus dokusuna gelen osteojenik hücreler kambium tabakasında (Periostun derin takabası) endosteumdan havers kanallarından kemik iliğinden farklılaşmamış hücreler geçer. Olgunlaşmamış ağsı kemiğin lameller kemiğe dönüşümünü içerir. Ağsı kemik osteoklastlar tarafından emilir. Osteoblastların olgunlaşmamış lamellar kemik yapımı mevcuttur. Kemik normal görünümünü kazandığında ve medüler kanal yeniden oluştuğunda iyileşme tamamlanmış olur. Mekanik özellikler yaralanma öncesindeki durumuna döner (20).

Kırık

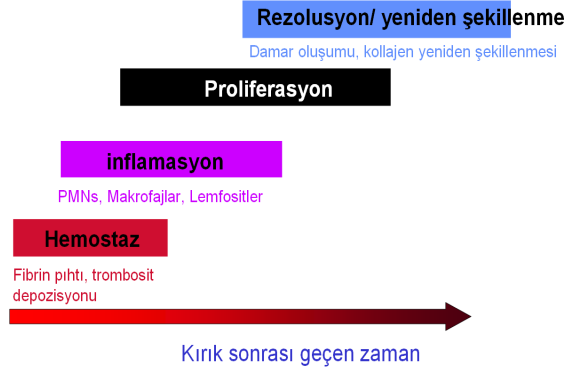
Akut kemik yaralanmaları iskelete uygulanan kuvvetlerin dokuların direnme gücünü aşmasının sonucudur. Kemik dokusunun bütünlüğünün bozulmasına kırık denir. Kırık oluşumu, kemik ve çevresindeki kas, tendon, ligament, damar, sinir gibi yumuşak dokuları içeren kompleks bir doku zedelenmesine yol açmaktadır. Bir kemik kırığı matriks hasarına, hücre ölümüne, periost ve endosteumda yırtıklara ve kırık kemik uçlarında deplasmana neden olur. Kemik, skar dokusu oluşturmaz ve yeniden yapılanmayla (remodeling) iyileşir. Kırık iyileşmesi, kırık oluşumundan düzenli kemik doku ile kırık uçları birleşinceye kadar olan süreçte devam eder (22).

Kırık Belirti ve Bulguları

Kırıkları doğru teşhis edebilmek için, yaralının hızlı, dikkatli ve sistematik olarak anamnezini almak, sistemik ve lokal fizik muayenesini yapmak ve radyolojik bulgu ve belirtileri değerlendirmek gerekir. Anamnez, bilinci yerinde olanların kendisinden veya bilinci yerinde olmayanların çevresindekilerden detaylı olarak alınabilir. Kırıkla beraber etrafındaki kas ve tendonlarla, onu örten fasya ve cilt de yaralandığı için belirtilerin bir bölümü kırığa özgü olmayıp, bu belirtiler aynı tür travmaların kırık oluşturmaksızın meydana getirdikleri yumuşak doku lezyonlarında da görülürler.

Kırık İyileşmesinin Evreleri (17)

- | | |
|-----------|--|
| 1. Gün | -Hematom Oluşumu (Fibrin Mesh) |
| 3. Gün | -İnflamasyon Evresi – PDGF, IL, TGF |
| 1. Hafta | -Yumuşak Kallus – Granülasyon Dokusu, Matriks. |
| 3-6.Hafta | -Kallus – Kemikleşme, Kemik Doku |
| 8. Hafta | -Yeniden Şekillenme-Güçlü Kemik, Lameller Yapı |



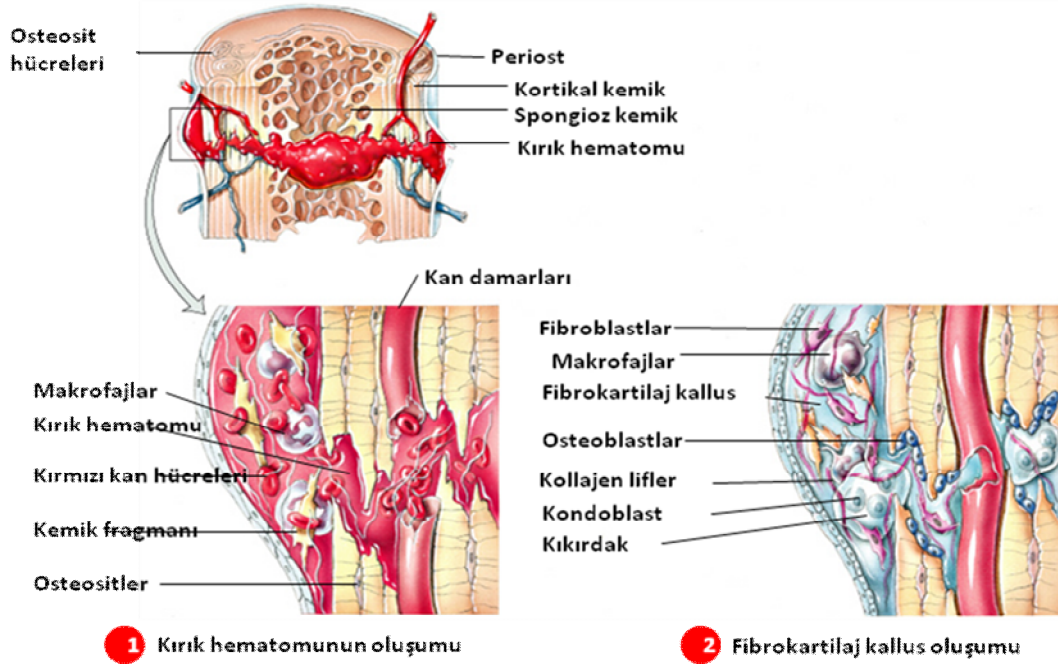
Şekil 3: Kırık iyileşmesinin evreleri

Kırık oluşumunu takiben kemik bütünlüğünün yeniden sağlanabilmesi amacıyla organizmada birçok değişiklikler şekillenir. Kırık iyileşmesi oldukça komplike bir olaydır ve 3 evreye ayrılır. Bu evreler yangı, yenilenme, yeniden şekillenme (Remodelling). En kısa dönem inflamatuar dönem iken en uzun dönem yeniden şekillenme dönemidir. Tüm doku travmalarında ve kırıklarda, ilk verilen cevap inflamasyondur. İnflamasyon dönemi, kırık iyileşmesi için gerekli temel öğeleri içeren kırık hematomunun ilk oluşumu ve organizasyonunun başlangıç dönemidir.

A. İnflamatuar (Hematom, Yangı) Dönem

Kırık oluşumu ile birlikte, kırık hematomu şekillenmeye başlar ve kırıkta ve kemik oluşumunun başlamasına kadar sürer (1-7 gün) Travmanın şiddetine bağlı olarak, kırık komşuluğundaki çevre yumuşak dokular ve periost yırtılır. Kan damarları yaralanır. Pıhtılaşmayı sağlamak ve kanamanın durması için trombosit ve trombosit kaynaklı faktörler ortama salınır. Moleküler aracılar kırık bölgede çoğalır. Pıhtılaşma ile kırık uçları arasında hematom oluşur. Oluşan hematom kırık uçlarını bir arada tutan köprü görevi görür. Şekillenen fibrin (pıhtı) kırık uçları arasında ince bir ağ meydana getirir. Fibroblastlar kırık bölgesine ulaşır ve kollajen salgılayarak, kollajen liflerle kırık uçlarını birbirine bağlar. Sonuçta, kırık bölgesinde genç granülasyon dokusu oluşmaya başlar. Ardından hematom bölgeye osteoblast ve kondrosit prekürsör hücrelerini getirir. Bunlar matriks oluşumunu başlatacak olan

osteoblastlara ve kondroblastlara dönüşürler. Kırık oluştuktan sonra geçici bir arteriyoller daralmanın ardından bunu arteriyol, kılcal damar ve venüllerin genişlemesi aşaması izler. Kırık sonrası oluşan hipereminim sebebi budur. Tüm bunları oluşturan neden ise dokudaki mast hücrelerinin kırık bölgesine histamin salgılamasıdır. Ayrıca kılcal damar geçirgenliği artar. Damarlarda vazodilatasyon ve plazma eksudasyonuna bağlı olarak, kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur. Polimorf çekirdekli lökositler, lenfosit ve monositleri içeren akut yangı hücreleri, ödemli bölgeye göç ederler. Makrofajlar bakterileri ve nekrotik dokuları fagosite ederler ve köprü kallus oluşturma işlevi ile birlikte, fibroplaziyi de teşvik ederler. Bunlar aynı zamanda ortama interleukin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör (TNF) salgırlar. Bu iki mediatör lökositlerin kırık bölgesine göçüne, fibroblastlardan kollajen sentezine ve akut faz proteinlerinin artmasına neden olur. Tüm bunlar olurken onarım bölgesindeki damar endotelinden, venöz endotelial büyüme faktörü (VEGF) yeni damarlaşmayı (neoangiogenezis) uyarır. Kırık bölgesinde mezenkimal hücre çoğalması ilk 16 saatte saptanmıştır. Bu çoğalma, kırık sonrası 32 saatte en üst düzeye çıkar. Oluşmaya başlayan kan damarları 2-3 günde ışık mikroskopisi düzeyinde görünür hale gelirler ve 1. haftada belirginleşirler. Kırık iyileşmesinin ilk dönemlerinde periyosteal damarlar, geç dönemdeyse besleyici (nutrisyen) damarlar, kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Yeni oluşan damarlaşma geçici fasyal bağlantılardan oluşur ve normal periostal arterlerden farklıdır. Oluşan bu damarlar kallus dokusunu ve ayrı herhangi bir kortikal fragmanı beslerler. Bu dönemde fibrin ağından kemik yapımı için hücre çoğalması başlar. Fibrin matriksi içindeki öncü hücreler, çeşitli biyokimyasal etkilerle farklı dokuları oluşturmak için farklılaşmaya hazır bulunmaktadır. İnflamatuar dönem, kırıkta ve kemik elemanlar görülene kadar sürer ve günlerce devam eder. Kırık iyileşmesinin iki ya da üçüncü gününde kırık bölgesinde periosteum ve endosteumdan köken alan osteoblast ve kondroblastlarda sayıca hızlı bir artış görülür. Düzen içersinde gelişen bu olaylardan sonra yumuşak dokular arasındaki kemikte osteogenezis başlayacaktır (26,27,28).



Şekil 4: Kırık sonrası tamir mekanizmalarının gösterimi (17)

B. Tamir Dönemi (4-40 gün)

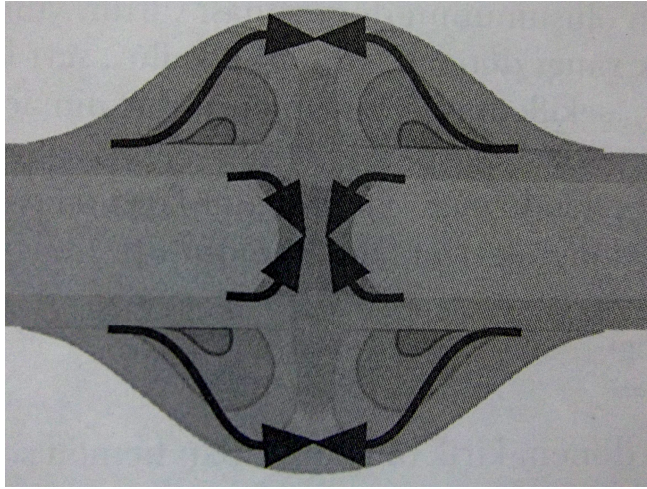
Tamir dönemi, kırık oluşuktan hemen sonraki saatlerde başlasa da belirgin hale gelmesi 7–12 gün sürmektedir. Tamir evresinin ilk basamağında hematomun organize olduğu görülür. Lokal öncü hücreler lokal ajanlarla uyarılır. Yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya başlarlar. Kemik yapımı devam eder ve kırık bölgesinde köprü kallus oluşumu devam eder. Bu evrede, dış etkenlerin kırık iyileşmesindeki etkisi belirgindir ve kırık iyileşmesinde kırığın nasıl stabilize edildiği büyük önem taşır. Onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler Mezenkimal kaynaklı çok yönlü gelişim gücüne sahip olan hücrelerdir. Çoğunlukla kırık bölgesindeki granülasyon dokusu içinden, ayrıca periostun osteojenik tabakası ve daha az olarak endosteumdan köken almaktadırlar. Bu hücreler farklılaşmaya başladığında, ilk değişikliğe uğrayan hücreler, kılcak damarlardan hematoma içine giren fibroblastlar olur. Fibroblastlar kollajen sentezlerler. Kondroblastlar kollajen ve glukozaminoglikan sentezler. Osteoblastlar ise osteoid oluştururlar. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içerdiği kollajen miktarı ve kollajenin tipi ile yakın ilişkilidir. Onarım evresinin ilk aşamalarında kıkırdak kallus öncelikli olarak oluşurken, ilerleyen evrelerinde kemik kallus oluşumu belirginleşmektedir.

Yumuşak Kallus

Ağrı ve şişliğin gerilemesi ile yumuşak kallus oluşur. Bu dönem kırık parçaların serbest olarak hareket edemediği kırık sonrası üçüncü haftaya uyar. Bu dönemdeki hareketlilik oranı kısılmayı engellerse de açılanmayı engelleyemez. Yumuşak kallus dönemi damarlanmadaki artış ve hücrel çoğalma ile karakterizedir. Yeni kemik subperiostal olarak oluşurken kırık uçlarında da kondroblastların oluştuğu gözlenir.(110)

Sert Kallus

Kırık uçları yumuşak kallusla tutunduktan sonra sert kallus dönemi başlar. Tam kaynama gerçekleşene kadar devam eder(3-4 ay). Yumuşak kallus encondral kemikleşme ve intramembranöz kemikleşme ile sert kalsifiye dokuya değişir. Kronolojik incelemeler kemik yapısındaki kallusun kırık uçlarından uzakta başlayıp kırık hattına doğru ilerlediğini göstermiştir (Şekil 5)(110)



Şekil(5) Kemik kallus dokusunun oluşumu (110)

Başlangıçta oluşan kallus yumuşaktır ve radyolojik olarak gözlenemez. Daha sonra, osteoblastlardan osteoid üretimi gerçekleşir ve kondroblastlar osteoblastlara dönüşür. Kalsiyum tuzlarının (hidroksiapatit) da ortama çökmesi sonucu ilk kallus şekillenmiş olur. Bu işlem 2-3 hafta sürer. Oluşan kallus serttir ancak hala dayanıksızdır. Medullada kan damarları yeniden şekillenmeye başlar. Aynı zamanda

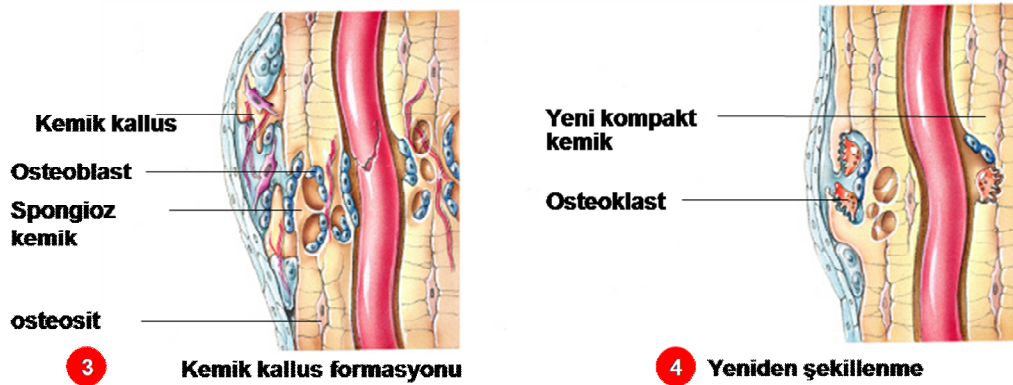
periost ve endosteum kökenli osteoblastlar kemik matriksi olan osteoid'in yapımına başlar. Ön kallusun yerini kemiksi kallus almaya başlar. Bu evreye 4-6 haftada ulaşılır. Artık kemik kaynaması gerçekleşmiştir (29, 30, 31).

C. Kemiğin Yeniden Şekillenme (Remodeling) Evresi (25-100 gün)

Kemiğin yeniden şekillenmesi en uzun evre olup, aylar yıllar sürebilir. Onarım döneminin sonlarında immatür kemiğin yerini lameller kemiğin alması ve gereksiz kallusun rezorpsiyonu ile yeniden şekillenme dönemi başlar. Yeniden şekillenme onarım evresinin ortasında başlayıp, normalde insanlarda 4-16 hafta sürerken, yıllar boyunca da devam edebilir.

Yeniden şekillenme evresinde 4 olay gerçekleşir:

- 1-Kalsifiye kıvrımda, osteoid dokuyla değişir ve bir çeşit birincil trabeküler doku oluşur.
- 2-Oluşan trabeküler dokunun yerini lameller kemik doku alır.
- 3-Kompakt kemik uçlarındaki kallus dokusu, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel düzenlenmiş osteonlardan oluşur.
- 4-Kemik medullası yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından fagosite edilir ve boşluklar yeniden düzenlenir (26, 32, 33).



Şekil 6: Kallus oluşumu ve yeniden şekillenmenin gösterilmesi (17)

Kemik İyileşmesinde Metabolik İhtiyaç Ve Madde Ulaşımı

Hücrenin hayatta kalmasında oksijen, glikoz ve aminoasitlerin erişimi ile metabolik ürünlerin (CO₂, laktat, üre) temizlenmesi önemlidir. Kırık veya greftleme bölgesine moleküllerin hareketi ve madde ulaşımı kollektif olarak gelişir. Bu süreç (dolaşım) sıvı akımı yoğunluk eğimleri veya elektromanyetik kuvvetlere yanıt olarak gelişir. Dolaşım sistemindeki sıvı akımı, kas kasılması, yerçekimi, arteriyel basınç yayılmada önemlidir. En önemlisi ise yoğunluk farkıyla pasif difüzyon olmasıdır. Kırık hematomunun çoğu için etkili bir kütle ulaşım sistemi sağlayan ayrılmamış kırıklar veya kortikotomilerde osteojenik hücre ve kan akımı arasındaki mesafe küçük olabilir. Bu durumlarda kırık hematomonun osteojenik hücreleri veya greft içine transplante edilen hücreler belirgin metabolik mücadelelere tabi olurlar (33).

Kemik İyileşmesinde Etkili Değişiklikler

Hastanın karakteristik özellikleri kemik iyileşmesinde direk etkilidir. İyi beslenme, anabolik olaylar ve infeksiyon gibi komplikasyonların sınırlandırılması için gereklidir. Nikotin gibi maddelerin kullanımı kemik oluşumunu azaltırken paratroid hormon kemik oluşumunda yararlıdır. Bölgesel faktörlerde kemik iyileşme yanıtını etkiler. Yumuşak dokular dikkatle ele alınmalı, sınırlı bölgeye temas edilmeli, ısı, kimyasal travmaya dikkat edilerek kan akımının sürdürülmesi oldukça önemlidir. Kırık tedavisinde kullanılan kayıcı plaklar, kırık hattına en az zarar veren yöntemlerdir. Yumuşak dokunun etkilendiği açık tibia kırıklarında nonunion riski yüksektir. Mekanik faktörler de kemik iyileşmesinde önemlidir. Uygun kompresif güçler iyileşmeye maksimum yanıt verir. Mekanik dizilim kırık iyileşmesi için osteotomi ile düzeltilmelidir. Bu mücadele hücre içine difüze olan oksijen ve diğer besinlerin (glukoz gibi) hızı ve o bölgede bulunan diğer hücreler (metabolik gereksinim) tarafından tüketilen oksijen ve diğer besinlerin hızı arasındaki dengesizlikten etkilenir (33).

Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kemik iyileşmesini gerileyen birçok farklı neden bulunmaktadır.

Bunlar;

1. Açık ve yüksek enerjili kapalı kırıklara bağlı yumuşak doku hasarı

2. Sistemik hastalıklar
3. Patolojik kırıklar
4. Enfeksiyon
5. Segmenter kırıklar
6. Kortikosteroid kullanımı

Kırık İyileşmesi ve Kök Hücre

Kırık kaynamama problemleri gelişen cerrahi teknik ve kırık onarımında kullanılan materyallerde gelişmeler olmasına karşın, başarısızlık %10 gibi devam etmektedir. İleri yumuşak doku hasarı ve periost hasarı olan kırıklarda iyileşme gecikmesi veya kaynamama durumları görülebilmektedir. Kırık iyileşmesinin olmadığı veya kaynama yönünden problem olabilecek durumlarda allojenik mezenkimal kök hücreler kullanılabilir. Labaratuarda üretilmesi ve çoğaltılabilmesi neticesinde günümüzde ortopedi ile ilgili problemlerde kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca kırıkta, tendon hasarlarında da mezenkimal kök hücre kullanımı başarılı sonuçlar elde edilmektedir (34, 35, 36).

Kök Hücre

Kök hücreler, bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneği olan, özelleşmemiş, farklılaşabilen, hasarlı dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen, in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile hücrelerin farklılaşmalarını sağlayabilen hücrelerdir. Farklılaşmamış kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (self-renewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır. Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, multipotent ve pluripotent olarak sınıflandırılırlar. Totipotent hücrelerin, sınırsız farklılaşma ve farklı dokulara yönlenebilme özellikleri vardır. Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip embriyonik hücrelerdir. Bu hücreler, embriyonik ve embriyo dışı yapıları oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Totipotent hücrelere 4 hücreden 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler örnek olarak verilebilir. Totipotent hücreler gelişmenin

ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşebilirler. Pluripotent hücreler, embriyonun blastokist evresinde bulunan hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler 'pluripotent kök hücreler' olup gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptirler. Gelişim ilerledikçe hücreler pluripotensi özelliklerini kaybederek daha özelleşmiş hücrelere dönüşürler. Buldukları dokuya özgü hücreleri oluşturabilen kök hücreler multipotent kök hücreler diye adlandırılır. Son dönemde multipotent kök hücrelerle yapılan çalışmalarda, sadece buldukları dokuya ait hücreleri değil farklı dokulara ait hücreleri de meydana getirebildikleri gösterilmiştir. Multipotent bir kan hücresi diğer özelleşmiş kan hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Multipotent hücreler kemik iliği stromal ve mezenkimal kök hücreler gibi yetişkin kök hücrelerdir (37, 38).

Vücudumuzun çeşitli organlarında ve bu organların belirli doku bölgelerinde lokalize olan gerektiğinde kendini çoğaltıp ve farklılaşabilen kök hücreler 'Yetişkin Kök Hücreler' olarak tanımlanır. Doku ya da organa ait özel doku bütünlülüğünün devamını sağlar. Embriyonik germ hücreleriyle karşılaştırıldığında yetişkin kök hücreleri daha az sayıda hücre türüne farklılaşma kapasitesine sahiptirler ve prokürsör (öncü veya progenitör) hücre olarak isimlendirilir. Yetişkin kök hücreleri akciğer, kalp kası, iskelet kası, kemik iliği, retina, kan ve deri gibi doku ve organların oluşumuna katkıda bulunur (39,40).

Erişkin Kök Hücreleri

Erişkin kök hücreleri vücutta birçok doku ve organda bulunurlar ve buldukları bölgedeki hücrelerin hasar görmesi durumunda çoğalarak hasarlı kısmın onarılmasını sağlarlar. Bir organizma olgunlaşırken, kök ve öncül hücrelerin sayısı azalır. Dolayısıyla, erişkinlerdeki dokular az sayıda kök ve öncül hücre içermektedir ve bu hücreler farklı anatomik yerleşimlerle sınırlıdır. Olgun bir dokudaki hücrelerin çoğu, kendi buldukları çevreye uyum sağlamış, belirli fenotipik özellikleri olan farklılaşmış hücrelerdir. Dolayısıyla, bir organın yenilenme kapasitesi, yaşla birlikte ve etkin bir şekilde bölünebilen kök ve öncül hücrelerin sayısı ile orantılı olarak azalır. Bu sınırlamalarla birlikte vücut, dokuların yerine konulması ve yenilenmesi için iki büyük strateji geliştirmiştir. Birincisi, farklılaşmış

ve işlev gören hücrelerdeki çoğalma kapasitesidir. Hasar sonrası, o bölgede hücre kaybının sınırlı bir şekilde yerine konmasını yönlendirmeye yetecek düzeyde mitojenlerin salındığı ve böylece hücre bölünmesinin uyarıldığı karaciğer, iskelet kası ve damar endotel hücreleri bu gruba girmektedir. ikincisi ise, bölünebilen kök hücrelerden gelen yeni nesil hücrelerin, farklılaşmış hücrelerin yerini almasıdır. Kan hücreleri buna örnek olarak verilebilir. Erişkin kök hücreleri; hematopoietik kök hücreler, stromal (mezenkimal) kök hücreler, organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri olarak guruplandırılır (37, 41).

Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler yetişkin bir kök hücre tipidir. Bu hücreler başta kemik iliği olmak üzere; kıkırdak, kemik ve yağ dokularında sınırlı sayıda üretilebilir. Kemik dokusunun tamiri, osteoartrit ve kıkırdak dokusunun tamiri gibi alanlarda klinik kullanım potansiyeli mevcuttur. Birçok çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin bağışıklık yanıtın düzenlenmesinde rol oynadığı ve bağışıklık yanıtı baskıladığı kanıtlanmıştır. Mezenkimal kök hücreler “destek hücresi” özelliği taşıyan, stromal kökenli, erişkin kök hücre tipidir. Bu hücreler hematopoetik özellikte olmayan (non-hematopoetik) pluripotent kök hücrelerdir ve pek çok değişik hücre türüne farklılaşma yetenekleri vardır. Birçok dokudan elde edilebilirlikleri, sayıca çoğalabilmeleri ve dayanıklı olmaları nedeniyle tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeline sahiptirler. Bütün bunların yanında çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımaları, salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları ilgiyle karşılanmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin dezavantajı elde edildikleri dokularda az sayıda bulunmalarıdır. Bu durum temel bilim araştırmalarında ve klinik kullanım alanlarında mezenkimal kök hücrelerin in vitro çoğaltılmalarını gerekli kılar. Yine karşılaşılan bu durum yüzünden hücre kültürü pasajlamaları ile maruz kalınan birçok uyarıcı faktör kök hücrelerin biyolojik ve immünojenotipik özelliklerinde farklılaşmaya yol açabilir (39, 42).

Mezenkimal Kök Hücrelerin Fiziksel Özellikleri ve İn Vitro Çoğaltılmaları

Mezenkimal kök hücreler dokularda çok az sayıda bulunmaktadır. Gerek klinik uygulamalarda gerekse temel bilim araştırmalarında yeterli hücre sayılarına ulaşabilmek için in vitro ortamda çoğalmaları gerekmektedir. MKH'ler faz kontrast mikroskobu altında, hücre kültür ortamlarında incelendiğinde, iğ şeklinde fibroblast benzeri hücreler oldukları gözlemlenmiştir. Hücreler düşük konsantrasyonda koloni oluştururken, yüksek yoğunlukta hücre bulunan ortamda yan yana dizilmiş hücre grupları halinde buldukları gözlemlenmiştir (39).

Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

MKH'ler için ana kaynak kemik iliğidir. Kemik iliğinde MKH'ler dışında mezoderm kökenli hematopoetik ve endotel kök hücreleri bulunur. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arasında değişen sayıda MKH mevcut olduğu gösterilmiştir. Kemik iliği dışında MKH kaynakları olarak; karaciğer, kas dokusu, sinovial sıvı, kemik, periost, lipoaspirasyon materyalleri, göbek kordonu kanı, göbek kordonu stroması, plasenta, amniyon sıvısı, diş pulpası ve maksillofasial dokuları sıralayabiliriz. Solid dokulardan enzimatik izolasyon yapılabilir. İzole edilen hücreler yukarıda da belirtildiği gibi fibroblastoid morfolojide olup, kültür kaplarına yapışabilen, çok yönlü farklılaşabilen ve spesifik yüzey belirleyicilerini taşıyan hücrelerdir. Yapılan çalışmalarda köken alınan doku tipine göre, bu hücrelerin farklılaşma özellikleri ve fonksiyonları bakımından farklılık gösterebileceği belirtilmiştir. Bu yüzden doku onarımlarında o bölgeye spesifik doku kullanımının daha avantajlı olacağı vurgulanmıştır (39, 42).

Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenotipik Özellikleri

Heterojen hücre kültürlerinde sadece mezenkimal kök hücreleri tanımlayan spesifik bir antijen henüz tanımlanmadığından mezenkimal kök hücreleri ortamda bulunan diğer hücre gruplarından ayırt etmek için hematopoetik kök hücreler veya hücrelerin izole edildiği dokuya özgü antijenlerin negatif olması gerekmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin adezyon, hücre-hücre, hücre-hücre dışı matriks

ilişkilerinde rol oynayan stromaya özgü antijenleri yüksek oranda eksprese ettikleri, hematopoetik hücelere özgü antijenleri ise ekspre etmedikleri bilinmektedir. Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücre kültürlerinin immünofenotipik özellikleri, akım sitometri tekniği ile incelenmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin stroma ile ilişkili antijenlerinden tipik kabul edilenleri SH2 (CD105), SH3-SH4 (CD73), CD90, CD29, CD44 için pozitifdir. Hematopoetik antijenlerdeki (CD45, CD34, CD14 veya CD11b, HLA sınıf II, CD79 veya CD19 vb.) pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir (39).

Kemik Tamir ve Rejenerasyonunda Kök Hücre

Kırık iyileşmesi hala çözülememiş birçok karmaşık biyolojik olay sonucu gerçekleşmektedir. Bu olaylarda kemik indüksiyonu ve kondüksiyonu için hücre içi ile hücre dışı sinyal sistemi de yer almaktadır. Kırığın birinci günü hematoma oluşur, mezenkimal hücreler bu bölgelere göç eder. Kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerde osteojenik farklılaşma başlar. Preosteoblastlar ve osteoblastların değişim ve başkalaşımı ile birlikte üçüncü gün anjiyogenez başlar. 7 ve 10. günler arasında intramembranöz kemikleşmede hücre proliferasyonu en yüksek seviyededir. Kırıkta oluşumu ve endokondral kemikleşme başlamıştır. Hücre proliferasyonu 14. günde biter ancak osteoblastik aktivite devam eder. Yumuşak kallusun mineralizasyonu ile kırıkta rezorbe olur. Kemik oluşumu 21. güne kadar devam eder. Kemik remodelizasyonu 21. günde başlar ve lameller kemik meydana gelir (43). Mezenkimal kök hücrenin osteosit ve kondrosite dönüşebildiğini gösteren in vitro çalışmalar vardır. Doku tamiri ile ilgili birçok in vivo çalışma yapılmaktadır. Değişik cins birçok hayvanda farklı büyüklükte kemik defektlerinin tamirinde mezenkimal kök hücre kullanılmıştır (44).

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Ünivesitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'na yapılan 09.06.2011 tarih ve 5 sayılı toplantılarda bu çalışma PAUHDEK-20011/027 protokol no 'lu araştırma projesi olarak etik kurul onayı almıştır.

Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu Ve Kültüre Edilmesi

Deneysel çalışma, mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi için 5 adet erkek sıçan, deneysel çalışma için 30 adet (4-6 aylık yaklaşık ağırlıkları 220 g.) dişi Wistar Albino tipi sıçanlarla yapıldı. Tüm denekler için önerilen uygun koşullar sağlanarak, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda ad libitum su ve yem ile beslenerek yapıldı.

Deneysel Uygulama

Bu araştırmada kullanılan bütün kimyasallar Sigma Kimyasallarından temin edilmiştir. Erkek olan 5 adet sıçan sakrifiye edildikten sonra sıçanların femur medullasından alınan trabeküler kemik parçaları antibiyotik (penisilin streptomisin - 250 µl) ve 50 ml DMEM/F-12K (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, A.B.D.) içeren santrifüj tüplerine alındı.

DMEM ile 4 kez yıkama sonrasında 50 ml DMEM/F-12K, 250 µl penisilin streptomisin, 0.5 ml esansiyel aminoasit ve 0,045 gr kollejenaz (Worthington, Lakewood, NJ, A.B.D.) 20 µm çapında filtrelerden (Falcon, Franklin NJ, A.B.D.) geçirilerek hazırlandı. Kemik yüzeyinin, hücre materyallerden temizlenmesi amacıyla, enzimatik yıkım için kemik parçacıkları bu solüsyon içerisinde 3-4 saat 37 derecede bekletildi.

Kemik parçaları % 0.9' luk sodyum klorür ile 3 kez yıkandı. Enzimatik yıkımın durdurulması için %10 fetal bovine serum (FBS) (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA, A.B.D.) kullanıldı. 0,5 ml glutamin, 0.5 ml esansiyel aminoasit, 250 µl penisilin streptomisin ile 45 ml DMEM/F-12K içeren tam besiyeri hazırlandı (DMEM besi yeri).

Kemik parçaları içerisinde tam besiyeri bulunan kültür flasklarına ekildi. Kültür flasklarında adherent hücreler %80'lik bir yoğunluğa eriştiğinde (yaklaşık olarak 3-4 hafta), %0.25'lik tripsin (Type II-S, Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) içeren EDTA solüsyonu kullanılarak kültür plakların tabanına yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlandı.

Kök hücrelerin karakterizasyonu

Bu aşamada elde edilen hücrelerin kök hücre karakterinde olup olmadığının belirlenmesi için elde edilen hücrelerin üç ana hücre tipi olan adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşım gösterdiklerini kanıtlama işlemi gerçekleştirildi. Bunu göstermek için aşağıda anlatılan uygun besi yerleri ve boyama materyalleri kullanıldı.

Osteojenik Ve Adipojenik Tek Tabaka Haline Gelen Kültürlerin Farklılaşması

Osteojenik ve adipojenik farklılaşma için $1,5 \times 10^6$ hücre/ml yoğunlukta hücreler her bir kuyucuk için 5×10^3 hücre/cm² olacak şekilde bazal besi yeri ve penisilin streptomisin içeren besiyeri uygulanarak 6 ve 12 well'lik chamber plate'lere ekildi. Tek tabaka haline getirilen kültürlerde osteojenik farklılaşma osteojenik dönüştürücüler kullanılarak, adipojenik farklılaşma adipojenik dönüştürücüler kullanılarak aktive edildi. Kültürlere osteojenik ve adipojenik dönüştürücüler ilave edilmeyerek kontrol grupları oluşturuldu. Osteojenik aktivasyon 3 hafta, adipojenik aktivasyon 2 hafta uygulandı. Kültürler %95 hava ve %5'lik karbondioksit basıncında, 37 °C de inkübasyona bırakıldı. 3 gün ara ile besi yerleri değiştirildi.

Oil Red O boyama solüsyonu hazırlanması:

0.5 gr Oil Red O boyası (Zymed) 100 ml izopropanol içine eklenerek 4 saat cam şişede karıştırıldı. Kurutma kağıdı kullanılarak boya filtre edildi. Hazırlanan Oil Red O çalışma solüsyonu 2/3 oranında distile su ile dilüe edildi.

Fiksatif Solüsyonu Hazırlama

11 ml %37'lik formaldehit, 29 ml PBS kullanılarak %10'luk fiksatif solüsyonu hazırlandı.

- 1) Midyumu tamamen kaldırdıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı.
- 2) Hücre yüzeyi kuruduktan sonra %10'luk formaldehit kullanarak hücreler fikse edildi. 30 dakika beklendi
- 3) Fikse edilen hücreler 2 kez PBS ile yıkandı.
- 4) Hazırlanan Oil Red O boyama solüsyonu ile hücreler 1 saat inkübe edildi.
- 5) Boyama solüsyonu hücrelerin üzerinden alınıp PBS ile 1-2 kez yıkama yapıldı
- 6) Hematoksilen eosin ile hücreler zıt boyandı ve distile su ile boyanın yıkanması gerçekleştirildi.
- 7) Adipojenik hücreler mikroskop altında görüntülendi.
- 8) Adipojenik kültür PBS içinde saklandı.

Osteojenik Değişimin Alizarin Red S Boyaması İle Hücre Analizi

- 1) Midyum platelerden kaldırıldıktan sonra PBS ile 1 kez yıkandı.
- 2) Hücreler formaldehit solüsyonu ile 30 dakika fiske edildi.
- 3) 2 kez distile suyla yıkama yapıldı
- 4) Alizarin Red S (Zymed) boyama solüsyonunda (pH 4.2) 2-3 dakika tutuldu.
- 5) Alizarin Red S boyası 3 kez distile su ile yıkandı.
- 6) Hematoksilen eozin ile zıt boyama yapıldı
- 7) Distile su ile boya yıkandı
- 8) Osteojenik hücreler ışık mikroskobu altında görüntülendi.
- 9) Osteojenik kültür PBS içinde saklandı.

Membran Oluşturma

Karakterizasyonu tamamlanan hücreler 5 pasaja kadar çoğaltıldı. 5. pasaja ulaşıldığında kültür flasklarında adherent hücreler %80'lik bir yoğunluğa eriştiğinde (yaklaşık olarak 3-4 hafta), %0.25' lik tripsin (Type II-S, Sigma) içeren EDTA solüsyonu kullanılarak kültür plakların tabanına yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlandı. Hücreler petri kaplarının tabanından kaldırıldı. Mikroskop altında hemositometri sayımları gerçekleştirildi ve 2×10^4 h/cm² olacak şekilde 100 mm' lik petrilere ekildi.

İndüklenmemiş kök hücre içeren grupta hücre kültürü için DMEM besi yerinin içine sadece 50 µg /ml olacak şekilde askorbik asit ilave edilerek besi yeri hazırlandı.

Osteojenik olarak indüklenen grupta DMEM besi yerinin içine ilave olarak 50 µg/ml askorbik asit ve ikincil ilave olarak 10^{-7} M/ml deksametazon üçüncü ilave Gliserophosfat Disodium Salt Hydrate 10 mM olacak şekilde besi yeri hazırlandı. Petrilerin tabanında oluşan membranların mikroskopik olarak gösterilmesi ile hücre kazıyıcılar ile (cell scraper) membrana zarar vermeden kazınarak membranlar kaldırıldı.

Oluşturulan Membranların Osteojenik Karakterinin Gösterimesi

Bu amaçla tarif edildiği gibi 3 hafta ilgili besi yerleri içinde muamele edilen membranların 3 hafta sonrasında % 10 luk formaldehit solusyonu içinde tespit edildikten sonra mineralizasyonun tespiti için Alizalin Red S boyası ile 2-3 dakika boyandı.

Histolojik Bulguların RT- PCR İle Teyit Edilmesi

Osteojenik belirteçler olarak kollajen tip I, alkalen fosfataz, osteokalsin, Osteopontin gibi spesifik primerler kullanılmıştır.

Cerrahi Yöntem

Ağırlıkları (ort.220 g) ve yaşları (3-6 ay) birbirine eşit, dişi 30 sıçan rastgele her grupta 10 sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı.

Sıçanlara intraperitoneal 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun® ;Bayer) ve ketamin hidroklorür (Ketalar®,Eczacıbaşı ilaç Sanayi ve Ticaret A.Ş) ile genel anestezi uygulandı. Traşlama sonrası sıçanların sağ uyluk laterali povidin iyot (Betadine®) ile boyanıp steril olarak cerrahiye hazırlandı.

Tüm sıçanların sağ uyluk lateraline 3 cm lik cilt insizyonu uygulandı. Femur cismine ulaşmak için hamstring ve vastus lateralis adele grupları arasından girildi. Kaslar mediale ve laterale ekarte edilerek kemik doku açığa çıkarıldı. Sıçan femurlarının shaftına kıl testere kullanılarak transvers olarak kırık oluşturuldu. Takiben sıçan femurunun trokanter major tipinden 18 g spinal iğne yardımı ile medullar kanala

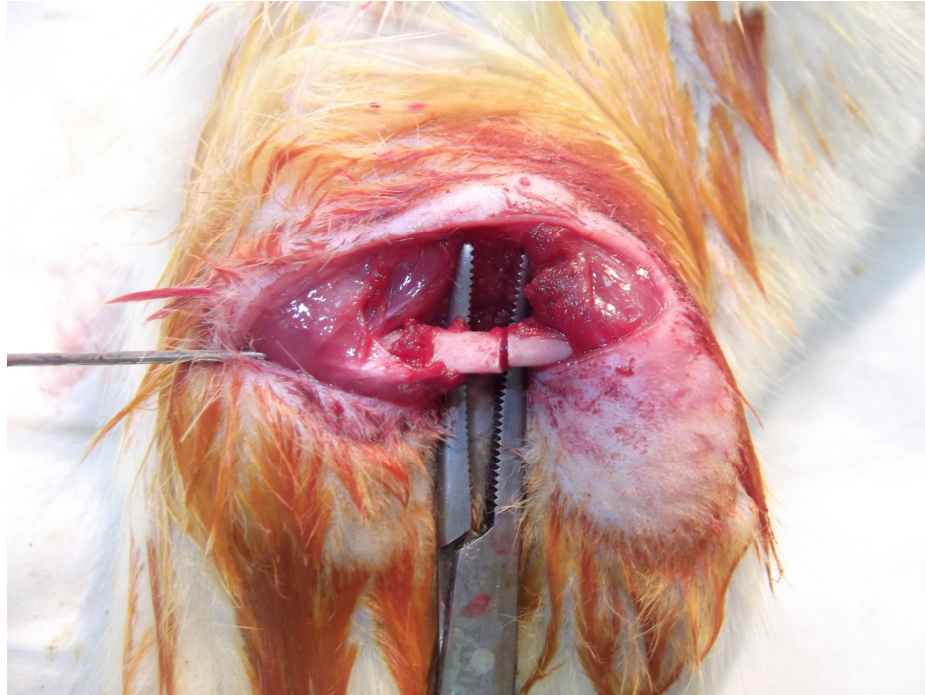
delik açılarak girildi. Aynı boyutlarda Krishner telleri (1,8 mm) kullanılarak femoral kanal içerisinde gönderildi. Kırık hattının fiksasyonu için kırık uçları arasında 1 mm lik boşluk bırakılarak kemik defekti modeli oluşturulacak şekilde fiksasyon sağlandı.

Üç gruba ayrılan sıçanlardan osteo deney grubuna kırık fiksasyonu intrameduller olarak sağlandıktan sonra kemik defekti oluşturulan alanın etrafına defektli bölgeyi 360 derece saracak şekilde hazırlanmış olduğumuz osteojenik indüklenmiş kök hücre membranını uyguladık.

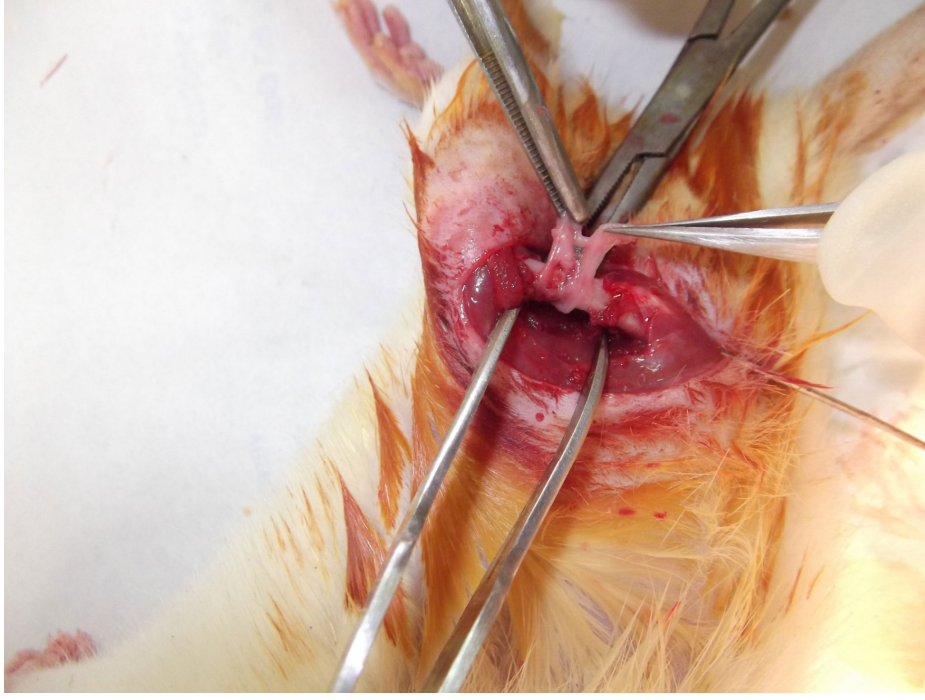
İndüklenmemiş deney grubu sıçanlara indüklenmemiş kök hücre membranını intrameduller kırık fiksasyonunun ardından yine defektli bölgeyi 360 derece saracak şekilde uygulandı.

Kontrol grubu sıçanlara da sadece aynı özellikte kırık oluşturuldu ve intrameduller K teli ile fiksasyon sağlandı.

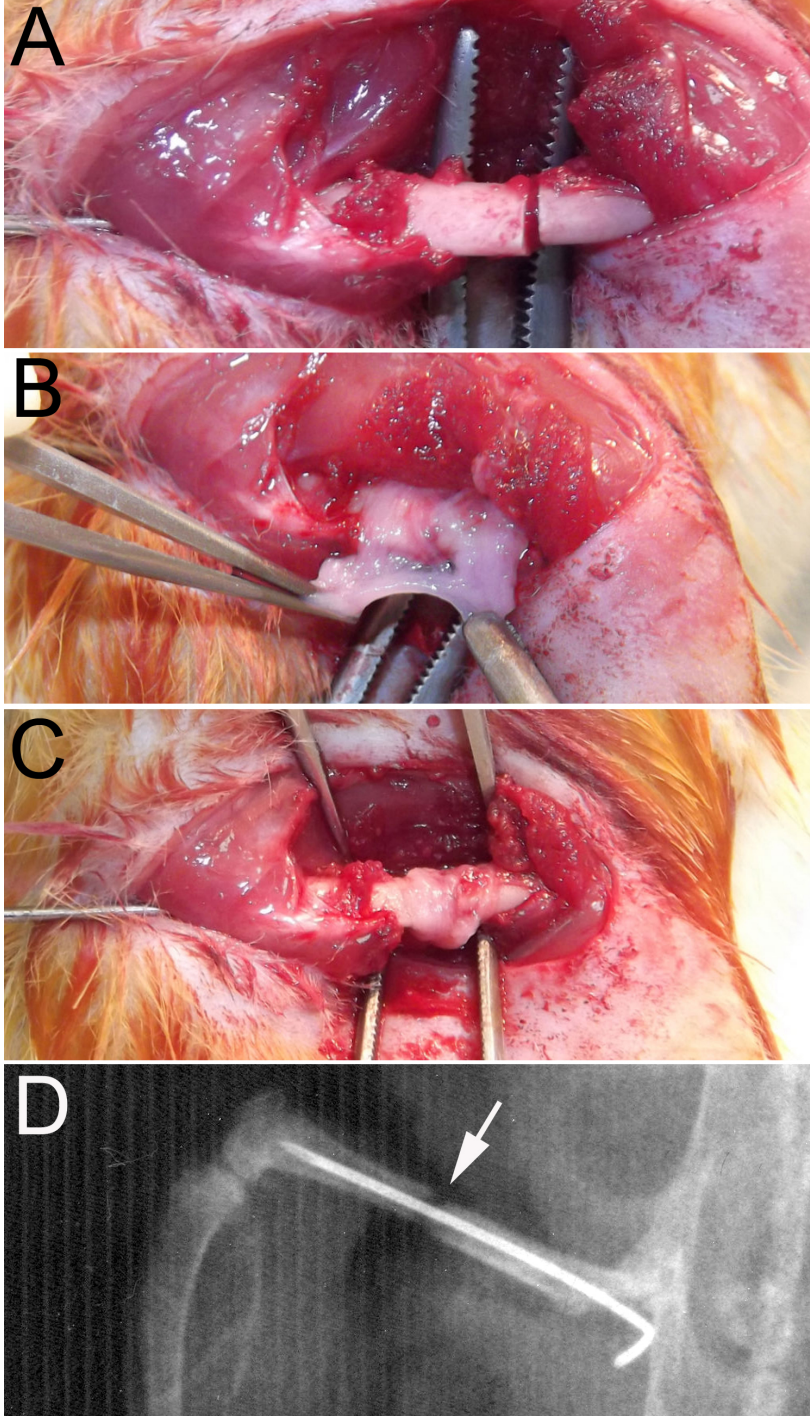
Trokanter tipindeki kirshner telinin kemik dışında 2 mm lik kısmı cilt altında kalacak şekilde kesilerek cilt kapatıldı.



Resim 1: Sıçan femurlarına kırık oluşturma ve intrameduller fiksasyon.



Resim 2:Femurdaki kırık hattına kök hücre membranının sarılma aşaması



Resim 3: Sıçan femurlarına mezenkimal kök hücre membranı uygulanması
A) Sıçan femurlarına transvers kırık oluşturularak her iki kırık hattı arasında 1 mm boşluk bırakılarak defekt oluşturuldu. Trokanter major tipinden gönderilen k teli ile intramedüller fiksasyon sağlandı. B) Kırık hattı çevresine kök hücre membranının steril koşullarda kırık hattına uygulanışı. C) Kırık hattı çevresini 360 derece saracak şekilde kök hücre membranının yerleştirilmesi. D) Membran uygulama işlemi sonrası radyografik görüntü.

Tablo 2. Cerrahiye Alınan Sıçanlara Uygulanan Membran Tipi Ve Sıçan Sayısı

	Osteojenik grup	İndüklenmemiş grup	Kontrol grubu
2. Hafta	2 sıçan	2 sıçan	2 sıçan
4. Hafta	2 sıçan	2 sıçan	2 sıçan
6. Hafta	3 sıçan	3 sıçan	3 sıçan
8. Hafta	3 sıçan	3 sıçan	3 sıçan

Birinci grup sıçanlara kırık + intrameduller fiksasyon + osteojenik farklılaştırılmış kök hücre membranı (osteo grubu). İkinci grup sıçanlara farklılaştırılmamış kök hücrelerden oluşturulmuş membran (indüklenmemiş grup) Üçüncü grup sıçanlara sadece kemikte defekt+fiksasyon uygulandı (kontrol grubu). Cerrahi işlemlerin ardından cilt altı absorbe olan sütür materyali ile cilt absorbe olmayan dikişlerle kapatıldı. Yara yeri povidin iyot ile temizlendi. Cerrahi işlem bitirildi.

Radyolojik Değerlendirme

Her gruptaki sıçanlara ait operasyon uygulanan femurlarına 0.gün, 2. hafta, 4. 6. ve 8. haftada direk grafî çekildi. Röntgen çekimleri CE marka röntgen cihazı ile ışın tüpü kemik örneklerine 100 cm mesafede olacak şekilde 55 kV ve 6.25 mAS/s de yapıldı. Elde edilen dijital röntgen görüntüleri fotoğraflanarak bilgisayara aktarıldı. Radyolojik değerlendirmede radyolojik kaynamanın göstergesi olan anteroposterior ve lateral planda 3 kortekste kaynama bulgusunun oluşması esas alındı. Anteroposterior ve lateral planda kortekslerin 3 ünde kaynama olduğu görülenler kaynamış kemik olarak değerlendirildi.

Sakrifikasyon Aşaması

İkinci haftada çalışmadaki gruptaki sıçanlardan osteojenik indüklenmiş membranlı gruptaki iki sıçan, indüklenmemiş gruptaki iki sıçan, kontrol grubundaki iki sıçan toplam altı sıçan ameliyattan sonraki 2. haftada yüksek doz lokal anestezi madde verilerek sakrifiye edildi.

Dördüncü haftada her gruptan 2 sıçan toplamda altı sıçan radyolojik görüntüleme yapıldıktan sonra sakrifiye edildi.

Altıncı haftada her gruptan 3 sıçan,8. haftada her gruptan 3'er sıçan radyolojik görüntüleri alındıktan sonra sakrifiye edildi. Sıçanların femurlarını incelemek için kalça ve dizden dezartikülasyon yapıldı. Yumuşak dokusuyla birlikte 2 gün % 10'luk formaldehit solusyonunda bekletildikten sonra kemik defektinde oluşan kallus dokusuna zarar vermemeye özen gösterilerek femurların çevresindeki yumuşak dokular sıyrıldı ve intramedüller tespit materyalleri çıkarıldı.

Sakrifikasyon Sonrası Makroskobik Değerlendirme

2, 4, 6 ve 8. haftalarda yapılan sakrifikasyondan sonra sıçan femurlarının kırık hatlarındaki yumuşak dokular oluşabilecek olan kallus dokularına zarar vermeyecek şekilde temizlendi. Temizleme sonrası her grup femurun kaynama dokularının değerlendirilmesi makroskobik olarak yapıldı. Makroskobik inceleme yapılan rat femurlarının örnek teşkil edecek birer tanesinin görüntüleri resim 4 ve 5 de gösterildi.

Histolojik İnceleme Aşaması

Sakrifikasyon sonrası üzerlerindeki yumuşak dokulardan arındırılmış sıçan femurları fiksasyon için % 10 formaldehid solusyonunda bekletildi. Ardından materyalleri dekalsifiye etmek için % 8 lik formik asit stok solüsyonu+% 8 lik hidroklorik asit solüsyonu eşit oranda karıştırıldı. Kemik dokudaki kalsiyum uzaklaşana kadar solüsyonda bekletildi. Materyaller su ile yıkandı. Materayallerin kırık hattı ortada kalacak, kallus dokularını içine alacak şekilde ve uzun eksene paralel kesitler olacak şekilde makroskopik kesitler alındı. Kesitler alındıktan sonra takip aşamasına geçildi. % 70 , %80 , % 90 , %100 lük alkol serilerinde 1' er saat tutuldu. Ardından 2 saat ksilen solusyonunda, 2 saat sıvı parafinde bekletildi. Bloklama işleminden sonra 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. 1 saat etüvde, 1 saat ksilende beklettikten sonra %100, 90, %80 ,%70 lik alkol solüsyonlarında toplam 15 dk bekletildi. Su ile yıkandı. Hematoksilende 3 dakika bekletilme sonrası su ile yıkandı. % 1'lik asit alkol solusyonuna batırılıp çıkarıldı. Tekrar su ile yıkandı.

Amonyaklı suya(% 1'lik) batırılıp çıkarıldı. Tekrar su ile yıkandı. Eosinde 30 sn bekletildi. Su ile yıkanma sonrasında % 70 , %80 , % 90 , %100 lik alkol serilerinde 10-15 dakika tutulduktan sonra ksilende 10 dk bekletildi. Entellan ile kapatma işlemi yapıldı. Preparatlar mikroskobik incelemeye hazır hale getirildi.

BULGULAR

Yaptığımız çalışmada oluşturulan her üç gruptaki sıçanların çalışmanın başlangıcında eşit ağırlıkta ve ortalama aynı yaşta olmasına dikkat edildi. Ortalama ağırlıkları 220 gram, ortalama 3-6 aylık sıçanlar seçildi.

1. Grup sıçanlar osteojenik yönde farklılaştırılmış kök hücre membranı uygulanan (osteo grubu).
2. Grup sıçanlar osteojenik farklılaştırmaya uğratılmamış kök hücre membranı uygulanan (indüklenmemiş grup).
3. Grup ise sadece kırık oluşturulup herhangi bir kök hücre uygulanmamış grup olarak belirlendi (kontrol grubu).

Cerrahi işlem uygulama sonrasında ikinci haftada her gruptaki ikişer sıçan grafi çekimi sonrası sakrifiye edildi.

Dördüncü hafta sonunda her gruptan ikişer sıçan sakrifiye edildi.

Altıncı haftada her gruptan 3 er sıçan, sekizinci haftada her gruptan 3 er sıçan sakrifiye edildi.

Sakrifikasyon öncesi her sıçanın opere edilen ekstremitelerine grafi çekildi. Bu grafilere bir tanesi başlangıç grafisi olarak resim 3 te gösterildi. Sakrifikasyon sonrası sıçan femurları proksimalde kalça ekleminde distalde diz ekleminde dezartiküle edilerek femurları çıkarıldı. Çıkarılan femurlar yumuşak dokularının fiksasyonu için 1 gün %10 luk formaldehit solüsyonunda bekletildi. Ardından makroskopik incelemeye tabi tutuldu.

Makroskopik Bulgular

İkinci hafta:

Sakrifiye edilen sıçan femurlarının makroskopik incelenmesi sonunda;

Osteojenik indüklenmiş kök hücre membranı uygulanmış olan gruptaki (osteo grubu) sıçanların kırık hattında membranın konulduğu seviyelerden itibaren geniş bir kallus dokusunun gelişmiş olduğu görüldü. Tespit materyalinin çıkarımının ardından

yapılan değerlendirmede kırık hattında anteroposterior ve lateral planda minimal hareket olduğu gözlemlendi.(Resim 4 C)

Osteojenik farklılaştırılmamış kök hücre membranı uygulanan grup (indüklenmemiş grup) femurlarda çevre yumuşak dokulardan arındırma sonrasında defektli alanda kaynama bulgularının olmadığı kallus dokusunun makroskopik olarak gelişmediği görüldü. Kırık hatlarının birbirine hiç tutunmadığı gözlemlendi. İntrameduller tespit materyalinin çıkarılmasının ardından kırık hattı tamamen birbirinden ayrıldı (Resim 4 B).

Kontrol grubunun yumuşak dokuları temizlendikten sonra kırık hattında yine kaynama bulgularının hiç olmadığı görüldü. Ve intrameduller tespit materyali çıkarıldıktan sonra kırık hattının tamamen birbirinden ayrıldığı görüldü (Resim 4 A)

Sonuç olarak 2. haftada osteojenik indüklenen grupta yumuşak kallus dokusunun diğer gruplardan farklı olarak erken dönemde oluştuğu görüldü. Tüm bu işlemler sonrasında sıçan femurları % 10 luk formaldehit solusyonuna konuldu. Histolojik inceleme için bekletildi.

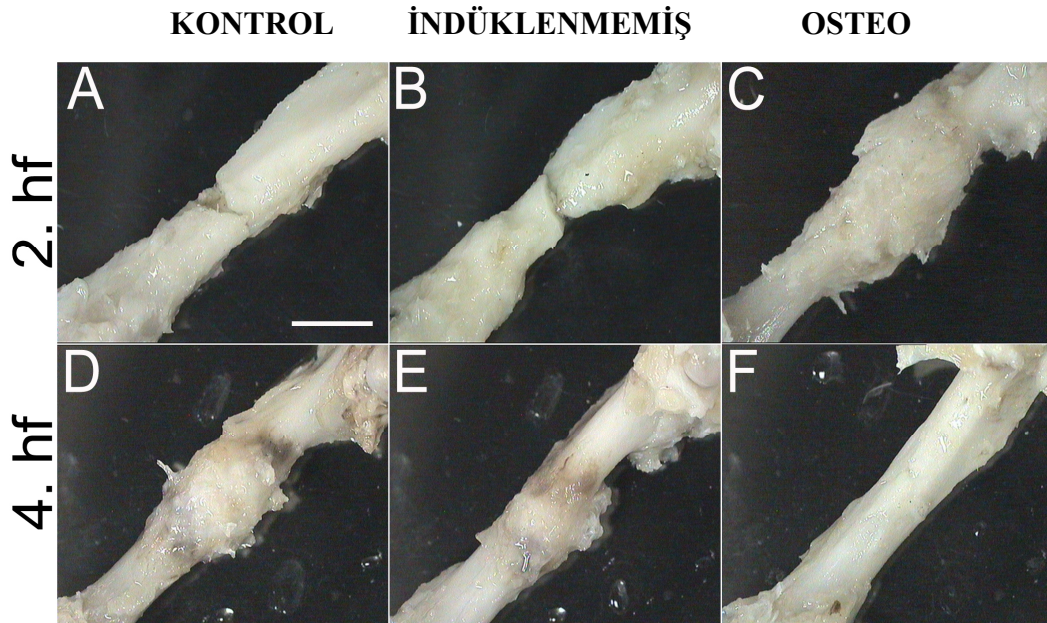
Dördüncü hafta: Her grup sıçandan 2' şer tane sıçan olacak şekilde sakrifikasyon işlemi tekrarlandı. Sakrifiye edilen femurlar çevrelerindeki yumuşak dokulardan arındırıldıktan sonra her gruba örnek teşkil edecek olan birer tanesinden fotoğraf çekilerek örneklendi.(Resim 4 E,F,G)

Osteojenik kök hücre membranı uygulanmış gruptaki sıçan femurlarının 4. haftada yumuşak dokudan ayrıştırma sonrasındaki değerlendirmelerinde; kırık çevresindeki kallus dokusunun kemik dokuya benzer şekilde sertleştiği görüldü. Kırık hattında intrameduller tespit materyalinin çıkarılmasının ardından patolojik hareket saptanmadı. Kemik bütünlüğü tama yakın yeniden sağlanmış çevre kallus dokularının kemik yapısında ve sertleşmiş olduğu görüldü (Resim 4 F).

Osteojenik farklılaştırılmamış (indüklenmeyen grup) kök hücre membranı uygulanan grup sıçan femurları 4. haftada yumuşak dokularından arındırıldı. Kırık hatları açıldığında yumuşak kallus dokusunun oluştuğu fakat kaynamaya yeterli olmadığı görüldü. 4. hafta indüklenmemiş kök hücre membranı uygulanan grup 2. hafta osteojenik gruplarla karşılaştırıldığında kallus dokusunun büyüklüğü de osteojenik gruba göre çok az ve sadece kırık olan bölgeye lokalize olduğu görüldü.

Kırık için uygulanmış intrameduller fiksasyon materyali çıkarıldığında indüklenmemiş tüm sıçan femurlarında kırık hattında hem anteroposterior hem lateral planda hareketin olduğu görüldü. Bu femurların bir tanesi örnek olması açısından resimlenerek gösterildi (Resim 4 E).

Kontrol grubu sıçanlarda 4. hafta yumuşak dokuları temizleme işleminden sonra sıçan femurlarında makroskobik değerlendirmelerinde kırık hattında yine kallus dokusunun oluştuğu görüldü. Ancak yine oluşan bu kallus dokusu sadece kırık hattına lokalize osteojenik grupta 2. haftada elde edilen kallus dokusu gibi geniş bir alanda olmadığı görüldü. Oluşan kallus dokusu yumuşak kıvamda olup, kırık hattında patolojik hareket olduğu, kaynama bulgularının gelişmediği görüldü (Resim 4 D).

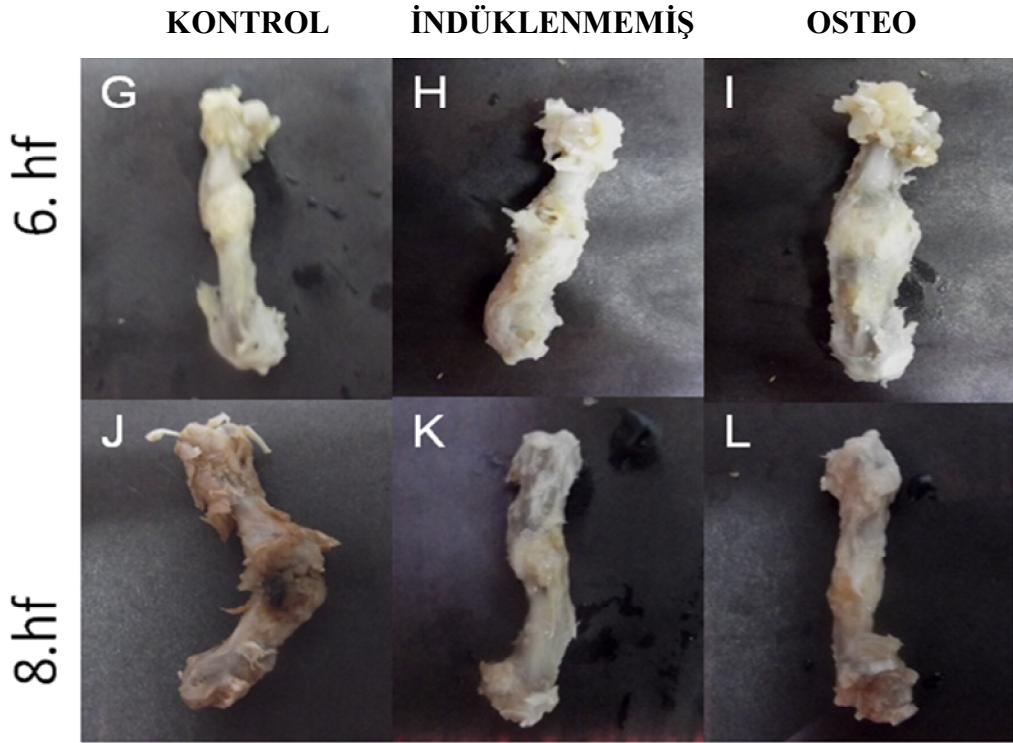


Resim 4: Sakrifikasyon ve Yumuşak Dokulardan Arındırma Sonrası Sıçan Femurlarının 2. ve 4 haftadaki Makroskobik Görüntüleri.

A) Kontrol grubu 2. hafta görüntüsü: kırık hattında kallus dokusunun oluşmadığı kaynama dokularının oluşmadığı görülmekte B) İndüklenmemiş grup: kırık hattında kallus dokusunun ve kaynama bulgularının olmaması dikkat çekici C) Osteo grubu: 2. haftada diğer gruplardan farklı olarak kırık bölgedeki kallus dokusunun belirginliği dikkat çekici D) 4. hafta kontrol grubun: kallus dokusu oluşmuş fakat sadece kırık hattında sınırlı E) İndüklenmemiş grup: 4. hafta görüntüsü kallus dokusu var fakat sadece kırık hattına lokalize ve küçük F) 4. hafta osteo grubu: makroskobik olarak kırık bölgenin tamamen onarıldığı görülmekte.

Altı ve sekizinci hafta:

Altı ve 8. haftalardaki makroskopik bulgularımızda hem kontrol grubunda hem de indüklenmemiş membran kullanılan gruptaki sıçan femurlarında oluşan kaynama dokularının 4. Haftadaki osteojenik grupta elde edilen kaynama bulgularına erişmediği görüldü. Makroskopik incelemede sıçan femurlarının intramedüller tespit materyalleri çıkarıldığında hem anteroposterior hem de lateral planda kırık hatlarında hareket olduğu görüldü. Oluşan kallus dokuları yine osteojenik indüklenmiş membran kullanılan sıçan femurlarının kallus dokusu kadar geniş bir alanda olmadığı kallus dokularının sadece kırık hattı çevresine sınırlı ve kırık uçlarının birbirine tutunmasına yeterli olmayacak düzeyde oldukları görüldü (Resim 5). Tüm sıçan femurları makroskopik incelemenin ardından fiksasyon için % 10 luk formaldehid solusyonuna alınarak histolojik inceleme yapılmak üzere saklandı.



Resim 5: Altıncı ve 8. hafta sıçan femurlarının makroskopik görüntüsü

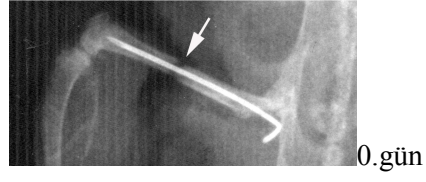
Radyolojik Bulgular

Çalışmamızda tüm sıçanların 0. gün, 2 haftalık, 4. haftalık, 6. haftalık ve 8 haftalık grafileri çekildi. 0. Gün grafileri ile sıçanların kırık femurlarına uygulanan cerrahi ve fiksasyonlar değerlendirildi. Çekilen grafiler sonrası tespitlerin yeterliliği görüldü ve daha sonraki grafiler için başlangıç noktası olarak değerlendirildi.

Sıçanlara 2. haftada direk grafi çekildi. Çekilen grafilerde indüklenmemiş grupta osteojenik grupta ve kontrol grubunda kırık hattında kaynama bulgularının oluşmadığı görüldü. Tüm grafilerde kırık hatlarının ayırık olduğu ve kallus dokusunun henüz oluşmadığı saptandı.

Dördüncü hafta grafileri değerlendirildiğinde ise hem kontrol hem de indüklenmemiş grup sıçan femur kırıklarında kırık hattında kaynama yani kallus dokusu formasyonunun oluşmadığı gözlemlendi. Osteo grubunda ise 4. haftada kallus dokusunun oluştuğu hatta kırık hattının kaybolmaya başladığı yani remodeling evresinde olabileceğini düşündüren bulgulara rastlandı. Osteojenik indüksiyon uygulanan grupta diğer gruplardan farklı olarak kırık iyileşme evrelerinin hızlı ilerlediği çekilen grafilerde saptandı. Bulguları desteklemek için kontrol ve indüklenmemiş grup sıçan femurlarının 6. ve 8. hafta görüntüleri de çalışmaya eklendi. 8. haftanın sonunda her iki indüklenmemiş grup ve kontrol grubu sıçan femurlarında radyolojik kaynama bulgularının oluşmadığı gözlemlendi. Bu bulgular ışığında hem makroskobik hem de radyolojik bulgulara dayanarak osteojenik indüksiyon uygulanan membranların kırık kaynamasını olumlu yönde etkilediği hipotezi desteklenmiş oldu.

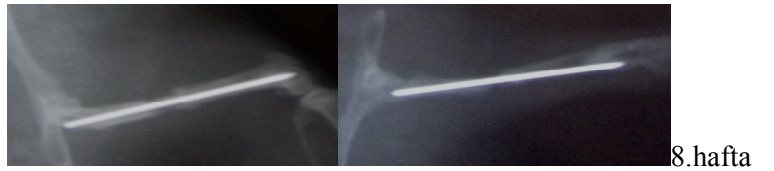
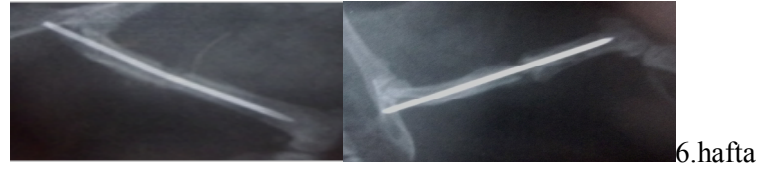
Osteojenik grupta 4. haftada tam kaynama elde edildiği için ve bu gruba ait dokuların radyolojik, makroskobik ve histolojik incelemelerinde kaynamanın gösterilmesi dolayısıyla osteojenik gruba ait 6. ve 8. hafta dokularına ayrıca histolojik doku takibi gerçekleştirilmemiştir. 6. ve 8. haftaya ait toplam 6 sıçanın makroskobik incelemelerinde kırık iyileşmesi gözlemlenmiştir.



OSTEOJENİK GRUP

İNDÜKLENMEMİŞ GRUP

KONTROL GRUBU

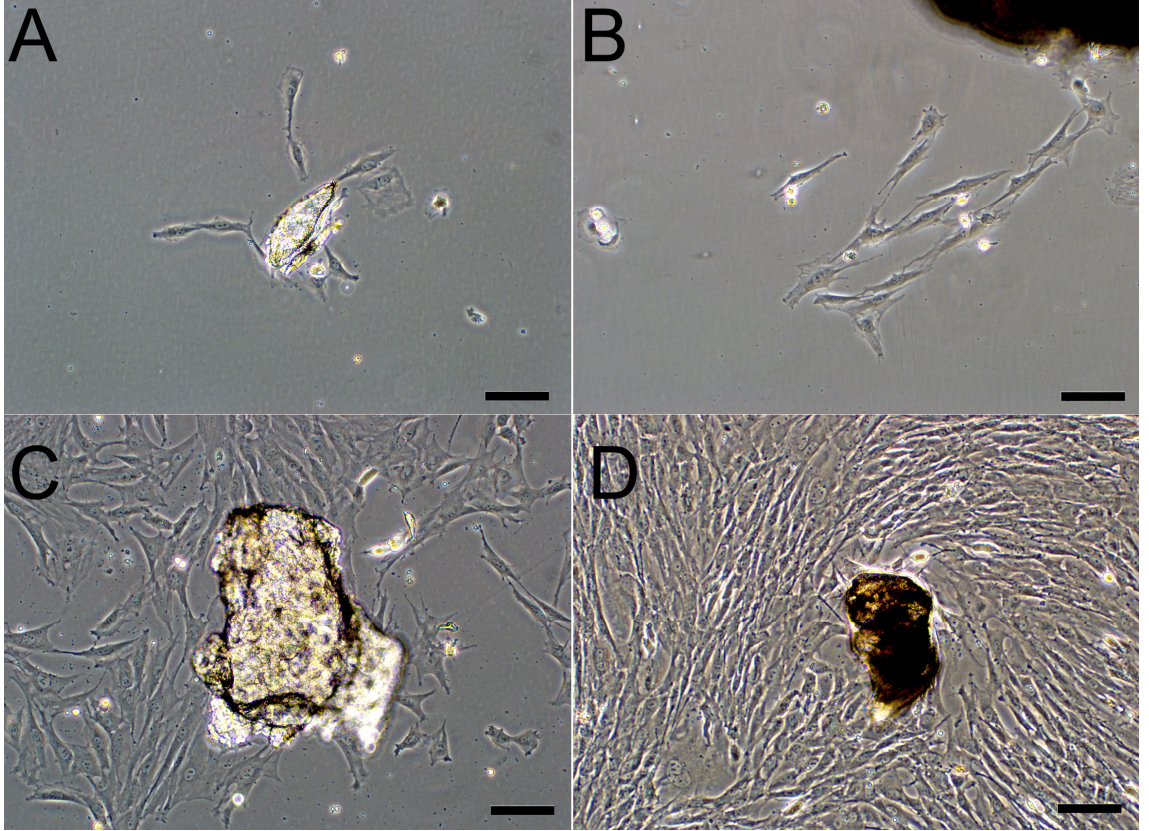


Resim 6: Sıçan femurlarının 0-2-4-6-8 hafta radyolojik görüntüleri
Sıçan femurlarının aralıklı radyolojik görüntüleri osteojenik indüksiyon uygulanan grup sıçan femurlarında 4. Haftada tam kaynama gözlenirken kontrol ve indüklenmemiş membran uygulanan gruplarda 8. Haftanın sonunda halen kaynama bulgularının oluşmadığı görülmekte

HİSTOLOJİK BULGULAR

Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerin Trabeküler Kemikten İzolasyonunda Elde Edilen Bulgular

5 adet sıçan femurundan alınan trabeküler kemik parçaları enzimatik yıkımdan sonra 100 mm lik petri plaklarına ekildi. Üzerine besi yeri ilave edildi. Besi yeri 3 günde bir değiştirilerek mezenkimal kök hücreleri çoğaltıldı. (Resim 7) 7. Günde mezenkimal kök hücreleri migrasyonla petri kabında mikroskopik olarak görülmeye başlandı. 10 günde migrasyon ve proliferasyon ile petri kabında sayıca çoğaldıkları görüldü. 2. haftada sayılarının arttığı ve 3. hafta sonunda da petri babının tamamen kök hücrelerle dolduğu görüldü.



Resim 7: Kök hücrelerin izolasyonu ve çoğaltılması

A) 7. gün trabeküler kemikten migrasyonla ayrılan mezenkimal kök hücre B) 10. gün migrasyon ve proliferasyonla sayıca artan mezenkimal kök hücreler C) 2. hafta sonunda mezenkimal kök hücrelerin görüntüsü D) 3. hafta mezenkimal kök hücrelerin petri kabının tamamını kaplamış hali. Bar = 100 µm.

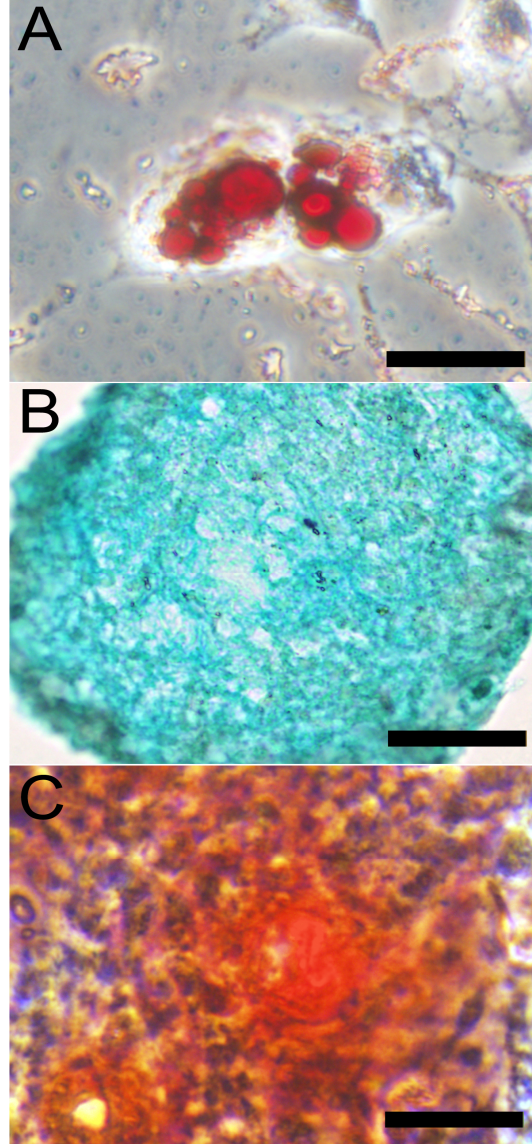
Mezenkimal Kök Hücrelerin Değişim Potansiyellerinin Gösterilmesinde Elde Edilen Bulgular

Bu hücrelerin mezenkimal kök hücreleri olduğunu kanıtlamak için hücrelerin değişim potansiyelleri gösterildi. Mezenkimal kök hücrelerin 3 ana özelliği; Yağ dokuya dönüşebilmeleri, kemik dokuya dönüşebilmeleri ve kıkırdak dokuya dönüşebilmeleri gösterildi.

Yağ hücrelerine dönüşümün gösterilmesi için 2-3 haftalık inkübasyon sonrası Oil Red O boyası ile kırmızı renye boyanan hücreler yağ hücrelerine dönüşümün gerekleştiiğini gösterdi.

Kemik dokuya dönüşüm için 3 haftalık inkübasyon ile Alizalin Red S boyası ile kalsifikasyon odaklarının görülmesi kemik dokuya dönüşümü gösterdi. Kıkırdak dokuya dönüşüm ise 3. hafta sonunda santrifüj sonrası besi yerine kondrojenik indükleyici olan TGF-beta verilmesi ile kıkırdak matriksindeki glikozaminoglikan sentezi gösterildi.

Elimizdeki hücrelerin mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özelliği olan her  ana hücre tipine dnşebildiğinin gösterilmesi üretilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğunu göstermiştir (Resim 8).

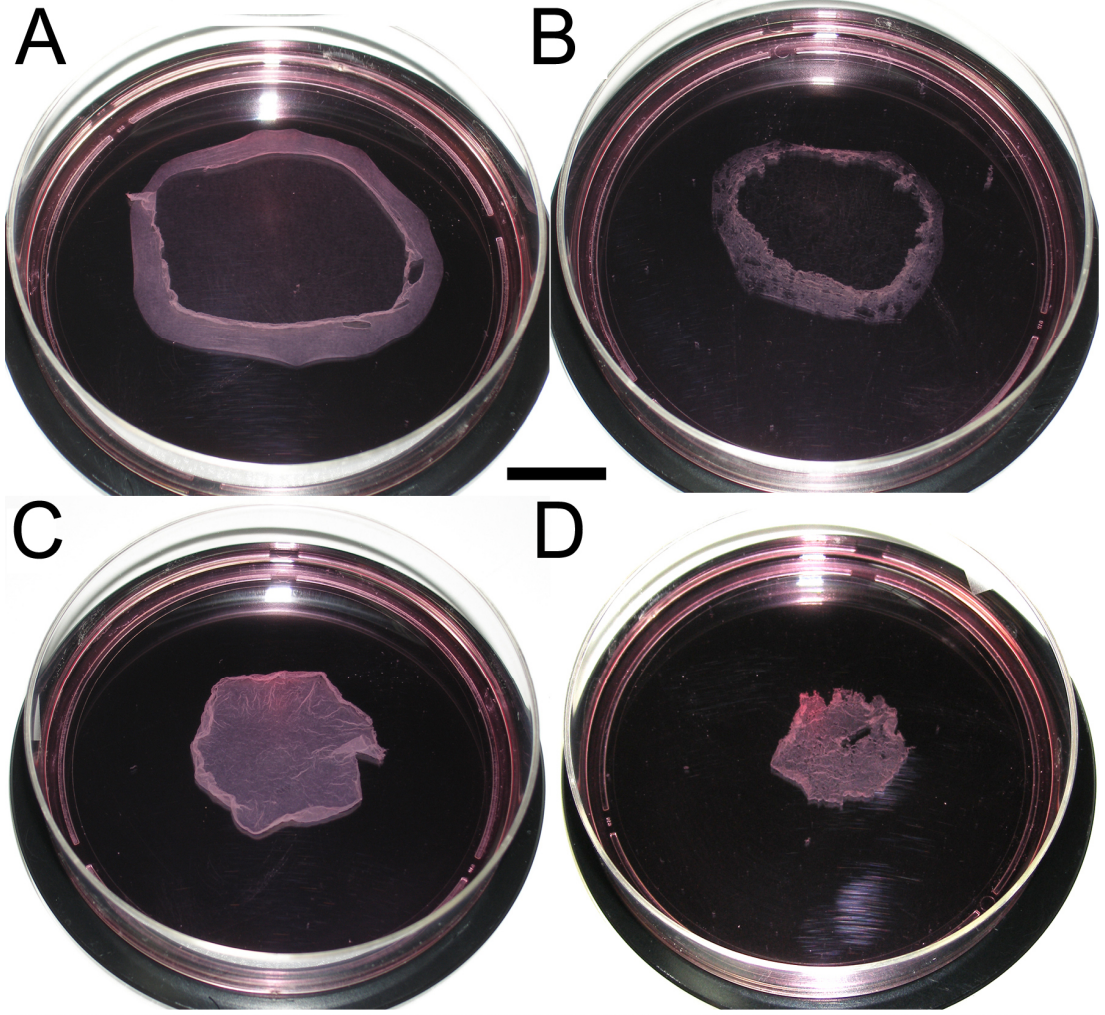


Resim 8: Kök Hücrelerin Karakteristik Özelliklerinin Gösterilmesi

A) Oil Red O boyası ile yağ hücrelerinin boyanması B) Alizarin Red S boyası ile kemik dokudaki kalsifikasyon odaklarının görüntülenmesi C) Alcian Mavis ile kıkırdak matriksindeki glikozaminoglikanların gösterilmesi. Bar = 20 µm.

3 hafta indüklenen ve 3 günde bir besi yeri değiştirilerek hücreler idame edildi. 3. haftanın sonunda petrilerin tabanında oluşan mebranlar mikroskopik olarak gözlendi. Hücre kazıyıcılar ile membranlara zarar vermeden mikroskop altında kazınarak kaldırıldı (Resim 9). Membranlar kaldırıldıktan sonra mikroskop altında incelendi. İndüklenmemiş grup membranların daha kalın ve manuple edilebilir olduğu görüldü. İndüklenen grup membranların ise daha ince ve kolay yırtılabilir olduğu tespit edildi (Resim 9 C ve D). Bu membranlar kısa bir süre bekletildiğinde içerdikleri kollajenle orantılı olarak büzüştükleri görüldü. Membranlar cerrahi

uygulama yapılana kadar ayrı besiyerleri içinde saklanarak 37 derecede operasyon odasına steril olarak nakledildi.



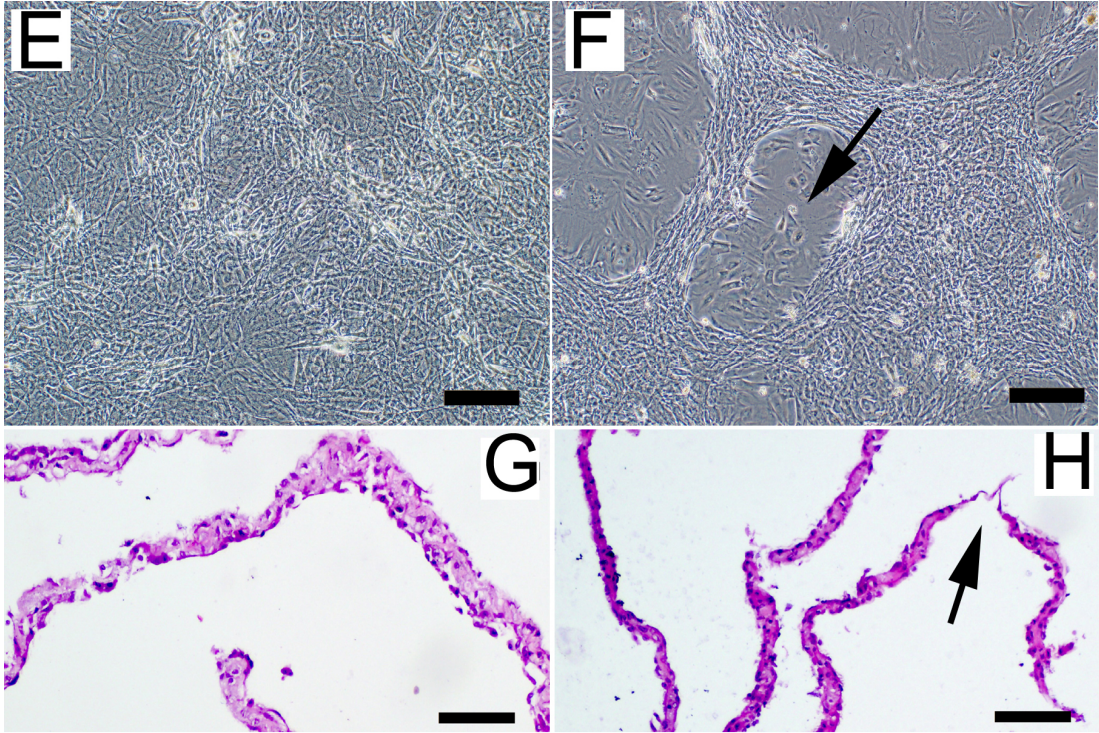
Resim 9: Kök hücre membranlarının görüntüsü

A) Osteojenik indüksiyon uygulanan membranın görüntüsü B) Osteojenik indüksiyon uygulanmamış kök hücre membranının görüntüsü C) Osteojenik indüksiyon uygulanmamış kök hücre membranının hücre kazıyıcılar ile kaldırılmış hali D) Osteojenik indüksiyon uygulanmış olan kök hücre membranının hücre kazıyıcılar ile kaldırılmış hali. Bar:2mm

Aynı membranlardan alınan örneklerde gerçekleştirilen histopatolojik analizlerden yukarıda tarif edildiği gibi indüklenmemiş grubun histoloji

görüntüsünde 3 veya 4 hücre kalınlığında bütünlüğü daha kolay korunan membranlar elde edildiği gözlemlendi.

Osteojenik indüksiyon uygulanan grupta ise makroskopide tespit edilen daha ince ve gözenekli yapı mikroskopik olarak da gözlemlenmiştir (Resim 10 E ve F).



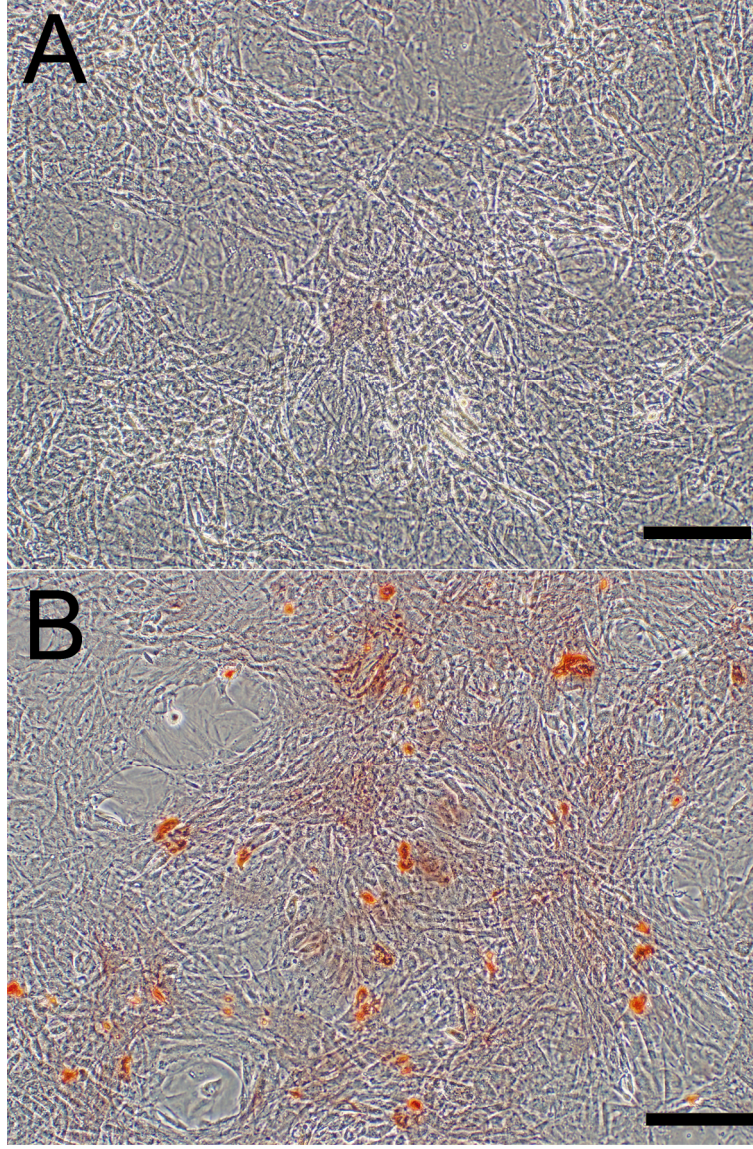
Resim 10: Kök hücre membranlarının mikroskopik görüntüsü

E) Osteojenik indüklenmiş membranın mikroskopik görüntüsü F) Osteojenik indüklenmiş kök hücre membranının mikroskop altındaki görüntüsü ok ile işaretlenmiş alanlar: Osteojenik indüklenmiş kök hücre membranlarının hücre yoğunluğunun az olduğu alanlardır. Bar:200 mikron G) Osteojenik olarak indüklenmemiş membranın mikroskopik görüntüsü H) Osteojenik olarak indüklenmiş membranın mikroskopik görüntüsü Bar:100 µm

Oluşturulan Membranların Osteojenik Karakterinin Gösterilmesi

Bu amaçla tarif edildiği gibi 3 hafta ilgili besi yerleri içinde muamele edilen membranların 3 hafta sonrasında % 10 luk formaldehit solüsyonu içinde tespit edildikten sonra mineralizasyonun tespiti için Alizalin Red S boyası ile 2-3 dakika boyandı. İndüklenen grup ile indüklenmeyen grup alizalin red boyası ile karşılaştırıldığında osteojenik indüksiyon uygulanan kök hücre membranı grubunda

boyanmanın indüksiyon uygulanmayan gruba oranla belirgin şekilde fazla olduğu gösterilmiştir.



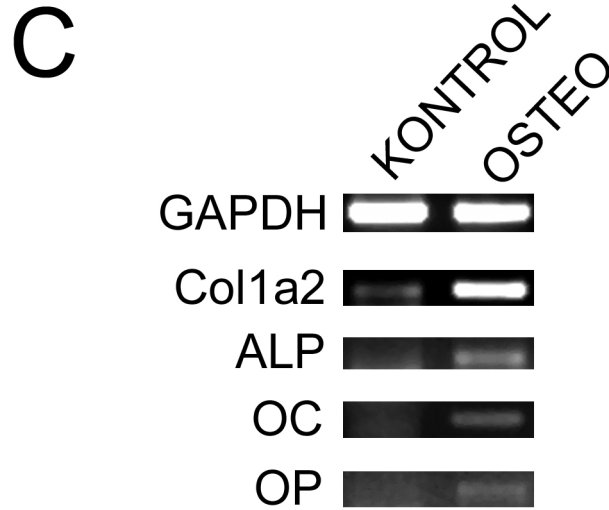
Resim 11: Membranların Alizalin Red S boyası ile boyanması

A) Osteojenik indüksiyon yapılmamış grup B) Osteojenik indüksiyon yapılmış grup. İndüksiyon yapılmayan gruba göre mineralizasyonu gösteren kırmızı boyalı alanlar dikkati çekmekte Bar:200 μ m

RT-PCR Yöntemi İle Histolojik Bulguların Teyit Edilmesi

Osteojenik belirteçler olarak tip 1 kollajen osteokalsin, osteopontin gibi spesifik primerler kullanılmıştır. Gerçekleştirilen analiz sonucunda osteojenik indüksiyon yapılan grup membranlarda, İndüksiyon yapılmayan gruba oranla ifadelerinde belirgin artış olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak elde edilen bulgular oluşturulan membranların (osteojenik indüklenmiş ve osteojenik indüklenmemiş) amaca yönelik hedeflenen membranlar olarak oluştuğu gösterilmiştir.



Resim 12: Osteojenik indüklenmiş kök hücre membranlarının histolojik bulgularının RT- PCR ile teyit edilmesi.

Tablo-: RT-PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizinleri.			
GEN	R/F	<u>PRİMER DİZİN</u>	NCBI GEN BANKASI NO.
GAPDH	F	<u>GGGCTCTCTGCTCCTCCCTGT</u>	NM017008.3
	R	<u>CATGGGGGCATCAGCGGAAGG</u>	
Kollajen tip 1 a1	F	<u>AGCAGGTCCCCGAGGCAGAG</u>	NM053356.1
	R	<u>GCAGGACCCGTTTGTCCGGG</u>	
Osteopontin	F	<u>TTGCCTGTTTCGGCCTTGCC</u>	AB001382.1
	R	<u>ACGCTGGGCAACTGGGATGA</u>	
Alkalin Fosfataz	F	<u>CGGGTGAACCACGCCACTCC</u>	NM013059.1
	R	<u>GGCCAGCAGTTCAGTGCGGT</u>	
Osteokalsin	F	<u>TCCGGGGTTTGGCTCCTGCT</u>	M25490.1
	R	<u>GGCGAAGGCCTGGAAGGGGA</u>	

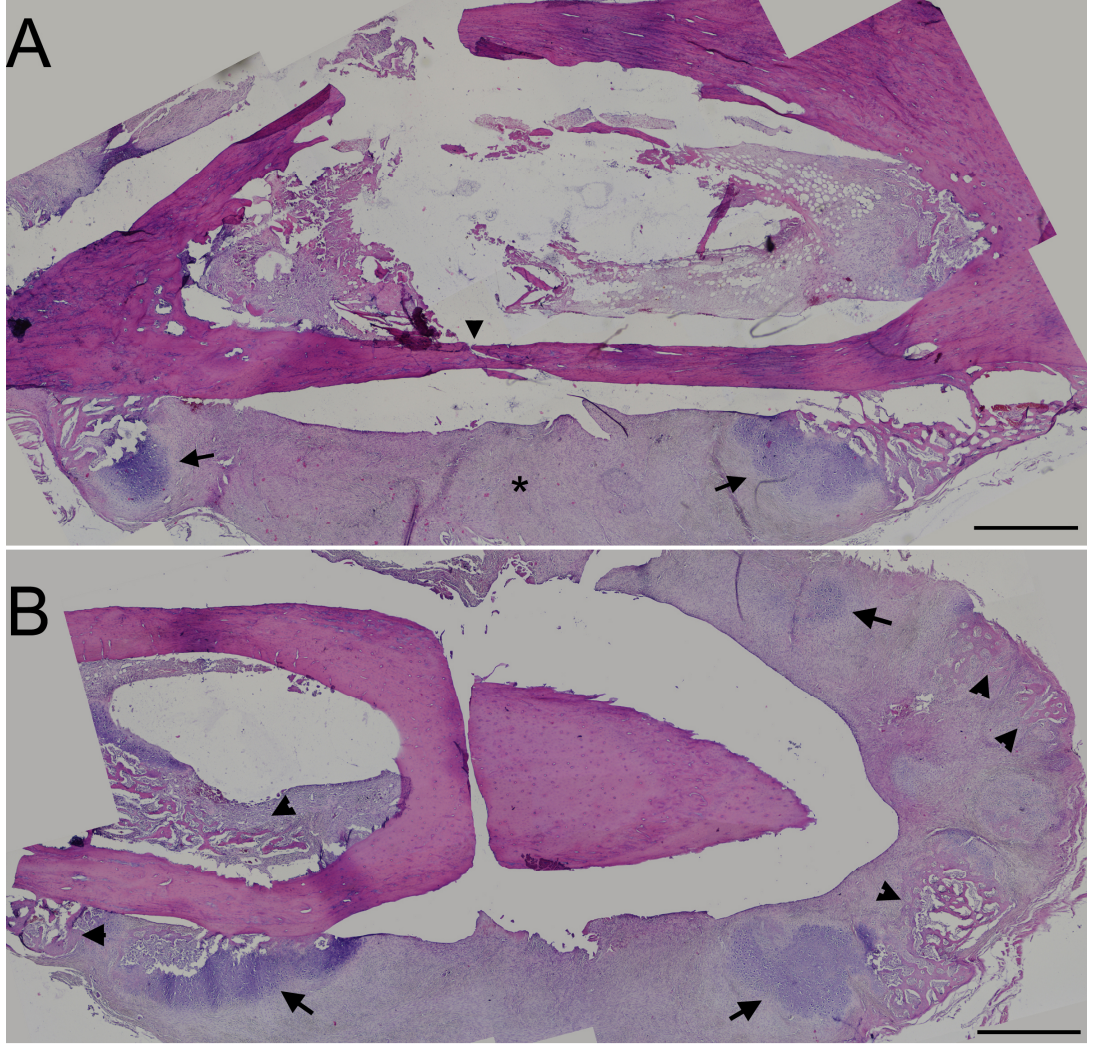
R: Reverse primer F: Forward primer

Histolojik İnceleme Bulguları

İkinci haftada makroskopik olarak kırıkta kaynama olmadığı tespit edilen kontrol grubu ve indüklenmemiş grup sıçanlardaki tespit materyali kırık hattından çıkarıldığında kemiklerin kırık hattından ayrılmış ve tutunma olmamış olduğun görüldüğü dolayısıyla histopatolojik incelemeye gerek görülmemiştir. Yoğun kallus dokusu saptanan 2. hafta osteojenik gruptaki iki sıçan femurundan biri histolojik incelemeye alınarak osteojenik gruptaki kaynama bulguları histolojik olarak gösterildi. Sitolojik takip ve dekalsifikasyon sonrasında alınan kesitlerin Hemotoksilen Eozin boyamalarında kırık hattını içine alacak şekilde epifize kadar uzanan geniş bir kallus dokusunun olduğu görüldü. (Resim 13 A) Bu kallus dokusunun epifize yakın kısımlarında kondrojenik ve osteojenik değişimin görüldüğü alanlar yani kondroosteojenik kallus dokusunun geliştiği alanlar tespit

edilmiştir (Resim13). Kırık hattında tam birleşme görülmemekle birlikte iki kırık hattının birbirine yakın konumlandığı gözlemlenmiştir.

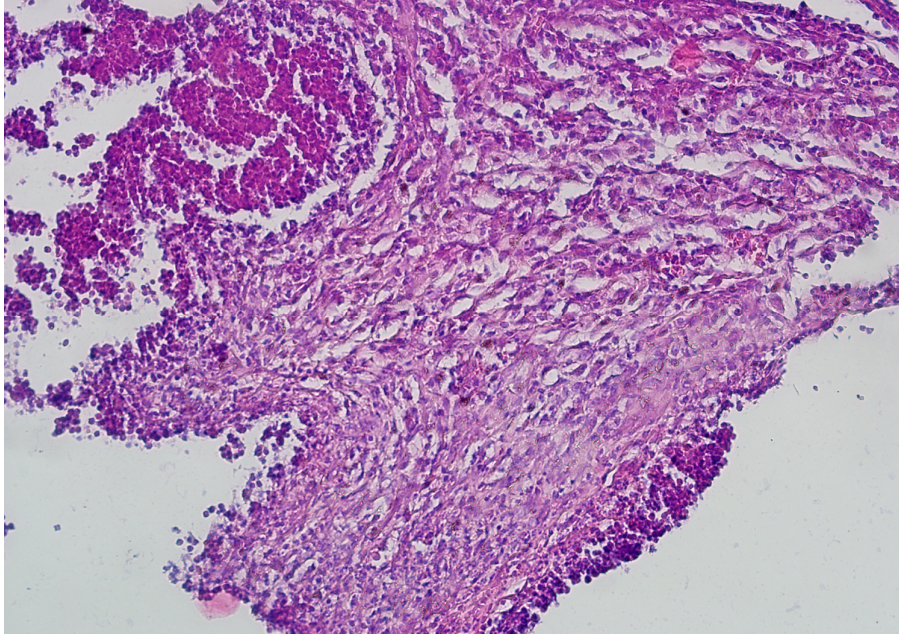
Sonuç olarak 2. haftada ostejenik indüklenmiş grupta kemik kallus oluşumunun gerçekleştiği diğer gruplarda ise bu aşamaların gerçekleşmediği görülmektedir



Resim 13: İkinci hafta osteojenik kök hücre membranı kullanılan kırık hattının görüntüsüA) \Rightarrow işareti ile gösterilen alanlar kondrojenik kallus alanları, \blacktriangleright ile gösterilen alanlar kırık hattını işaret etmekte B) \Rightarrow işareti ile gösterilen alanlar kondrojenik kallus alanlarını \blacktriangleright işareti ile gösterilen alanlar kallus içinde kemikleşen alanları göstermekte Bar:1 mm

Sonuç olarak ikinci haftada kırık iyileşme safhalarından kemiksi kallus oluşumunun osteojenik grupta gerçekleştiği diğer gruplarda ise bu aşamaya 2. haftada ulaşılmadığı gözlemlenmiştir.

İkinci haftada indüklenmemiş grupta kırık hattına sarılan kök hücre membranının kemiğe entegre olmayacak şekilde kas dokusu ve kırık etrafında yer aldığı ve fibröz bağ dokusu şeklinde kaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular gerçekleştirilen histolojik takip ve mikroskopik analizle gösterilmiştir.(Resim 14) Histolojik incelemede dokunun fibröz doku olduğu görüldü. Konulan membranın kemik yönünde farklılaşmayıp çevre dokunun özelliklerini kazanarak fibröz doku karakterine farklılaştığını saptadık.

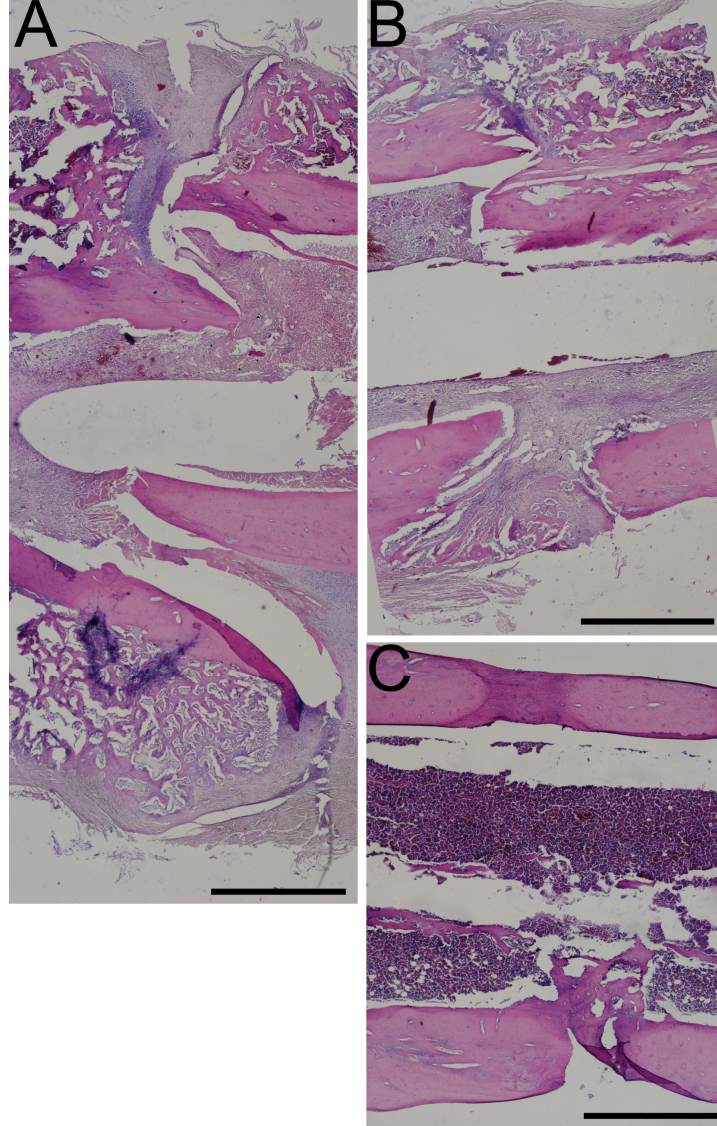


Resim 14: İkinci hafta kontrol grubu kırık hattı ve çevresinde görülen fibrotik dokunun histolojik görüntüsü bar:100 µm

Dördüncü Hafta histolojik bulgular

Makroskopik görüntülerde tespit edilmiş olan kontrol ve indüklenmemiş grup sıçanların kırık hatlarında 2. hafta osteojenik grupta gözlenen kallus dokusuna oranla daha küçük olmakla birlikte kallus dokusu geliştiği görülmüştür. Aynı kemiklerin histolojik kesitlerinde de makroskopi ile uyumlu olarak kallus dokusunun varlığı ve

kallus dokusu içerisinde osteojenik değişimin olduğu görüldü. Ancak hem kontrol hem indüklenmemiş gruplarda kırık hattında bir birleşme gözlenmemiştir. Radyolojik bulgular (Resim 6) da histolojik ve mikroskopik (Resim 15) bulguları desteklemektedir.



Resim 15: Her üç grup kırık hattının 4. hafta Histolojik Görüntüleri

A) Kontrol grubu: Kök hücre uygulanmayan grup B) İndüklenmemiş grup: Osteoindüksiyon uygulanmamış kök hücre membranı uygulanan grup C) Osteo grubu: Osteojenik indüksiyon uygulanmış kök hücre membranı uygulanan grup, kırık hattının birleştiği ve kemik iliğinin yeniden oluştuğu görülmekte
Bar:1 mm

Diğer taraftan 4. hafta osteojenik grubun histolojik bulgularında ise kırık hattında belirgin kemikleşme ve remodeling gerçekleştiği kallus dokusunun tamama yakınının ortadan kalktığı görülmüştür. Kemik medullası içersinde yaygın kemik iliğinin bulunduğu gösterilmiştir.

Çalışmanın 6. ve 8. hafta bulgularında kırık hatlarının radyolojik ve makroskobik incelemelerinde kontrol ve indüklenmemiş kırık hatlarındaki defektin hala kaynamamış olması ve radyolojik görüntülerde kallus dokusunun 8. haftada halen oluşmamış olması makroskopik incelemede ise kırık hatlarında patolojik hareketin varlığı dikkat çekiciydi. 2. ve 4. Haftadaki osteojenik indüklenmiş membran uygulanan grup sıçan femurlarında 2. Haftada yumuşak kallus dokusunun oluşmuş olması 4. Haftada ise kemiğin makroskopik olarak kaynama bulguları göstermesi ve remodele olmaya başlamış olması osteojenik indüklenmiş membranın kırık kaynamasını artırdığını bize açıkça gösterdi. Bu nedenle 6. ve 8. haftadaki histolojik inceleme bulgularına gerek duyulmadı. 6. ve 8. haftadaki kırık dokuları makroskobik değerlendirmeye tabi tutuldu.

TARTIŞMA

Günümüzde trafik ve iş kazaları nedeniyle kırık iyileşmesi toplumun önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Araştırmacılar kırık iyileşmesini geliştirmek ve süreci hızlandırmak için çeşitli yöntemler geliştirmektedirler. Kırık iyileşmesi üzerine yapılan araştırmaların sayısı her gün artmasına rağmen, tam anlamıyla anlaşılammıştır. Kırık iyileşmesi mekanizması araştırmacıların hala ilgisini çekmektedir.

Kırık iyileşmesi, temelde bir bağ dokusu iyileşmesidir. Fakat yumuşak dokudan farklılığı, osteoblast ve osteoklastların aktiviteleri ile özelleşmiş kalsifiye kemik dokusu meydana gelmesidir (45).

Kırık oluşumunu takiben kemik bütünlüğünün yeniden sağlanabilmesi amacıyla organizmada birçok değişiklikler meydana gelir. Kırık iyileşmesi karmaşık bir olaydır. İyileşme 3 evreye ayrılır: 1) Yangı, 2) Yenilenme, 3) Yeniden şekillenme (Remodeling). Evreler birbiri ile ilişkilidir (46).

Kırık iyileşmesinde hücreler arası fiziksel ve biyokimyasal etkileşimler ortaya çıkmaktadır ve iyileşmeye etki edecek faktörler araştırılmaktadır (47). Günümüze kadar kırık iyileşmesini hızlandırmaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Kaynamayı olumlu yönde etkileyen çalışmalardan rutinde kullanılanlar elektrik stimülasyonu, mekanik stimülasyon ve ultrasondur (48). Kemik kaynamasını biyolojik olarak hızlandırabilecek çalışmalarda otojen ve allojen kemik greftleri, sentetik greftler, otojen kemik iliği ve büyüme faktörleri (49, 50, 51), BMP (52, 53), Transforming Growth Faktör- β (54, 55), fibroblast büyüme faktörü (56), insülin benzeri büyüme faktörü, büyüme hormonu (57), vasküler endotelyal büyüme faktörü (58) ve NGF (59) dir.

Geliştirilen tekniklerden otolog kemik greftleri kaynamama, artrodez, spinal füzyon, düzeltici osteotomiler, kemik defekti içeren kırıkların tedavileri için kullanılabilir. Greftler kemik yapımını sağlayan hücreler içerir. Avantajı

kemik yapımını uyaracak matriks yapısı ve içerdiği kemik yapımını uyarıcı protein ve sitokinler yardımıyla osteoindüktif olması nedeni ile diğer kemik grefti benzeri maddelerden daha çok özelliğidir. Fakat hastadan temin edilecek kemik greft miktarı sınırlıdır. Greft alınan bölgeye ek cerrahi işlem yapılması gereklidir. Greft alınan bölgede hasara yol açması gibi dezavantajları da vardır. Taze donmuş türdeş kemik greftleri de kullanılabilir. Fakat taze donmuş türdeş kemik greftlerinden virüs kaynaklı hastalık geçme riski ve kemiğin yapısındaki antijenik uyarıların fazla olması nedeni ile alıcıda immünolojik reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Bu nedenle mezenkimal kök hücrelerin, vücudun kapasitesini aşacak derecede kemik defektlerinin tedavisinde kullanılabilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır ve çalışmalar devam etmektedir (60, 61, 62, 63, 64). Bu çalışmanın ortaya çıkmasındaki en önemli etkenlerden bir tanesi budur. Çalışmada sıçan femurlarına kırık modeli oluşturuldu. Oluşturulan kemik defekti intrameduller çivileri taklit eden kirschner telleri ile fiksasyon sonrası elde edilen kök hücre membranları kırık bölgelere uygulandı. Kırık hattını tam çevrelemesine dikkat ederek ve araya kaynamayı etkileyebilecek başka bir dokunun girmesine engel olacak şekilde kök hücre membranı kırık hattına uygulandı.

Kemik iyileşmesi çalışmalarında klinik başarısızlıkları önlemek için yönlendirilmiş doku rejenerasyonu yöntemi de geliştirilmiştir (65, 66, 67). Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu kemik defekti ile çevresindeki yumuşak dokular arasında bir membran bariyer yerleştirilerek defekti çevreleyen kemikten derivate olan hücreler dışındaki hücrelerin defekte girişleri önlenmekte ve elde edilen boş alanda osteogenezisin engellenmeksizin gelişebilmesi sağlanmaktadır (68, 69).

Kırık kemiğin iyileşmesindeki en önemli faktör pluripotent etkiye sahip mezenkimal kök hücrelerdir. Kemik uçlarının temas ettiği, kırık bölgesinin kanlanmasının bozulmadığı koşullarda kırık oluşmasından itibaren gelişen hematoma ve yangısal cevap oluşur. Mezenkimal hücrelerin bölgeye göç etmesini, çoğalmasını, farklılaşarak osteoblastlara dönüşmesi sağlanır (70, 71, 72). Kemik iliği mezenkimal kök hücre yönünden yoğun bir içeriğe sahiptir ve elde edilmesi kolaydır. Yapılan bazı çalışmalarda kemik iliği hücrelerinin herhangi bir farklılaştırma işlemine tabi

tutulmadan ve osteokondüktif destek yapı kullanılmadan uygulanması sonucu başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (73, 74). Bizim çalışmamızda da kök hücre membranları yapı iskeleti kullanılmadan membran haline getirildi. Bir grup sıçanlara da indüklenmemiş yani osteojenik yönde farklılaştırılmamış kök hücre membranı uygulandı. İndüklenmemiş kök hücre membranı uygulanan sıçan femurlarında kırık hattına membran uygulanan bölgede kas dokuya da karışmış şekilde, makroskopik olarak sekestr dokusunu andıran yapıyla karşılaşıldı. Histolojik incelemeye tabi tutulduğunda ise dokunun fibrotik olduğu görüldü. Buradan yola çıkarak uygulanacak olan kök hücre membranının mutlak suretle osteojenik farklılaştırılarak veya başka dokularda kullanılacaksa benzer dokuya farklılaştırılmak suretiyle tatbik edilmesi gerekliliği kanısına varılmıştır.

Kök hücreler embriyodan, fetustan, göbek kordonundan ve yetişkinlerden elde edilebilmektedir (75). Kök hücre tanımını oluşturan temel özellikler; kendi kendini yenileyebilme yeteneği veya başlangıçtaki hücrenin özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneğine sahip olması (self-renewal), tek bir hücreden birden fazla seri hücrelerine farklılaşabilmesi (multi-lineage differentiation), belli bir dokunun in-vivo fonksiyonel özelliklerini göstermesidir (76).

Kemik iliği stroma hücreleri; osteoblast, kondrosit, adipozit, myoblast, hepatosit, kardiyomyozit ve nöral hücrelere dönüşebilme özelliği göstermektedir (77). Kemik iliği stromasında bulunan mezenkimal kök hücreler kemik iliği, periost, trabeküler kemik, adipoz doku, sinovyum, iskelet kasları, diş pulpası ve periodonsiyumdan izole edilmiştir (78). Kök hücrelerin temel fonksiyonu yerleştikleri dokunun onarım ve rejenerasyonunu sağlamasıdır. Yetişkin kök hücreler en çok kemik iliğinde bulunmaktadır. Kemik iliği hematopoetik ve mezenkimal orijinli kök hücreleri içermektedir (79).

Mezenkimal kök hücrelerin immünsüpresif özellikleri de vardır. Dolayısıyla mezenkimal kök hücreler hastalıklı organ veya dokunun rejenerasyonu için kullanımda ideal transfer materyalleri olarak düşünülmüştür. Ancak mezenkimal kök hücrelerin transfer sonrası transfer edildikleri lokal dokuya farklılaştıklarında bu

immünolojik özelliklerini kazanıp kazanmadıkları bilinmemekteydi. Hua Liu tarafından yapılan çalışmada bu sorunun cevabı Yeni Zelanda tavşanlarındaki osteogenesis ile aranmıştır. Çalışmada osteojenik yönde farklılaştırılmış mezenkimal kök hücrelerin in vitro olarak MHC 2 ekspresyonu yapmadıkları görülmüş. Allojenik lenfosit proliferasyon yetenekleri olmamasının yanında antiinflamatuvar sitokinlerden IL 10 ve TGF salgılanmasını da arttırdıkları görülmüştür. Çalışmada osteojenik indüksiyon yapılmış olan kök hücrelerin indüksiyon yapılmamış gruba göre daha fazla antiinflamatuvar sitokin olan interlökin 10 salgıladıkları bulunmuş. Transplantasyondan sonra mezenkimal kök hücrelerin in vivo farklılaştırılmaya uğratıldıklarında 4 hafta sonra yapılan in vivo değerlendirmede osteojenik aktiflenen kök hücrelerin de MHC class 2 ekspresyonu yapmaya başladıkları gösterilmiştir. Osteojenik grubun immünolojik özelliklerini tekrar kazandığı görülmüş. Buradan yola çıkıldığında bu çalışmada osteojenik aktiflenen kök hücrelerin kemik yapımını artırması, indüklenmeyen grupta ise kemik doku yerine fibrotik doku artıklarına rastlanmasının sebebi kısmen açıklanmış olmakta ama daha çok bu fibrotik dokunun çevre bağ doku karakterine uymak suretiyle oluştuğu kanaatine varılmıştır(112).

Goujon tarafından 1869 yılında kemik iliğinin osteojenik potansiyeli ile ilgili ilk bilgiler yayınlanmıştır (80). İlk defa kemik oluşturmak için otolog kemik iliği kullanılabilirliği bildirilmiş. Chutro (81) kemik iliği içeren kemik greftinin uzun kemik kırığında kullanılabileceğini göstermiştir. Daha sonra Mc Gaw ve Harbin (82) osteojenik rejenerasyonda kemik iliğinin rolünü tespit etmiştir (83). İlk olarak 1976'da Friedenstein yetişkin kemik iliğinde güçlü osteojenik potansiyeli olan hücre popülasyonunu (84, 85) tanımlamıştır.

İn vitro ve in vivo diferansiyasyon özellikleri olan hücreler klinik için tedavi edici bir bakış oluşturmaktadır. Tedavisinde güçlük çekilen konular, dejeneratif ve progresif hastalıklar, kaynamamış kırıklarda kullanımı akla gelmektedir. Bu amaçla otojenik yada allojenik kök hücreler lokal yada sistemik infüzyon şeklinde uygulanmaktadır. Mezenkimal kök hücre ile ilgili çeşitli alanlarda oldukça çok tedavi uygulamaları görülmektedir. Bu geniş uygulama alanları içerisinde kardiyovasküler sistem hastalıkları, miyokart infarktı (86, 87), periferik arter hastalıkları (88), akciğer

fibrozisi (89), spinal kord yaralanmaları (90, 91), dermatolojik hastalıklar, kas iskelet sistemi, kırıklar ve periferik sinirlerle ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Mezenkimal kök hücrelerin doku rejenerasyon potansiyeli giderek önem kazanmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin doğum sonrası vaskülogenezde önemli rolü yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kemik gelişimi ve kırık iyileşmesinde damarlanma kemik formasyonu öncesi oluşur. Sanjay Kumar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada atimik sıçanlarda segmental kemik defekti oluşturma sonrası lobaratuvar şartlarında rekombinant teknoloji kullanılarak mezenkimal kök hücrelere adenovirüs 6 ile VEGF ve BMP 2 ekspresyonu yapması sağlanmış. Ve kemik defektine olan iyileştirici etkileri araştırılmış. BMP 2 ve VEGF eksprese eden grupta yeni kemik formasyonunun ve anjiyogenezin kontrol gruplarına göre anlamlı olarak fazla olduğu görülmüştür (111).

Mezenkimal kök hücre insanda genellikle süperior iliak kanattan alınan kemik iliğinden elde edilir (93, 94, 95). Alternatif olarak femoral ve tibial medullar kısımlarından (96, 97) ve torasik ve lomber vertebralardan da elde edilebilirler (98). Bu çalışmada da kök hücreler sıçanların femur medullar kısımdan elde edilmiştir.

Mezenkimal kök hücreler, çok sayıda pasaj boyunca lobaratuvar ortamında kültürde üretilebilir. Tek hücre düzeyinde osteoblastları, kondroblastları, adipositleri, fibroblastları ve iskelet myoblastlara diferansiye olabiliyorlar (99, 100). Ayrıca in vivo olarak kullanıldıklarında aynı farklı hücre dizisine diferansiye olabilmektedir (101).

Kemik rejenerasyonu basamakları; 1. Osteogenesis; kemik iyileşmesinin tüm aşamalarına katılır ve hücre transferi ile kemik oluşturma kapasitesini kapsar. 2. Osteoindüksiyon; Kemik formasyonun indüklemeye kapasitesinde olan materyallerdir. Örneğin demineralize kemik matriksi, yalnız başına değil biyolojik aktif sitokinlerle birlikte mezenkimal kök hücreleri osteoblastik ve kondroblastik farklılaşmaya veya mezenkimal kök hücreleri çoğalmaya teşvik eder. 3. Osteokondüksiyon; kemik yapıcı hücreler (mezenkimal kök hücre ve onların ürünleri) için destek yapı sağlar. 4. Osteopromosyon; biyolojik ve mekanik

kolaylaştırıcı faktörlerin etkisi ile kemik iyileşmesi ve rejenerasyonunun sağlanmasıdır. Bizim çalışmamızda mezenkimal kök hücreden oluşmuş membran kırık bölgeye sarılarak uygulanmış ve kemik rejenerasyonunun oluşması sağlanmıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin osteoblastik aktivitesinin kemik iyileşmesine katkısını gösteren çok sayıda yayın vardır. Ichuro Sekia ve arkadaşlarının çalışmasında mezenkimal kök hücrelerin dejeneratif artrit ve kırık hasarı varlığında sinovyal sıvıda arttığını göstermiştir. Ön çapraz bağ tamiri yaptıkları hastaların dizlerinden operasyon esnasında sinovyal sıvı örnekleri alınmış. Bu hastaların dizlerindeki kırık dejenerasyonu artroskopik olarak görülmüş. Hastalar radyolojik olarak evrelendirildikten sonra 6 sağlıklı gönüllüden, 20 hafif osteoartriti olan hastadan, 26 ağır osteoartriti olan hastadan sinovyal sıvı analizi alınarak incelenmiş. Sinovyal sıvının hücresel komponentleri hücresel analiz için kültüre edilmiş. Sinovyal sıvıdaki MSC miktarının artroskopik olarak derecelendirilen kırık hasarı boyutu ile orantılı olarak arttığı belirlenmiş. Normal gönüllülerin sinovyal sıvılarında mezenkimal kök hücrelere hemen hemen hiç rastlanmamış, buna karşın osteoartrit derecesi arttıkça mezenkimal kök hücrelerin de körele olarak sinovyal sıvıda çoğaldığı belirlenmiş. Bu durum vücudun normal mekanizmalarında onarım işini mezenkimal kök hücreler ile yaptığı sonucunu doğurmaktadır. Yapılan çalışmada da bu durum taklit edilmiş ve vücudun doğal mekanizmaları kullanılarak kırık tedavisinde mezenkimal kök hücrelerin kullanımı araştırılmıştır (25).

Kemik iyileşmesinde neovaskülarizasyonun yeni kemik oluşum sürecinde gerekliliğinden bahsedilmiştir. Kırık sonrası bölgedeki damarların hasarlanması sonucunda ortaya çıkan hipoksik durum VEGF gibi sitokinlerin açığa çıkamaları için gerekli olan gen ekspresyonunu sağlamaktadır. Kırık oluşumundan sonra VEGF ün ortaya çıkması ile endokondral osifikasyonun birçok basamağı kontrol altına alınır. VEGF insan ve sıçanların osteoblast hücrelerinden salındıkları ortaya konulmuştur. Ve kemik formasyonunda uyarıcı etkiye sahiptir. Deneysel çalışmamızda uyguladığımız kök hücre membranları da kırık hattında sarıldıkları bölgede VEGF

üretmekte ve yeni kemik oluşumunda tüm bu sayılan özellikleriyle kemik kaynamasını artırıcı yönde etki etmekte olduğunu düşündürmektedir (44).

Mezenkimal kök hücrelerin invitro osteogenik potansiyelleri ortaya konulduktan sonra, invivo potansiyellerini de ortaya koyan çalışmalar da yapılmaktadır (102, 103). Kültüre edilmiş mezenkimal kök hücre veya yoğunlaştırılmış kemik iliği aspiratları kullanılarak yapılan bu çalışmalardan olumlu sonuçlar alınmaktadır. Taguchi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada kemik iliği hücrelerinin invivo migrasyonu ve kemik tamirine olan katkısını değerlendirilmiştir (104).

Kök hücrelerin geleneksel greftleme yöntemlerinin yerini almaya başlaması için yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Hossein Nejadnik ve ark yaptığı çalışmada geleneksel yöntemlerle otolog kondrosit transplantasyonu, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre implantasyonu ile karşılaştırılmış. 72 kondrosit hasarı olan hasta lezyon yeri ve yaş olarak eşleştirilmiş. 36 hastaya geleneksel yöntemlerle kondrosit transplantasyonu uygulanmış. 36 hastaya da kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre uygulanarak tedavi edilmiş. Klinik sonuçlar operasyon sonrası ve 3, 6, 9, 12, 18. haftalarda incelenmiş. Tedavi etkinliği açısından her iki grup arasında belirgin bir farka rastlanmamış. Sonuç olarak mezenkimal kök hücrelerin artiküler kıkırdak tamiri için kullanılmasının kondrosit transplantasyonu kadar etkili bir yöntem olduğu, ayrıca mezenkimal kök hücre kullanımının daha az diz cerrahisi gerektirmesi, donör saha komplikasyonuna sebep olmaması ve maliyetinin düşük olması ile geleneksel yöntemlerden daha avantajlı olduğu bildirilmiş (113).

Kök hücrelerin yine bir greftleme gerektiren ortopedik rahatsızlık olan femur başı avasküler nekrozunun tedavisinde kullanımına yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Zang Hua Lee ve ark yaptıkları çalışma mezenkimal kök hücrelerin farklı bir uygulama yolu kullanılmış. Mezenkimal kök hücreleri femur başı osteonekrozunu tedavi etmek için intravenöz olarak verilmiş. Ve alıcıdaki kök hücre migrasyonunu ve dağılımını incelenmiş. Mezenkimal kök hücreleri in vitro olarak

yeşil flörosan protein ile işaretlenmiş. Sıçanların vena kaudalisinden verilmiş. Ve işaretli kök hücrelerin dağılımı 0-6-24-48-72. ve 96. saatlerde gözlenmiş. Tavşanlarda ise oluşturulan femur başı osteonekrozu modeli uygulanmasından 2 hafta sonra 5×10^7 işaretli kök hücre kulak veninden verilmiş. Tavşanların organları 2, 4 ve 6. haftalarda incelenmiş. Kök hücrelerin üniform olarak organlara dağıldığı gözlenmiş. 6. Haftada tavşanların tüm organları tekrar incelenmiş. İşaretli kök hücrelerin kemik iliğinde diğer organlarda olandan daha fazla toplandığı bulunmuş. Tavşanlarda greft versus host reaksiyonu ve immünolojik reaksiyona rastlanmamış. Çalışmada allojenik mezenkimal kök hücrelerin sistemik kullanımının da güvenilir olduğu ve femur başı osteonekrozunda kullanılabilir bir alternatif tedavi metodu olduğu sonucuna varılmıştır (23).

Ural ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada tavşanların her iki tibialarında defekt oluşturulup eksternal fiksator uygulanmıştır (105). Tibialardan birinde defekt bölgesine lokal olarak mezenkimal kök hücre verilmiştir. Kök hücre verilmeyen tibia kontrol grubu olarak kullanılmış. Uygulamanın 15. günü ve bir ay sonra radyolojik olarak incelenmiş. Birinci ay sonunda histokimyasal olarak mezenkimal kök hücre uygulanan tarafta daha hızlı iyileşme sağlandığı ve eksternal fiksatorün tutulma süresinin kısaldığı gösterilmiştir (105).

Günümüzde yapılan çalışmalarda kemik iyileşmesinde ve defektlerin kapatılmasında osteoindüktif ve osteopromotif materyallerin gen ekspresyonu ile mezenkimal kök hücrelerle kombine kullanımları ve defektlerin kapatılmasında skafoldlar ile mezenkimal kök hücrelerin kombine edildiği çalışmalar yapılmaktadır (106, 107, 108).

Yaptığımız çalışmada kök hücreleri skafoldsuz yani hücresel iskelet kullanmadan kemik defektli alanlara uygulandı. Kök hücreleri skafold adı verilen hücre yapı iskeletleri ile de kullanılabilir. Marcacci ve arkadaşları geniş kemik kaybı olan uzun kemik defektlerinde doku mühendisliği uygulamalarını kullanarak 3 boyutlu canlı skafoldlar geliştirmişler. İnsan kemik iliği stroma hücrelerini kültür ortamında çoğaltmışlar seramik porozlu hidroksiapatit skafoldlara ekmişler. Seramik

skafoldlar kemik defektini karşılayacak boyutta hazırlanmış. Dört hastanın bu şekilde kemik diyafiz defektleri tamir edilmiş. Skafoldlar defekli alana yerleştirildikten sonra eksternal fiksator veya ilizarov ile fiksasyon sağlanmış ve radyolojik kontroller yapılmış. İmplantla hastanın alıcı kemiği arasında tam kaynama 5-7. aylarda elde edilmiş. Enfeksiyon veya kaynamama gibi bir komplikasyonla karşılaşmamıştır. Kök hücre çalışmalarının çoğalması ile ortopedinin zor kırıklarının tedavisi daha da kolaylaşacaktır (98).

Skafoldsuz uygulanan kök hücre membranının uygulaması biraz daha dikkat gerektirmektedir. Çalışmamızda osteojenik indüksiyon uygulanmış ve uygulanmamış kök hücre membranları kullanıldı. Kullanılan membranların uygulama esnasında birbirlerine yapışma eğilimleri olduğunu görüldü. Membranların aynı zamanda kaldırıldıkları andan itibaren hızlı bir şekilde kullanılması gerekliliği de yaptığımız çalışmada gösterildi. Kullanımı geciken kök hücre membranlarının daha frajil bir hal aldıklarını ilk anki kadar esnek olmadıklarını görüldü.

Horwitz ve ark. çalışmasında osteogenesis imperfektalı 3 çocuğa allojenik tüm kemik iliğini içeren transplantasyon yapılmış. Çocuklarda transplantasyondan sonra ilk 6 ayda kırık sayısında anlamlı azalma meydana geldiği gözlenmiş. Osteoartrozlu hastalara mezenkimal kök hücreleri intraartiküler olarak verilmiş, sinovyal biyopsi değerlendirmesinde olumlu gelişmeler tespit etmişlerdir (109).

Otolog kemik iliği hücrelerinin klinikte elde edilişi nispeten noninvaziv bir metodla yapılabilmektedir. Kemik iliği hücreleri iğne aspirasyon metodu ile iliumdan lokal anestezi altında yapılabilmektedir. Ne var ki kök hücrelerin izolasyonu ve çoğaltılma süreci 3-4 hafta gibi bir süre gerektirmektedir. Kök hücre tedavisinin membran Halide uygulanabilmesi için gerekli olan bu süre akut kırıkların tedavisinde biraz zor gözükmektedir. Fakat açık kırıklarda geçici fiksasyon örneğin eksternal fiksator uygulamasının ardından kalıcı fiksasyonun yapılacağı seansa hazırlanarak uygulanması imkanı vardır. Nonunion tedavileri de elektif tedaviler oldukları için nonunion tedavisinde de kullanılması mümkündür. Membran oluşturmak için özel skafoldlar gerekmemektedir. Çalışmamızda hücre membranları

10 cm lik özel besi yerlerinde yapıldı. Klinik kullanımda geniş alanlar için fazla miktarda kök hücre membranı elde etmek için ya çok fazla kemik iliği hücre elde edilmeli veya seri pasajlarla alınan kök hücrelerin çoğaltılması gerekmektedir. Sonuç olarak klinikte kullanılacak ise cerrah operasyondan önce kök hücre membranının yeterli miktarını elde edecektir. Ayrıca kök hücre membranlarının kolay manüple edilebilir olmasıyla enjektör iğnesinden de rahatlıkla geçebilir. Bu özellikleri ile de osteonekroz tedavisinde osteonekrotik bölgelere rahatlıkla iletilebilir ve klinik tedavide kullanılabilir. Tüm bu sebeplerden dolayı biz kök hücre tedavisinin ortopedik vakalarda kullanılmasının tedavisi zor olan hastalıkların kesin ve kolay tedavisi olacağı umudunu taşımaktayız (44).

Cahan Gao ve ark yaptığı çalışmada mezenkimal kök hücrelerin osteopenik hastalarda da kullanılabileceği belirtilmiştir. Osteojenik öncül hücrelerin ve büyüme faktörlerinin insan kemik iliği hücrelerinde azalmış olması veya tamamen yok olması azalmış kemik formasyonuna ve osteopeniye sonuçlanmaktadır. Chan Gao nun çalışmasında genç sıçanlardan alınan mezenkimal kök hücrelerin yaşlı osteopenik sıçanlara aktarılmasının femoral kanala uygulanan implantların osteointegrasyonunu artırdıkları gösterilmiş. Çalışmada bizim çalışmamızda yaptığımız gibi kök hücreler genç sıçanların kemik iliğinden izole edilmiş. Titanyum implant yüzeylerinde osteojenik indüksiyona tabi tutulmuş. Oluşturulan implantlar sıçanların femurlarına intrameduller olarak yerleştirilmiş. Osteopenik sıçan femuruna yerleştirilen implant çevresinde yeni kemik formasyonu olduğu karşı femura yerleştirilen kök hücresiz implantla karşılaştırılarak gösterilmiş. Hem bizim çalışmamızdan hem de bu çalışmadan ışık alarak kök hücrelerin klinik kullanıma girerek osteopenik hastaların implantlarında meydana gelen osteointegrasyon eksikliği probleminin aşılabileceği kanısındayız (24).

Nakamura ark. yaptığı çalışmada mezenkimal kök hücrelerin kök hücre membranı halinde transplantasyonu ile kemik kaynamasının artırılması planlanmıştır. Nonunion modeli sıçan femuruna uygulanmış. Üretilen hücre membranları bizim çalışmamızda olduğu gibi kırık femura skafold kullanılmadan tatbik edilmiş. Direk grafi ve histolojik analizler 2, 4 ve 8. haftalarda uygulanmış. Ultrason ve

biyomekanik analizler 8 haftada uygulanmış. Kök hücre membranı uygulanan grupta kallus formasyonunun olduğu fotoğraf ve histolojik analizlerle gösterilmiş. Kemik kaynaması kök hücre membranı uygulanan grupta 8. haftada saptanmış. Bununla beraber kontrol grubunda ise 8. haftada nonunionun devam ettiği gösterilmiş. Vertikal yönde traksiyon testleri de kök hücre membranı uygulanan grupta belirgin olarak kaynamayı desteklemiş. Tüm bu bulgular ışığında kök hücre membranı uygulanan grupta hücre mühendisliği teknolojisiyle üretilen dokunun kırık kaynamasını artırabileceği saptanmış. Nonunion defektli kemik kırıkları ve osteonekrozlarda da kullanılabilirliği belirtilmiş. Yapılan çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda yine doku mühendisliğinde kullanılabilir olan önemli bir noktaya değinilmiştir. Histolojik olarak üretilen kök hücre membranlarının osteojenik indüksiyonla uygulanmasının bu çalışmalarda olmazsa olmazlardan olduğu kanısına varılmıştır. Kemik kaynamasının artırılmasının ancak osteojenik indüksiyon varlığında mümkün olduğu yalnızca indüklenmemiş kök hücre membranı kullanılan grup sıçanlarda kallus dokusu yerine sadece fibrotik kalıntılarla karşılaşmış olması doku mühendisliğinde gelecek çalışmalara ışık tutabilecek nitelikte olduğu düşüncesindeyiz (44).

Kök hücre çalışmaları son dönemin en popüler araştırma konularındandır. Kök hücreleri ile klinikte karşılaşılan pek çok tedavisi zor olan hastalıklar tedavi edilebilmektedir. Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunun hayvanlar üzerinde olması araştırmaların henüz çok taze olmasına bağlıdır. Kök hücre çalışmalarının nispeten uygun laboratuvar ortamları gerektirmesi ileri araştırmaların yapılabilmesi

için teknik materyal ve malzemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın eksik yönü kullanmış olduğumuz türdeş mezenkimal hücrelerin herhangi işaretli olmamasıdır. Yeni oluşan kallus dokularının uygulanan kök hücrelerinden mi kaynaklandığı yoksa çevre dokular veya kırık iyileşmesinin doğal bir sonucu olarak mı oluştuğunu açıkça gösterilememiştir. 2. haftada kallus dokusunun oluşması, 4. haftada tam kaynamanın gerçekleşmesi bizim çalışmamızdaki kök hücre membranının etkili olduğunu göstermekte idi fakat bunu kesin delillerle kanıtlamak gerektiği düşüncesindeyiz. Gelecek çalışmaların işaretli kök hücrelerle yapılmasının net sonuçlar elde etmek adına faydalı olacağı kanısındayız.

Buna rağmen kullandığımız sıçanlarda kök hücre tedavisine katkıda bulunacak önemli sonuçlar bulunmuştur.

SONUÇLAR

1)Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücre taşıyıcı iskelelere (skafoldlara) gereksinim duyulmaksızın mezenkimal kök hücrelerin bir membran oluşturularak doku hasarlı (tezimizde kemik doku hasarı incelendi) bölgeye uygulanabileceği gösterilmiştir.

2)Çalışmamızda kemiklerin değerlendirme aşamasında 4. haftada osteojenik grupta oluşan kallus dokusunun diğer gruplara oranla daha organize geniş ve sağlam olduğu görüldü. Diğer gruplarda oluşan kallus dokusunun kırık hattına sınırlı ve güçsüz yapıda olduğu görüldü. Kullanılan kök hücre membranlarının kemik kırığı modelinde iyileşme sağlama ve kırık iyileşmesi sürecini hızlandırmaları için kök hücre uygulamalarında osteojenik indüksiyonunun kesinlikle gerekli olduğu düşünülmektedir.

3)Bundan sonraki dönemlerde yapılacak çalışmalarda kullanılan membran hücrelerinin işaretlenerek yeni oluşan kemik dokuda gösterilmelerin ortopedik doku mühendisliği açısından önem taşıdığı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Junguiera, LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. 8. Baskı. Baris Kitabevi İstanbul: 1998.
2. Doblare M, Garcia JM. On the modelling bone tissue fracture and healing of the bone tissue. Acta Cient Venez. 2003; 54(1):58-75.
3. Kierszenbaum, A.L. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Patolojiye Giriş. Ankara: Palme Yayıncılık.
4. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology-II. 1996; 41;387-99
5. Schenk RK. Biology of fracture repair. In Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG (ed). Skeletal Trauma 2003; 3(1):29-73
6. Guyton AC. Tıbbi fizyoloji. Nobel yayıncılık. İstanbul 1996:1241-1243.
7. Brinker MR, Miller D. In: Miller D.(ed): Review of Orthopaedics. 1996; 2: 1-30
8. Burchard H. Biology of cortical bone graft incorporation. In: Burchard H(ed): Osteochondral Allograft. 1983;2: 51-57
9. Buckwalter JA. Musculoskeletal tissues and the musculoskeletal system. In: Weinstein SL, Buckwalter JA(eds), Turek's Orthopaedic Principles and Application. 1994; p 13-35.
10. Gil FTH, Gracia MAA, Pingarron MC, Jerez LB: Physiological bases of bone regeneration I.Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11: 47-51
11. Weiss L, Greep RO. Histology. McGraw-Hill Book Company. New York. 1977; 4: 388-395.
12. Ross, MH. Pawlina W. Histology. A Text and Atlas. (5th ed). Lippincott Williams & Wilkins. 2006
13. Puzas JE, Miller MD, Rosier RN: Pathologic bone formation. Clinical Orthopaedics and Related Research.1989; 245:269-81
14. Gebhardt MC, Lippiello L, Bringhurst FR, Mankin HJ: Prostaglandin E2 synthesis by human primary and metastatic bone tumors in culture. Clinical Orthopaedics and Related Research 1985; 196:300-305

15. Yetkin H, Yazıcı M, (ed). Miller'in Ortopedi Kitabı. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi, 2006: 10
16. Tortora GJ, Derrickson B. Principles of anatomy and physiology the skeletal system bone tissue ch:6 2009, John Wiley & Sons, Inc.
17. Jungueria CL, Carnerio J, Kelley O. Bone. In: Basic Histology. Appleton and Lange, New Jersey, 132-151, 1995
18. Marks SC, Popoff S N. Bone cell biology: The regulation development, structure, and function in the skeleton. The American Journal of Anatomy 1988; 183: 1-44.
19. Martin RB, Burr DB, Mrechanical adaptation, in Structure, Function and Adaptation of Compact Bone. Raven Press, New York, 1989, chaps.2, 4, 7 and 8.
20. Boden SD. Schimandle JH. Biologic enhancement of spinal fusion. Spine 1995; 20: 113-123
21. Robert W. Bucholz, Charles Court-Brown, James D. Heckman. Rockwood and Green's fractures in adults, 2011.
22. Ege R. Travmatoloji. Kırıklar, Eklem ve Diğer Yaralanmalar 5.Baskı. Ankara:2003;55-94.
23. Li ZH, Liao W, Long Cui X, Zhao Q, Liu M, Chen Y, Liu T. Intravenous Transplantation Of Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells And Its Directional Migration To The Necrotic Femoral Head, International Journal Of Medical Sciences 2011; 8(1):74-83
24. Gao C, Seuntjens J, Kaufman GN, Tran-Khanh N, Butler A, Li A, Wang H, Buschmann MD, Harvey EJ, Henderson JE. Mesenchymal Stem Cell Transplantation To Promote Bone Healing DOI: 10.1002/Journal Of Orthopaedics Review.22028 JAN 2012
25. Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, Yamaga M, Horie M, Koga H. Human Mesenchymal Stem Cells In Synovial Fluid Increase In The Knee With Degenerated Cartilage And Osteoarthritis 2011 DOI: 10. 1002/JOR.22029
26. Khan SN. Bone growth factors. Orthop Clin North Am. 31(3): 375–388, 2000.
27. Heppenstall RB. (Ed). Fracture healing. Fracture Treatment and Healing. Philadelphia: Saunders.1980

28. Frost, HM. The biology of fracture healing on over view clinicians part I. *Clinical Orthopaedic Related Research*, 248, 283-93. 1989.
29. Rockwood&Gren *Fractures*. Lippincot Company, Philadelphia, Toronto; Copright, 97-105. 1975
30. Ham AW, Cormack DH. (1979) *Histophysiology of Cartilage Bone and Joints* J.B. Philadelphia and Toronto: Lippincott Company
31. Miller Mark D. Bone. In: Miller M (Ed) *Review of Orthopaedics*. Saunders, Philadelphia. 1–22, 1996.
32. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament In: *Fractures*. Philadelphia, Lippincott Company, 1: 147–167, 1984.
33. *Orthopedic knowledge update 8* Edited by Alexander R. Vaccaro, 2004.
34. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg*, 1990;72: 822-9.
35. Zamzam MM, Abak AA, Bakarman AK, Al-Jassir FF, Khoshhal KI. Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts. *Int Orthop* 2009;33: 1353–1358.
36. Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, Van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg*, 2003;85: 1927-35.
37. Karagöz E, Ovalı E. 2004 *Kök Hücreler*, Derya Kitabevi Trabzon
38. Çetinkaya DU. (2009) *Kök Hücre Biyolojisi Ve Klinik Uygulamalar*, TÜBA, Ankara, 113s.
39. Vats A, Tolley NS, Polank JM, Buttery LDK. 2002; Stem cells: Sources and applications. *Clin. Otolaryngol* 27: 227-232
40. Gardner R.L. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *Journal Anatomia* 2002; 200: 277- 282
41. Bongso A, Lee EH. *Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources, Stem Cells from Bench to Bedside*. World Scientific Publishing Co Singapur, 2005.
42. Dimitriou R, Elena J, McGonagle D, Giannoudis PV. They induce the mitogenesis of mesenchymal stem cells (MSCs) and other osteoprogenitors, *Clin Orthop Relat Res* 2005, 438:221-232.

43. Pereira, R. F. ve ark., Cultured adherent cells from marrow can serve as long lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice, Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 4857-4861, 1995.
44. Cell Sheet Transplantation Of Cultured Mesenchymal Stem Cells Enhances Bone Formation İn A Rat Nonunion Model Akifumi Nakamura, Manabu Akahane, Hideki Shigematsu, Mika Tadokoro, Yusuke Morita, Hajime Ohgushi, Yoshiko Dohi, Tomoaki Imamura, Yasuhito Tanaka, Bone 46 (2010) 418-424
45. Robins, SL, Kumar, V. Kemik Onarımı. Patoloji: Çeviri Ed: Ö Uluoğlu. Güneş Kitabevi, 1990; 65-66.
46. Remedios, A.: Bone and bone Healing. Vet Clinic North Am. Small Animal Prac, 1999, 29 (5): 1029-1044)
47. Solheim E: Current concepts review: Growth factors in bone. International Orthopaedics. 1998;22: 410-16
48. Claes L, Willie B: The enhancement of bone regeneration by ultrasound. Progress in Biophysics and Molecular Biology.2006;1-15 Review
49. Schemitsch EH, Bhandari M:Bone healing and grafting. In Koval KJ(ed). Orthopaedic knowledge update-7. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2002;19-29
50. Stevenson S: Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. Clin Orthop Relat Res. 1998; 355:239-46
51. Enneking WE, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G: Physical and biological aspects of repair in dog cortical bone transplants. J Bone Joint Surg 1975;57A:237-52
52. Eckardt H, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, et al: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of nonunion. Injury. 2005; 36: 489-94
53. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, et al: Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. J Bone Joint Surg 2001;83A (1):151-58
54. Bostrom MPG, Asnis P:Transforming growth factor beta in fracture repair. Clin Orthop Relat Res. 1998; 355: 124-31,
55. Schmidmaier G, Wildeman B, Ostapowicz D, Kandziora F. Long term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β) treatment on fracture healing: A safety study for using growth factors. J Orthop Res. 2004; 22: 504-19

56. Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox CW. Novel formulation of fibroblast growth factor-2 and hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res.* 1999;17: 607-14
57. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop Relat Res.*1991 -264:295-301
58. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, et al:Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg* 2005;87B: 1434-38
59. Cui GLY, McILmurray L, Allen WE, Wang H: rhBMP-2, rhVEGF165, rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res.* 2005; 23: 680-85
60. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res.* 1985; 3: 389–404.
61. Heiple KG, Goldberg VM, Powell AE, Bos GD, Zika JM. Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1987; 18: 179-85.
62. Cui Q, Xiao Z, Li X, Saleh KJ, Balian G. Use of genetically bone marrow stem cell to treat femoral defects: An experimental study. *J Bone Joint Surg [Am]* 2006; 88: 167-172.
63. Ozturk AM, Cila E, Kanatli U, Isik I, Senkoğlu A, Uzunok D, Piskin E. Treatment of segmental bone defects in rats by the stimulation of bone marrow osteoprogenitor cells with prostaglandin E2. *International Orthopedics* 2005; 29: 73-77.
64. Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral sagittal defects in rats. *J of Orthop Research* 2003; 21: 44-53.
65. Einhorn TA. Current concepts review: Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg* 1995;77: 940
66. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenic potential of fracture hematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the hematoma. *J Bone Joint Surg [Br]* 1990; 72: 822-9.
67. Zamzam MM, Abak AA, Bakarman AK, Al-Jassir FF, Khoshhal KI, Zamzami MM. Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts. *Int Orthop* 2009; 33: 1353–1358

68. Alberius P., Dahlln C., Linde A. : Role Of Osteopromotion In Experimental Bone Grafting To The Skull, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1992;50, 829-34.
69. Linde A. Thor_ C, Dahllin C., Sandberg E.: Creation of New Bone by An Osteopromotive Membrane Technique: An Experimental Study in Rats, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1993;51, 892-7.
70. Cui Q, Xiao Z, Li X, Saleh KJ, Balian G. Use of genetically bone marrow stem cellc to treat femoral defects: An experimental study. *J Bone Joint Surg [Am]* 2006; 88: 167-172.
71. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, et al. The chondrogenicpotential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Jt Surg [Am]* 1998; 80: 1745–1757.
72. Devine SM, Peter S, Martin BJ, Barry F, McIntosh KR. Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer J* 2001;7: 76–82
73. Ma HL, Chen TH, Hung SC. Development of a new method in promoting farcture healing: multiple cryopreserved bone marrow injections using a rabbit model. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004;124:448-454.
74. Zamzam MM, Abak AA, Bakarman AK, Al-Jassir FF, Khoshhal KI, Zamzami MM. Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts. *Int Orthop* 2009; 33: 1353–1358.
75. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, Van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg [Am]* 2003; 85: 1927-35.
76. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-1446.
77. Kortesisidis, A. ve ark., Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells, *Blood*, 105(10), 3793-3801, 2005.
78. Lechner, S., Huss, R., Bone engineering: Combining smart biomaterials and the application of stem cells, *Artificial Organs*, 2006;30(10): 770-774.
79. Grove J E, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow – derived stem cells, *Stem Cells*, 2004;22, 487-500.
80. Goujon E, Recherches expérimentales sur les propriétés, *J. Anat.* 1869;6: 399-412.
81. Chutro, P., Greffe osseuse du tibia, *Bulletins et Mémoires de Société des*

Chirurgiens de Paris, 44, 570, 1918.

82. Mc Gaw, W. H., Harbin, M., The role of bone marrow and endostium in bone regeneration: An experimental study of bone marrow and endosteal transplants, *J. Bone Joint Surg.*, 16, 816-821, 1934.
83. Jensen, O. T.: Stromal Stem Cell Preparation from Iliac Bone Marrow Aspirate for Sinus Bone Grafting, *The Sinus Bone Graft*. 2.Baskı, Quintessence Publishing Co, Inc, Chicago, 2006.
84. Friedenstein, A. J., Marrow stromal fibroblasts, *Calcif.Tissue Int.*, 56:17, 1995.
85. Friedenstein, A. J., Precursor cells of mechanocytes, *Int. Rev. Cytol.*, 47, 327-359, 1976.
86. Mittelmeier H.: Knochenregeneration mit Aufbereitetem Synthetischen und Navitem Ersatzmaterial, *Hefte zur Unfallheilkunde*, Heft 200, 5. Deutsch-Österr. Schweizerische Unfalltagung, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1988. .
87. Mundell R.D., Mooney M.P., Siegel M.L, Losken A: Osseous Guided Tissue Regeneration Using a Collagen Barrier Membrane, *J. Oral Maxillofac. Surg.* , 51, 1004- 12, 1993.
88. PESCH, H.J. : Solvent Preserved Grafts of Dura Mater and Fascia Lata (Membranous Collagen Grafts) in Animals, *Scientific Information, Biodynamics International*, Germany, 1985.
89. Sandberg E., Dahlln C., Linde A. Bone Regeneration by the Osteopromotion Technique Using Bioabsorbable Membranes: An Experimental Study in Rats, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 51, 1106-14, 1993.
90. Santamaria J, Garcia AM, Vicente JC, Landa S, Lopez-Arranz JS. Bone Regeneration After Radicular Cyst Removal With and Without Guided Tissue Regeneration, *Int. J. Oral Maxillofac.Surg*, 27, 118-20, 1998.
91. Schweiberer L, Stutzle H, Mandelkow HK. Bone Transplantation, *Arch. Orthop. Trauma Surg*, 109, 1-8, 1989.
92. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284(5411):143-147.
93. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop D J: Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999, 107: 275-281.

94. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000, 28: 875-84.
95. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F: Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism* 2002, 46: 704-713
96. Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT: Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clinical Science* 1998, 94: 549-555.
97. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA: Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999, 14: 1115-112.
98. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. Stem Cells Associated With Macroporous Bioceramics For Long Bone Repair: 6- To 7-Year Outcome Of A Pilot Clinical Study. *Tissue Engineering Volume 13, Number 5, 2007.*
99. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 287:1442-1446, 2000.
100. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999.
101. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6: 1282- 1286, 2000.
102. Otto W. R., J. Rao: Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif.* 2004, 37: 97-110.
103. Javazon E H, Beggs K. J, Flake A W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol.* 2004, 32: 414 -425.
104. Taguchi K, Ogawa R, Migita M, Hanawa H, Ito H, Orimo H: The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 27;331(1):31-6.
105. Ural AU, Demiralp B, Avcu F, Yurttaş Y, Canpolat E, Can B, Serdar M, Sarper M.: Allojenik mezenkimal kök hücrelerin tavşan tibial segmentel kemik defekti tamirinde kullanılması. *Turkish Journal of Hematology. Supplement* 2004; 21 (3): 48.

106. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H: Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell. Mol. Med.* 2005; 9(1): 72-84
107. Montufar-Solis D, Nguyen HC, Nguyen HD, Horn WN, Cody DD, Duke PJ: Using Cartilage To Repair Bone: An Alternative Approach in Tissue Engineering *annals Of Biomedical Engineering* 2004, 32(3): 504-509
108. Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Yoshida N, Yamaguchi: A Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone* 2004, 34(6):993-1003
109. Horwitz E M, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med.* 1999; 5:309-13.
110. Rüedi T P, Murphy W M, C.L.Colton, A.Fernandez Dell'Oca, U. Holz J. F. Kellam, P.E.Ochsner, Kırık Tedavisinde AO kuralları 2001.
111. Kumar S, Wan C, Ramaswamy G, Clemens T L. Selvarangan Ponnazhagan Mesenchymal Stem Cells Expressing Osteogenic and Angiogenic Factors Synergistically Enhance Bone Formation in a Mouse Model of Segmental Bone Defect *The American Society of Gene & Cell Therapy Mol Ther.* 2010 May; 18(5):1026–1034.
112. Hua Liu, David Michael Kemeny, Boon Chin Heng, Hong Wei Ouyang, Alirio J. Melendez and Tong Cao The Immunogenicity and Immunomodulatory Function of Osteogenic Cells Differentiated from Mesenchymal Stem Cells *The Journal of Immunology*, 2006;176:2864–2871.
113. Hossein Nejadnik, James H. Hui, Erica Pei Feng Choong, Bee-Choo Ta and Eng Hin Lee Autologous Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Versus Autologous Chondrocyte Implantation *Am J Sports Med* June 2010;(6)38: 1110-1116